(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2023-507118
(P2023-507118A)
(43)公表日　令和5年2月21日(2023.2.21)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１００	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	ＺＮＡ	４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*5/0735(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0735		
Ｃ１２Ｎ	*15/24 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/24		
Ａ６１Ｋ	*35/545(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/545		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全160頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-536616(P2022-536616)
(86)(22)出願日　令和2年12月18日(2020.12.18)
(85)翻訳文提出日　令和4年8月8日(2022.8.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/066256
(87)国際公開番号　WO2021/127594
(87)国際公開日　令和3年6月24日(2021.6.24)
(31)優先権主張番号　62/950,063
(32)優先日　令和1年12月18日(2019.12.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/025,735
(32)優先日　令和2年5月15日(2020.5.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/115,592
最終頁に続く

(71)出願人　517372508
エディタス・メディシン、インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州　０２１４１、ケンブリッジ、ハーレー・ストリート　１１
(74)代理人　100113376
弁理士　南条 雅裕
(74)代理人　100179394
弁理士　瀬田 あや子
(74)代理人　100185384
弁理士　伊波 興一朗
(74)代理人　100137811
弁理士　原 秀貢人
(72)発明者　ウェルステッド ジー グラント
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　治療のための操作された細胞

(57)【要約】
アクチビンを含む培養培地中で胚性幹細胞、人工万能性幹細胞及び／又は分化細胞を培養する方法が記載される。一態様では、本開示は、万能性ヒト幹細胞であって、（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）の機能喪失をもたらすゲノム編集、及び（ｉｉ）ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集又はアデノシンＡ２ａ受容体の機能喪失をもたらすゲノム編集を含む万能性ヒト幹細胞を特徴とする。

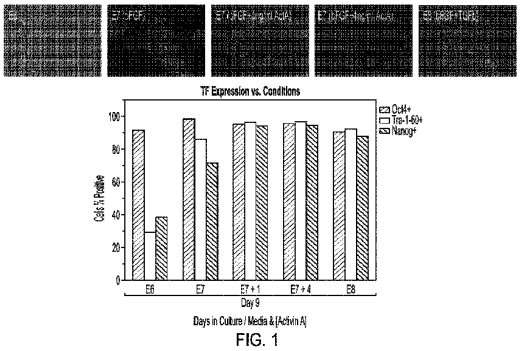


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
万能性ヒト幹細胞であって、
（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）の機能喪失をもたらすゲノム編集、及び
（ｉｉ）ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集又はアデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）の機能喪失をもたらすゲノム編集
を含む万能性ヒト幹細胞。
【請求項２】
ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含む、請求項１に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項３】
ＴＧＦβ受容体又はＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブ変異型の機能喪失をもたらすゲノム編集を含む、請求項１又は２に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項４】
前記ＴＧＦβ受容体は、ＴＧＦβ受容体ＩＩ（ＴＧＦβＲＩＩ）である、請求項３に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項５】
ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＴＲＡ－２－４９／６Ｅ、ＡＬＰ、Ｓｏｘ２、Ｅ－カドヘリン、ＵＴＦ－１、Ｏｃｔ４、Ｒｅｘ１及びＮａｎｏｇからなる群から選択される１つ又は複数の万能性マーカーを発現する、請求項１～４のいずれか一項に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項６】
請求項１～５のいずれか一項に記載の万能性ヒト幹細胞の娘細胞である分化細胞。
【請求項７】
免疫細胞である、請求項６に記載の分化細胞。
【請求項８】
リンパ球である、請求項６に記載の分化細胞。
【請求項９】
ナチュラルキラー細胞である、請求項６に記載の分化娘細胞。
【請求項１０】
前記幹細胞は、ヒト人工万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）であり、前記分化娘細胞は、ｉＮＫ細胞である、請求項６に記載の分化細胞。
【請求項１１】
（ａ）内在性ＣＤ３、ＣＤ４及び／又はＣＤ８を発現せず；及び
（ｂ）少なくとも１つの内在性遺伝子であって、
（ｉ）ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、ＣＤ４３及び／若しくはＣＤ４５又はそれらの任意の組み合わせ；
（ｉｉ）ＮＫ細胞受容体免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、分化抗原群１６（ＣＤ１６））；
（ｉｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；
（ｉｖ）ＣＤ６９；
（ｖ）天然細胞傷害性受容体；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
をコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現する、請求項６に記載の分化細胞。
【請求項１２】
１つ又は複数の追加的なゲノム編集を含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１３】
（１）核酸配列であって、

（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；
（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型；
（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；
（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；
（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；
（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
をコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つのゲノム編集を含み、及び／又は
（２）少なくとも１つのゲノム編集であって、
（ｉ）ＡＤＯＲＡ２Ａ；
（ｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；
（ｉｉｉ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；
（ｉｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；
（ｖ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；
（ｖｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；
（ｖｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；
（ｖｉｉｉ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；
（ｉｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
の少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つのゲノム編集を含む、請求項１２に記載の細胞。

【請求項１４】
アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）の機能喪失をもたらすゲノム編集を含むヒト人工万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）。

【請求項１５】
ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集又はサイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）の機能喪失をもたらすゲノム編集を含む、請求項１４に記載のヒトｉＰＳＣ。

【請求項１６】
ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集及びＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム編集を含む、請求項１５に記載のヒトｉＰＳＣ。

【請求項１７】
ＴＧＦβ受容体又はＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブ変異型の機能喪失をもたらすゲノム編集を含む、請求項１５又は１６に記載のヒトｉＰＳＣ。

【請求項１８】
前記ＴＧＦβ受容体は、ＴＧＦβ受容体ＩＩ（ＴＧＦβＲＩＩ）である、請求項１７に記載のヒトｉＰＳＣ。

【請求項１９】
ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＴＲＡ－２－４９／６Ｅ、ＡＬＰ、Ｓｏｘ２、Ｅ－カドヘリン、ＵＴＦ－１、Ｏｃｔ４、Ｒｅｘ１及びＮａｎｏｇからなる群から選択される１つ又は複数の万能性マーカーを発現する、請求項１４～１８のいずれか一項に記載のヒトｉＰＳＣ。

【請求項２０】
請求項１４～１９のいずれか一項に記載のヒトｉＰＳＣの娘細胞である分化細胞。
【請求項２１】
免疫細胞である、請求項２０に記載の分化細胞。
【請求項２２】
リンパ球である、請求項２０に記載の分化細胞。
【請求項２３】
ナチュラルキラー細胞である、請求項２０に記載の分化娘細胞。
【請求項２４】
ｉＮＫ細胞である、請求項２０に記載の分化細胞。
【請求項２５】
（ａ）内在性ＣＤ３、ＣＤ４及び／又はＣＤ８を発現せず；及び
（ｂ）少なくとも１つの内在性遺伝子であって、
（ｉ）ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、ＣＤ４３及び／若しくはＣＤ４５又はそれらの任意の組み合わせ；
（ｉｉ）ＮＫ細胞受容体免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、分化抗原群１６（ＣＤ１６））；
（ｉｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；
（ｉｖ）ＣＤ６９；
（ｖ）天然細胞傷害性受容体；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
をコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現する、請求項２０に記載の分化細胞。
【請求項２６】
１つ又は複数の追加的なゲノム編集を含む、請求項１４～２５のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項２７】
（１）核酸配列であって、
（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；
（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型；
（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；
（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；
（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；
（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
をコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つのゲノム編集を含み、及び／又は
（２）少なくとも１つのゲノム編集であって、
（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；
（ｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；
（ｉｉｉ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；
（ｉｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；
（ｖ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；
（ｖｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；

（ｖｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；
（ｖｉｉｉ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；
（ｉｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
の少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つのゲノム編集を含む、請求項２６に記載の細胞。
【請求項２８】
ＣＩＳＨの機能喪失をもたらす前記ゲノム編集は、配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものであり；
ＴＧＦβＲＩＩの機能喪失をもたらす前記ゲノム編集は、配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものであり；及び／又は
ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらす前記ゲノム編集は、配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである、請求項１～２７のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項２９】
ＣＩＳＨの機能喪失をもたらす前記ゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、（ｉｉ）配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものであり；
ＴＧＦβＲＩＩの機能喪失をもたらす前記ゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、（ｉｉ）配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものであり；及び／又は
ＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらす前記ゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、（ｉｉ）配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである、請求項１～２８のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項３０】
請求項１～２９のいずれか一項に記載の細胞を作製する方法であって、前記細胞を、
ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、並びに配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；
ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、並びに配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；及び／又は
ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、並びに配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡの１つ又は複数と接触させることを含む方法。
【請求項３１】
請求項１～３０のいずれか一項に記載の細胞を作製する方法であって、前記細胞を、
（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、（ｉｉ）配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体；
（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、（ｉｉ）配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体；及び／又は

（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、（ｉｉ）配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体
の１つ又は複数と接触させることを含む方法。
【請求項３２】
前記ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃａｓ１２ａ変異型である、請求項２９～３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
前記Ｃａｓ１２ａ変異型は、Ｍ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１つ又は複数のアミノ酸置換を含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記Ｃａｓ１２ａ変異型は、アミノ酸置換Ｍ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａを含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３５】
前記Ｃａｓ１２ａ変異型は、配列番号１１４８のアミノ酸配列を含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３６】
前記細胞を、
（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；及び配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含む標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；及び
（ｉｉ）配列番号１１４４～１１５１の１つ（又はその一部）のアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ
と接触させることを含む、請求項３０～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
形質転換成長因子β（ＴＧＦβ）シグナル伝達経路の破壊を含む万能性ヒト幹細胞。
【請求項３８】
ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集を含む、請求項３４に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項３９】
ＴＧＦβ受容体又はＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブ変異型の機能喪失を含む、請求項３７又は３８に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項４０】
前記ＴＧＦβ受容体は、ＴＧＦβ受容体ＩＩ（ＴＧＦβＲＩＩ）である、請求項３９に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項４１】
インターロイキンシグナル伝達の拮抗薬の機能喪失をさらに含む、請求項３７～４０のいずれか一項に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項４２】
インターロイキンシグナル伝達の拮抗薬の前記機能喪失をもたらすゲノム改変をさらに含む、請求項３７～４１のいずれか一項に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項４３】
前記インターロイキンシグナル伝達の拮抗薬は、ＩＬ－１５シグナル伝達経路及び／又はＩＬ－２シグナル伝達経路の拮抗薬である、請求項４１又は４２に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項４４】
サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）の機能喪失を含む、請求項３７～４３のいずれか一項に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項４５】

ＣＩＳＨの前記機能喪失をもたらすゲノム改変を含む、請求項４４に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項４６】
ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＴＲＡ－２－４９／６Ｅ、ＡＬＰ、Ｓｏｘ２、Ｅ－カドヘリン、ＵＴＦ－１、Ｏｃｔ４、Ｒｅｘ１及びＮａｎｏｇからなる群から選択される１つ又は複数の万能性マーカーを発現する、請求項３７～４５のいずれか一項に記載の万能性ヒト幹細胞。
【請求項４７】
請求項３７～４６のいずれか一項に記載の万能性ヒト幹細胞の娘細胞である分化細胞。
【請求項４８】
免疫細胞である、請求項４７に記載の分化細胞。
【請求項４９】
リンパ球である、請求項４７に記載の分化細胞。
【請求項５０】
ナチュラルキラー細胞である、請求項４７に記載の分化娘細胞。
【請求項５１】
前記幹細胞は、ヒト人工万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）であり、前記分化娘細胞は、ｉＮＫ細胞である、請求項４７に記載の分化細胞。
【請求項５２】
（ａ）内在性ＣＤ３、ＣＤ４及び／又はＣＤ８を発現せず；及び
（ｂ）少なくとも１つの内在性遺伝子であって、
（ｉ）ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、ＣＤ４３及び／若しくはＣＤ４５又はそれらの任意の組み合わせ；
（ｉｉ）ＮＫ細胞受容体免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、分化抗原群１６（ＣＤ１６））；
（ｉｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；
（ｉｖ）ＣＤ６９；
（ｖ）天然細胞傷害性受容体；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
をコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現する、請求項４７に記載の分化細胞。
【請求項５３】
１つ又は複数の追加的なゲノム編集を含む、請求項３７～５２のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項５４】
（１）核酸配列であって、
（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；
（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型；
（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；
（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；
（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；
（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
をコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少

なくとも１つのゲノム編集を含み、及び／又は
（２）少なくとも１つのゲノム編集であって、
（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；
（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；
（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；
（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；
（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；
（ｖｉ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；
（ｖｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；
（ｖｉｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；
（ｉｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；
（ｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
の少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つのゲノム編集を含む、請求項５３に記載の細胞。

【請求項５５】
万能性ヒト幹細胞を培養する方法であって、アクチビンを含む培地中で前記幹細胞を培養することを含む方法。

【請求項５６】
前記万能性ヒト幹細胞は、胚性幹細胞又は人工万能性幹細胞である、請求項５５に記載の方法。

【請求項５７】
前記万能性ヒト幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩを発現しない、請求項５５又は５６に記載の方法。

【請求項５８】
前記万能性ヒト幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩを発現しないように遺伝子操作される、請求項５５～５７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５９】
前記万能性ヒト幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩをコード化する遺伝子をノックアウトするように遺伝子操作される、請求項５５～５７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６０】
前記アクチビンは、アクチビンＡである、請求項５５～５９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６１】
前記培地は、ＴＧＦβを含まない、請求項５５～６０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６２】
前記培養は、規定された期間（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２日又はそれを超える）にわたって実施される、請求項５５～６１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６３】
前記培養ステップ中又はその後の１つ又は複数の時点において、前記万能性ヒト幹細胞は、万能性を維持する（例えば、１つ又は複数の万能性マーカーを示す）、請求項５５～６２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６４】
前記培養ステップ中又はその後の１つ又は複数の時点において、前記万能性ヒト幹細胞は、検出可能なレベルの、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＴＲＡ－２－４９／６Ｅ、ＡＬＰ、Ｓｏｘ２、Ｅ－カドヘリン、ＵＴＦ－１、Ｏｃｔ４、Ｒｅｘ１及びＮａｎｏｇの１つ又は複数を発現する、請求項６３に記載の方法。

【請求項６５】
前記培養ステップ中又はその後の時点において、前記万能性ヒト幹細胞は、内胚葉、中胚葉及び／又は外胚葉系統の細胞に分化される、請求項６３に記載の方法。
【請求項６６】
前記万能性ヒト幹細胞又はその子孫は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞にさらに分化される、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
前記万能性ヒト幹細胞は、
（１）核酸配列であって、
（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；
（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型；
（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；
（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；
（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；
（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
をコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つのゲノム編集を含み、及び／又は
（２）少なくとも１つのゲノム編集であって、
（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；
（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；
（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；
（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；
（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；
（ｖｉ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；
（ｖｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；
（ｖｉｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；
（ｉｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；
（ｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
の少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つのゲノム編集を含む、請求項５５～６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８】
（ｉ）万能性ヒト幹細胞と、（ｉｉ）アクチビンを含む細胞培養培地とを含む細胞培養物であって、前記万能性ヒト幹細胞は、形質転換成長因子β（ＴＧＦβ）シグナル伝達経路の破壊を含む、細胞培養物。
【請求項６９】
前記幹細胞は、ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集を含む、請求項６８に記載の細胞培養物。
【請求項７０】
前記ゲノム編集は、ゲノム編集である、請求項６９に記載の細胞培養物。
【請求項７１】

前記幹細胞は、ＴＧＦβ受容体又はＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブ変異型の機能喪失を含む、請求項６８～７０のいずれか一項に記載の細胞培養物。
【請求項７２】
前記ＴＧＦβ受容体は、ＴＧＦβ受容体ＩＩ（ＴＧＦβＲＩＩ）である、請求項７１に記載の細胞培養物。
【請求項７３】
前記万能性ヒト幹細胞は、
（１）核酸配列であって、
（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；
（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型；
（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；
（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；
（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；
（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
をコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つのゲノム編集を含み、及び／又は
（２）少なくとも１つのゲノム編集であって、
（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；
（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；
（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；
（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；
（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；
（ｖｉ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；
（ｖｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；
（ｖｉｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；
（ｉｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；
（ｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
の少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つのゲノム編集を含む、請求項６８～７２のいずれか一項に記載の細胞培養物。
【請求項７４】
ｉＮＫ細胞活性のレベルを増加させる方法であって、
（ｉ）形質転換成長因子β（ＴＧＦβ）シグナル伝達経路の破壊を含む万能性ヒト幹細胞を提供することと；
（ｉｉ）前記万能性ヒト幹細胞をｉＮＫ細胞に分化させることと
を含み、前記ｉＮＫ細胞は、ＴＧＦβシグナル伝達経路の破壊を含まないｉＮＫ細胞と比較してより高いレベルの細胞活性を有する、方法。
【請求項７５】
前記ｉＮＫは、アクチビンを含む培地中で培養された万能性ヒト幹細胞から分化される、請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】

前記分化ステップ前及び／又はその間、アクチビンを含む培地中で前記万能性ヒト幹細胞を培養することをさらに含む、請求項７４又は７５に記載の方法。
【請求項７７】
前記万能性ヒト幹細胞における形質転換成長因子β（ＴＧＦβ）シグナル伝達経路を破壊することをさらに含む、請求項７４～７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８】
前記幹細胞は、ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集を含む、請求項７３～７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９】
前記幹細胞は、ＴＧＦβ受容体又はＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブ変異型の機能喪失を含む、請求項７３～７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８０】
前記ＴＧＦβ受容体は、ＴＧＦβ受容体ＩＩ（ＴＧＦβＲＩＩ）である、請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
前記万能性ヒト幹細胞は、
（１）核酸配列であって、
（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；
（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型；
（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；
（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；
（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；
（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；
（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
をコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つのゲノム編集を含み、及び／又は
（２）少なくとも１つのゲノム編集であって、
（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；
（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；
（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；
（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；
（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；
（ｖｉ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；
（ｖｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；
（ｖｉｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；
（ｉｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；
（ｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又は
それらの２つ以上の任意の組み合わせ
の少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つのゲノム編集を含む、請求項７３～８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８２】
がんを有するか又はがんのリスクがある対象を治療する方法であって、請求項６～１３

、２０～２９又は４７～５４のいずれか一項に記載の細胞を前記対象に投与し、それにより前記対象における前記がんを治療することを含む方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、その全ての内容が全体として本明細書に援用される、２０１９年１２月１８日に出願された米国仮出願第６２／９５０，０６３号明細書、２０２０年５月１５日に出願された米国仮出願第６３／０２５，７３５号明細書及び２０２０年１１月１８日に出願された米国仮出願第６３／１１５，５９２号明細書の利益を主張する。
【背景技術】
【０００２】
治療的介入のための操作された細胞並びに万能性が維持されるように、胚性幹細胞及び人工万能性細胞などの幹細胞を培養する方法に対する必要性が依然として存在する。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００３】
一態様では、本開示は、万能性ヒト幹細胞であって、（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）の機能喪失をもたらすゲノム編集、及び（ｉｉ）ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集又はアデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）の機能喪失をもたらすゲノム編集を含む万能性ヒト幹細胞を特徴とする。いくつかの実施形態にでは、幹細胞は、ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集及びＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集を含む。
【０００４】
いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβ受容体又はＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブ変異型の機能喪失をもたらすゲノム編集を含む。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ受容体は、ＴＧＦβ受容体ＩＩ（ＴＧＦβＲＩＩ）である。
【０００５】
いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＴＲＡ－２－４９／６Ｅ、ＡＬＰ、Ｓｏｘ２、Ｅ－カドヘリン、ＵＴＦ－１、Ｏｃｔ４、Ｒｅｘ１及びＮａｎｏｇからなる群から選択される１つ又は複数の万能性マーカーを発現する。
【０００６】
いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の万能性ヒト幹細胞の娘細胞である分化細胞を特徴とする。いくつかの実施形態では、分化細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態では、分化細胞は、リンパ球である。いくつかの実施形態では、分化細胞は、ナチュラルキラー細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ヒト人工万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）であり、分化娘細胞は、ｉＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、（ａ）内在性ＣＤ３、ＣＤ４及び／又はＣＤ８を発現せず；及び（ｂ）少なくとも１つの内在性遺伝子であって、（ｉ）ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、ＣＤ４３及び／若しくはＣＤ４５又はそれらの任意の組み合わせ；（ｉｉ）ＮＫ細胞受容体免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、分化抗原群１６（ＣＤ１６））；（ｉｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；（ｉｖ）ＣＤ６９；（ｖ）天然細胞傷害性受容体；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現する。
【０００７】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかは、１つ又は複数の追加的なゲノム編集を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、（１）核酸配列であって、（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型（例えば、非天然変異型）（ｉｉｉ）インターロイキン１５（Ｉ

Ｌ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つのゲノム編集を含み、及び／又は（２）少なくとも１つのゲノム編集であって、（ｉ）ＡＤＯＲＡ２Ａ；（ｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｉｉ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；（ｉｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｖｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｖｉｉｉ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｉｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つのゲノム編集を含む。

【０００８】

別の態様では、本開示は、アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）の機能喪失をもたらすゲノム編集を含むヒト人工万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を特徴とする。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは、ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集又はサイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）の機能喪失をもたらすゲノム編集を含む。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは、ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらすゲノム編集及びＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム編集を含む。

【０００９】

いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは、ＴＧＦβ受容体又はＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブ変異型の機能喪失をもたらすゲノム編集を含む。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ受容体は、ＴＧＦβ受容体ＩＩ（ＴＧＦβＲＩＩ）である。

【００１０】

いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＴＲＡ－２－４９／６Ｅ、ＡＬＰ、Ｓｏｘ２、Ｅ－カドヘリン、ＵＴＦ－１、Ｏｃｔ４、Ｒｅｘ１及びＮａｎｏｇからなる群から選択される１つ又は複数の万能性マーカーを発現する。

【００１１】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載のヒトｉＰＳＣの娘細胞である分化細胞を特徴とする。いくつかの実施形態では、分化細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態では、分化細胞は、リンパ球である。いくつかの実施形態では、分化細胞は、ナチュラルキラー細胞である。いくつかの実施形態では、分化娘細胞は、ｉＮＫ細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、（ａ）内在性ＣＤ３、ＣＤ４及び／又はＣＤ８を発現せず；及び（ｂ）少なくとも１つの内在性遺伝子であって、（ｉ）ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、ＣＤ４３及び／若しくはＣＤ４５又はそれらの任意の組み合わせ；（ｉｉ）ＮＫ細胞受容体免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、分化抗原群１６（ＣＤ１６））；（ｉｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；（ｉｖ）ＣＤ６９；（ｖ）天然細胞傷害性受容体；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現する。

【００１２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかは、１つ又は複数の追加的なゲノム編集を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、（１）核酸配列であって、（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩ

Ｉ（ＣＤ１６）の変異型（例えば、非天然変異型）；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つのゲノム編集を含み、及び／又は（２）少なくとも１つのゲノム編集であって、（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｉｉ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；（ｉｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｖｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｖｉｉｉ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｉｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つのゲノム編集を含む。

【００１３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム編集は、配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム編集は、配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３塩基以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に描写される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’にある配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。

【００１４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＴＧＦβＲＩＩの機能喪失をもたらすゲノム編集は、配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＴＧＦβＲＩＩの機能喪失をもたらすゲノム編集は、配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３塩基以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＴＧＦβＲＩＩの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に描写される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＴＧＦβＲＩＩの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）配列番号１１５７

又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’にある配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。

【００１５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集は、配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集は、配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３塩基以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に描写される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’にある配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡを使用して生成されたものである。

【００１６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３ヌクレオチド以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレア

ーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。

【００１７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＴＧＦβＲＩＩの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＴＧＦβＲＩＩの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３ヌクレオチド以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＴＧＦβＲＩＩの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＴＧＦβＲＩＩの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。

【００１８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つに記載のヌクレオチド配列

を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３ヌクレオチド以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞のいずれかにおけるＡＤＯＲＡ２Ａの機能喪失をもたらすゲノム編集は、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を使用して生成されたものである。

【００１９】

別の態様では、本開示は、細胞、例えば本明細書に記載の細胞を作製する方法であって、細胞（例えば、万能性ヒト幹細胞又はヒト人工万能性幹細胞）を、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、並びに配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３ヌクレオチド以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、並びに配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３ヌクレオチド以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；及び／又はＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ、並びに配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３ヌクレオチド以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡの１つ又は複数と接触させることを含む方法を特徴とする。

【００２０】

いくつかの実施形態では、方法は、細胞を、（１）（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡ；（２）（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡ；及び（３）（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡの１つ又は複数と接触させることを含む。

【００２１】

いくつかの実施形態では、方法は、細胞を、（１）（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡ；（２）（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡ；及び（３）（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡの１つ又は複数と接触させることを含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃａｓ１２ａ変異型である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ａ変異型は、Ｍ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１つ又は複数のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ａ変異型は、アミノ酸置換Ｍ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａを含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ａ変異型は、配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００２３】

別の態様では、本開示は、細胞、例えば本明細書に記載の細胞を作製する方法であって、細胞（例えば、万能性ヒト幹細胞又はヒト人工万能性幹細胞）を、（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３ヌクレオチド以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体；（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３ヌクレオチド以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体；及び／又は（ｉ）ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ１２ａ変異型、例えばＭ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１、２又は３つのアミノ酸置換を含むＣａｓ１２ａ変異型、例えば配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＣａｓ１２ａ変異型）と、（ｉｉ）配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つと同一であるか、又は１、２若しくは３ヌクレオチド以下だけ異なるヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡとを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体の１つ又は複数と接触させることを含む方法を特徴とする。

【００２４】

いくつかの実施形態では、方法は、細胞を、（１）（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡを含むＲＮＰ；（２）（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡを含むＲＮＰ；及び（３）（ｉ

）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡを含むＲＮＰの１つ又は複数と接触させることを含む。

【００２５】

いくつかの実施形態では、方法は、細胞を、（１）（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡを含むＲＮＰ；（２）（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡを含むＲＮＰ；（３）（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡを含むＲＮＰの１つ又は複数と接触させることを含む。

【００２６】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃａｓ１２ａ変異型である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ａ変異型は、Ｍ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択される１つ又は複数のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ａ変異型は、アミノ酸置換Ｍ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａを含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ａ変異型は、配列番号１１４８と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００２７】

別の態様では、本開示は、細胞、例えば本明細書に記載の細胞を作製する方法であって、細胞（例えば、万能性ヒト幹細胞又はヒト人工万能性幹細胞）を、（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；及び配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；及び（ｉｉ）配列番号１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと接触させることを含む方法を特徴とする。

【００２８】

別の態様では、本開示は、細胞、例えば本明細書に記載の細胞を作製する方法であって、細胞（例えば、万能性ヒト幹細胞又はヒト人工万能性幹細胞）を、（１）（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；及び（ｉｉ）配列番号１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含むＲＮＰ；（２）（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；及び（ｉｉ）配列番号１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含むＲＮＰ；及び（３）（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列を含むガイドＲＮＡ；（ｉｉ）配列番号１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含むＲＮＰと接触させることを含む方法を特徴とする。

【００２９】

別の態様では、本開示は、細胞、例えば本明細書に記載の細胞を作製する方法であって、細胞（例えば、万能性ヒト幹細胞又はヒト人工万能性幹細胞）を、（１）（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡ；（２）（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡ；（３）（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡ；及び（４）配列番号１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと接触させることを含む方法を特徴とする。

【００３０】

別の態様では、本開示は、細胞、例えば本明細書に記載の細胞を作製する方法であって、細胞（例えば、万能性ヒト幹細胞又はヒト人工万能性幹細胞）を、（１）（ａ）（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡ；及び（ｂ）配列番号１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含むＲＮＰ；（２）（ａ）（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡ；及び（ｂ）配列番号１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含むＲＮＰ；及び（３）（ａ）（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、及び（ｉｉ）表３に示される５’伸長配列を含むガイドＲＮＡ；及び（ｂ）配列番号１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含むＲＮＰと接触させることを含む方法を特徴とする。

【００３１】

別の態様では、本開示は、細胞、例えば本明細書に記載の細胞を作製する方法であって、細胞（例えば、万能性ヒト幹細胞又はヒト人工万能性幹細胞）を、（１）（ｉ）配列番号１又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡ；（２）（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡ；（３）（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある配列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡ；及び（４）配列番号１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと接触させることを含む方法を特徴とする。

【００３２】

別の態様では、本開示は、細胞、例えば本明細書に記載の細胞を作製する方法であって、細胞（例えば、万能性ヒト幹細胞又はヒト人工万能性幹細胞）を、（１）（ａ）（ｉ）配列番号１１５５又は１１６２のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡ；及び（ｂ）配列番号

１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含むＲＮＰ；（２）（ａ）（ｉ）配列番号１１５７又は１１６１のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡ；及び（ｂ）配列番号１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含むＲＮＰ；及び（３）（ａ）（ｉ）配列番号１１５９又は１１６３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる標的化ドメイン配列、（ｉｉ）標的化ドメイン配列の５’にある列番号１１５３のヌクレオチド配列を含むか又はそれからなるスキャフォールド配列、及び（ｉｉｉ）スキャフォールド配列の５’の配列番号１１５４のヌクレオチド配列を含むガイドＲＮＡ；及び（ｂ）配列番号１１４４～１１５１（又はその一部）と９０％、９５％又は１００％の同一性を有するアミノ酸配列を含むＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含むＲＮＰと接触させることを含む方法を特徴とする。

【００３３】

別の態様では、本開示は、形質転換成長因子β（ＴＧＦβ）シグナル伝達経路の破壊を含む万能性ヒト幹細胞を特徴とする。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらす遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、ゲノム編集である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβ受容体又はＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブ変異型の機能喪失を含む。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ受容体は、ＴＧＦβ受容体ＩＩ（ＴＧＦβＲＩＩ）である。

【００３４】

いくつかの実施形態では、幹細胞は、インターロイキンシグナル伝達の拮抗薬の機能喪失をさらに含む。いくつかの実施形態では、幹細胞は、インターロイキンシグナル伝達の拮抗薬の機能喪失をもたらすゲノム改変をさらに含む。いくつかの実施形態では、インターロイキンシグナル伝達の拮抗薬は、ＩＬ－１５シグナル伝達経路及び／又はＩＬ－２シグナル伝達経路の拮抗薬である。

【００３５】

いくつかの実施形態では、幹細胞は、サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）の機能喪失を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＣＩＳＨの機能喪失をもたらすゲノム改変を含む。

【００３６】

いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＴＲＡ－２－４９／６Ｅ、ＡＬＰ、Ｓｏｘ２、Ｅ－カドヘリン、ＵＴＦ－１、Ｏｃｔ４、Ｒｅｘ１及びＮａｎｏｇからなる群から選択される１つ又は複数の万能性マーカーを発現する。

【００３７】

いくつかの実施形態では、幹細胞は、１つ又は複数の追加的な遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞は、（１）核酸配列であって、（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型（例えば、非天然変異型）；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つの遺伝子改変を含み、及び／又は（２）少なくとも１つのゲノム編集であって、（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；（ｉｉｉ）

Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖｉ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｖｉｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｉｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つの遺伝子改変を含む。

【００３８】

いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＴＧＦβＲＩＩ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＣＩＳＨ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＡＤＯＲＡ２Ａ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号６３１～８２６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＴＩＧＩＴ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号３６５～５７６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、Ｂ２Ｍ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号５７７～６３０のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＮＫＧ２Ａ遺伝子中の遺伝子改変を含む。

【００３９】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載の万能性ヒト幹細胞の娘細胞である分化細胞を特徴とする。いくつかの実施形態では、分化細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態では、分化細胞は、リンパ球である。いくつかの実施形態では、分化細胞は、ナチュラルキラー細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ヒト人工万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）であり、分化娘細胞は、誘導ナチュラルキラー（ｉＮＫ）細胞である。

【００４０】

いくつかの実施形態では、分化細胞は、（ａ）内在性ＣＤ３、ＣＤ４及び／又はＣＤ８を発現せず；及び（ｂ）少なくとも１つの内在性遺伝子であって、（ｉ）ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、ＣＤ４３及び／若しくはＣＤ４５又はそれらの任意の組み合わせ；（ｉｉ）ＮＫ細胞受容体免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、分化抗原群１６（ＣＤ１６））；（ｉｉｉ）ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；（ｉｖ）ＣＤ６９；（ｖ）天然細胞傷害性受容体；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する少なくとも１つの内在性遺伝子を発現する。

【００４１】

いくつかの実施形態では、分化幹細胞は、１つ又は複数の追加的な遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、分化幹細胞は、（１）核酸配列であって、（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型（例えば、非天然変異型）；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受

容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つの遺伝子改変を含み、及び／又は（２）少なくとも１つの遺伝子改変であって、（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖｉ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｖｉｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｉｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つの遺伝子改変を含む。

【００４２】

いくつかの実施形態では、分化幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＴＧＦβＲＩＩ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、分化幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＣＩＳＨ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、分化幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＡＤＯＲＡ２Ａ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、分化幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号６３１～８２６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＴＩＧＩＴ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、分化幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号３６５～５７６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、Ｂ２Ｍ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、分化幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号５７７～６３０のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＮＫＧ２Ａ遺伝子中の遺伝子改変を含む。

【００４３】

別の態様では、本開示は、万能性ヒト幹細胞を培養する方法であって、アクチビンを含む培地中で幹細胞を培養することを含む方法を特徴とする。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、胚性幹細胞又は人工万能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩを発現しない。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩを発現しないように遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩをコード化する遺伝子をノックアウトするように遺伝子操作される。

【００４４】

いくつかの実施形態では、アクチビンは、アクチビンＡである。いくつかの実施形態では、培地は、ＴＧＦβを含まない。

【００４５】

いくつかの実施形態では、培養は、規定された期間（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２日又はそれを超える）にわたって実施される。いくつか

の実施形態では、培養ステップ中又はその後の１つ又は複数の時点において、万能性ヒト幹細胞は、万能性を維持する（例えば、１つ又は複数の万能性マーカーを示す）。いくつかの実施形態では、培養ステップ中又はその後の１つ又は複数の時点において、万能性ヒト幹細胞は、検出可能なレベルの、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＴＲＡ－２－４９／６Ｅ、ＡＬＰ、Ｓｏｘ２、Ｅ－カドヘリン、ＵＴＦ－１、Ｏｃｔ４、Ｒｅｘ１及びＮａｎｏｇの１つ又は複数を発現する。いくつかの実施形態では、培養ステップ中又はその後の時点において、万能性ヒト幹細胞は、内胚葉、中胚葉及び／又は外胚葉系統の細胞に分化される。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞又はその子孫は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞にさらに分化される。

【００４６】

いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ヒト血清を含む培地中でＮＫ細胞に分化される。いくつかの実施形態では、培地は、ＮＫＭＡＣＳ＋ヒト血清（例えば、５％、１０％、１５％、２０％以上のヒト血清）を含む。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、血清を含まない培地中で分化されたＮＫ細胞と比較して、改善された細胞増殖、ＮＫ成熟度の増加（マーカー発現の増加（例えば、ＣＤ４５、ＣＤ５６、ＣＤ１６及び／又はＫＩＲ）によって示される）及び／又は細胞傷害性の増加を示す。

【００４７】

いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、（１）核酸配列であって、（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型（例えば、非天然変異型）；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つの遺伝子改変を含み、及び／又は（２）少なくとも１つの遺伝子改変であって、（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖｉ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｖｉｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｉｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つの遺伝子改変を含む。

【００４８】

いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＴＧＦβＲＩＩ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＣＩＳＨ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＡＤＯＲＡ２Ａ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌ

クレアーゼと、配列番号６３１～８２６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＴＩＧＩＴ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号３６５～５７６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、Ｂ２Ｍ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号５７７～６３０のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＮＫＧ２Ａ遺伝子中の遺伝子改変を含む。

【００４９】

いくつかの実施形態では、方法は、（１）万能性ヒト幹細胞が（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の非天然変異型；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコードする核酸配列を発現するように、万能性ヒト幹細胞を遺伝子改変すること、及び／又は（２）万能性ヒト幹細胞を遺伝子改変して、（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖｉ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｖｉｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｉｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能を失わせることをさらに含む。

【００５０】

いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して、ＴＧＦβＲＩＩ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１１６２のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して、ＣＩＳＨ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して、ＡＤＯＲＡ２Ａ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号６３１～８２６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して、ＴＩＧＩＴ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号３６５～５７６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して、Ｂ２Ｍ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号５７７～６３０のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して、ＮＫＧ２Ａ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。

【００５１】

別の態様では、本開示は、（ｉ）万能性ヒト幹細胞と、（ｉｉ）アクチビンを含む細胞培養培地を含む細胞培養物であって、万能性ヒト幹細胞は、形質転換成長因子β（ＴＧＦβ）シグナル伝達経路の破壊を含む、細胞培養物を特徴とする。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらす遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、ゲノム編集である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβ受容体又はＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブ変異型の機能喪失を含む。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ受容体は、ＴＧＦβ受容体ＩＩ（ＴＧＦβＲＩＩ）である。

【００５２】

いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、（１）核酸配列であって、（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型（例えば、非天然変異型）；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つの遺伝子改変を含み、及び／又は（２）少なくとも１つの遺伝子改変であって、（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖｉ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｖｉｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｉｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つの遺伝子改変を含む。

【００５３】

いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＴＧＦβＲＩＩ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＣＩＳＨ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＡＤＯＲＡ２Ａ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号６３１～８２６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＴＩＧＩＴ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号３６５～５７６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、Ｂ２Ｍ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号５７７～６３０のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して

作製される、ＮＫＧ２Ａ遺伝子中の遺伝子改変を含む。

【００５４】

別の態様では、方法は、（ｉ）形質転換成長因子β（ＴＧＦβ）シグナル伝達経路の破壊を含む、万能性ヒト幹細胞を提供することと；（ｉｉ）万能性ヒト幹細胞をｉＮＫ細胞に分化させることとを含むｉＮＫ細胞活性のレベルを増加させる方法を含み、ここで、ｉＮＫ細胞は、ＴＧＦβシグナル伝達経路の破壊を含まないｉＮＫ細胞と比較してより高いレベルの細胞活性を有する。

【００５５】

いくつかの実施形態では、ｉＮＫは、アクチビンを含む培地中で培養された万能性ヒト幹細胞から分化される。いくつかの実施形態では、方法は、分化ステップ前及び／又はその間にアクチビンを含む培地中で万能性ヒト幹細胞を培養することをさらに含む。

【００５６】

いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ヒト血清を含む培地中でＮＫ細胞に分化される。いくつかの実施形態では、培地は、ＮＫＭＡＣＳ＋ヒト血清（例えば、５％、１０％、１５％、２０％以上のヒト血清）を含む。いくつかの実施形態では、ＮＫ細胞は、血清を含まない培地中で分化されたＮＫ細胞と比較して、改善された細胞増殖、ＮＫ成熟度の増加（マーカー発現（例えば、ＣＤ４５、ＣＤ５６、ＣＤ１６及び／又はＫＩＲ）の増加によって示される）及び／又は細胞傷害性の増加を示す。

【００５７】

いくつかの実施形態にでは、方法は、万能性ヒト幹細胞における形質転換成長因子β（ＴＧＦβ）シグナル伝達経路を破壊することをさらに含む。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβシグナル伝達経路の作動薬の機能喪失をもたらす遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、ゲノム編集である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβ受容体又はＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブ変異型の機能喪失を含む。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβ受容体は、ＴＧＦβ受容体ＩＩ（ＴＧＦβＲＩＩ）である。

【００５８】

いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、（１）核酸配列であって、（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型（例えば、非天然変異型）；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコード化する核酸配列を含む外因性核酸発現コンストラクトによって特徴付けられる少なくとも１つの遺伝子改変を含み、及び／又は（２）少なくとも１つの遺伝子改変であって、（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖｉ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｖｉｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｉｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能喪失をもたらす少なくとも１つの遺伝子改変を含む。

【００５９】

いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号

２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＴＧＦβＲＩＩ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＣＩＳＨ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＡＤＯＲＡ２Ａ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号６３１～８２６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＴＩＧＩＴ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号３６５～５７６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、Ｂ２Ｍ遺伝子中の遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、万能性ヒト幹細胞は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号５７７～６３０のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して作製される、ＮＫＧ２Ａ遺伝子中の遺伝子改変を含む。

【００６０】

いくつかの実施形態では、方法は、（１）万能性ヒト幹細胞が（ｉ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；（ｉｉ）ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の変異型（例えば、非天然変異型）；（ｉｉｉ）インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；（ｉｖ）ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；（ｖ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉ）ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；（ｖｉｉ）ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；（ｖｉｉｉ）ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；（ｉｘ）白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせをコードする核酸配列を発現するように、万能性ヒト幹細胞を遺伝子改変すること、及び／又は（２）万能性ヒト幹細胞を遺伝子改変して、（ｉ）サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）；（ｉｉ）アデノシンＡ２ａ受容体（ＡＤＯＲＡ２Ａ）；（ｉｉｉ）Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体（ＴＩＧＩＴ）；（ｉｖ）β－２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）；（ｖ）プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）；（ｖｉ）クラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）；（ｖｉｉ）ナチュラルキラー細胞受容体ＮＫＧ２Ａ（ナチュラルキラーグループ２Ａ）；（ｖｉｉｉ）２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子；（ｉｘ）分化抗原群３２Ｂ（ＣＤ３２Ｂ、ＦＣＧＲ２Ｂ）；（ｘ）Ｔ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）；又はそれらの２つ以上の任意の組み合わせの少なくとも１つの機能を失わせることをさらに含む。

【００６１】

いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２９～２５７、１１５７及び１１６１のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して、ＴＧＦβＲＩＩ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号２５８～３６４、１１５５及び１１６２のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して、ＣＩＳＨ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号８２７～１１４３、１１５９及び１１６３のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮ

Ａ分子とを使用して、ＡＤＯＲＡ２Ａ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号６３１～８２６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して、ＴＩＧＩＴ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号３６５～５７６のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して、Ｂ２Ｍ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと、配列番号５７７～６３０のいずれか１つと同じであるか又は３ヌクレオチド以下だけ異なる標的化ドメイン配列を含むｇＲＮＡ分子とを使用して、ＮＫＧ２Ａ遺伝子を遺伝子改変することをさらに含む。

【００６２】

別の態様では、本開示は、例えば、アクチビンＡなどのアクチビンを含む培地中で幹細胞を培養することを含む、例えばヒト胚性幹細胞、ヒト人工万能性幹細胞又はヒト万能性幹細胞などのヒト幹細胞である幹細胞を培養する方法を特徴とする。いくつかの実施形態では、幹細胞は、胚性幹細胞又は人工万能性幹細胞である。いくつかの実施形態にでは、幹細胞は、幹細胞におけるＴＧＦ（形質転換成長因子）シグナル伝達経路を破壊する、例えば遺伝子改変などの改変を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、幹細胞におけるＴＧＦβシグナル伝達を破壊する（例えば、減少又は消失させる）改変である。例えば、いくつかの実施形態では、改変は、ＴＧＦβ受容体などのＴＧＦβシグナル伝達経路のタンパク質をコード化する遺伝子の改変である。いくつかの実施形態では、改変は、ＴＧＦβシグナル伝達経路のタンパク質の機能喪失及び／又は発現喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、改変は、ＴＧＦβシグナル伝達経路のタンパク質のノックアウトをもたらす。いくつかの実施形態では、幹細胞は、機能的ＴＧＦβ受容体タンパク質を発現せず、例えば、幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩタンパク質を発現しないか又は機能的ＴＧＦβＲＩＩタンパク質を発現しない。いくつかの実施形態では、幹細胞は、例えば、ＴＧＦβＲＩＩのドミナントネガティブ変異型など、ＴＧＦβシグナル伝達経路のタンパク質の作動薬のドミナントネガティブ変異型を発現する。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβシグナル伝達経路の拮抗薬を過剰発現する。いくつかの実施形態では、幹細胞はＴＧＦβＲＩＩを発現しない。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩを発現しないように遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩをコード化する遺伝子をノックアウトするように遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、幹細胞におけるＩＬ－１５シグナル伝達を増強する（例えば、維持又は増加させる）改変である。例えば、いくつかの実施形態では、改変は、ＩＬ－１５シグナル伝達の負の調節因子である、サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質（ＣＩＳＨ）などのＩＬ－１５シグナル伝達経路に作用するタンパク質をコード化する遺伝子の改変である。いくつかの実施形態では、改変は、ＩＬ－１５シグナル伝達経路に作用するタンパク質の機能喪失及び／又は発現喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、改変は、ＩＬ－１５シグナル伝達経路に作用するタンパク質のノックアウトをもたらす。いくつかの実施形態では、幹細胞は、機能的ＣＩＳＨ遺伝子を発現せず、例えば、幹細胞は、ＣＩＳＨタンパク質を発現しないか又は機能的ＣＩＳＨタンパク質を発現しない。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＣＩＳＨを発現しない。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＣＩＳＨを発現しないように遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＣＩＳＨ（すなわちＣＩＳＨ、サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質）をコード化する遺伝子をノックアウトするように遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩ又はＣＩＳＨを発現しない。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩ又はＣＩＳＨのそれぞれを発現しないように遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩをコード化する遺伝子とＣＩＳＨをコード化する遺伝子を同一細胞内でノックアウトするように遺伝子操作される（二重ＫＯ）。いくつかの実施形態では、幹細胞は、例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ編集又は他の適切な技術を介して、細胞のゲノム内において、例えばＴＧＦβＲＩＩタンパク質をコード化する遺伝子などの

ＴＧＦβシグナル伝達などのＴＧＦシグナル伝達に関与する遺伝子産物をコード化する遺伝子又は例えばゲノムＣＩＳタンパク質をコード化する遺伝子などのＩＬ－１５シグナル伝達を破壊するように編集されている。例えば、ＴＧＦシグナル伝達及び／又はＩＬ－１５シグナル伝達に関与する遺伝子産物をコード化する遺伝子の２つのコピー又は対立遺伝子が細胞内に存在するような、いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、遺伝子又は遺伝子によってコード化される機能的遺伝子産物の発現が、両方の対立遺伝子から破壊、減少又は消失するように、両方のコピー又は対立遺伝子が改変されるように、改変（例えば、編集）される。

【００６３】

いくつかの実施形態では、アクチビンは、アクチビンＡである。いくつかの実施形態では、培地は、ＴＧＦβを含まない。

【００６４】

いくつかの実施形態では、培養は、規定された期間（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２日又はそれを超える）にわたって実施される。いくつかの実施形態では、培養ステップ中又はその後の１つ又は複数の時点において、ヒト幹細胞は、万能性を維持する（例えば、万能性の１つ又は複数の測定値を示す）。いくつかの実施形態では、培養ステップ中又はその後の１つ又は複数の時点において、ヒト幹細胞は、検出可能なレベルの、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＴＲＡ－２－４９／６Ｅ、ＡＬＰ、Ｓｏｘ２、Ｅ－カドヘリン、ＵＴＦ－１、Ｏｃｔ４、Ｒｅｘ１及びＮａｎｏｇの１つ又は複数を発現する。いくつかの実施形態では、培養ステップ中又はその後の時点において、ヒト幹細胞は、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞に分化する能力を維持する。

【００６５】

別の態様では、本開示は、（ｉ）胚性幹細胞又は人工万能性幹細胞と、（ｉｉ）アクチビンを含む細胞培養培地とを含む細胞培養物であって、胚性幹細胞又は人工万能性幹細胞は、ＴＧＦβＲＩＩ及び／又はＣＩＳＨを発現しないように遺伝子操作される、細胞培養物を特徴とする。

【００６６】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃａｓ１２ａ変異型である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ａ変異型は、Ｍ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａから選択されるアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ａ変異型は、アミノ酸置換Ｍ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａを含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１２ａ変異型は、配列番号１１４８に記載のアミノ酸配列を含む。

【００６７】

本明細書に記載される本教示は、添付の図面と共に読まれた場合、様々な例示的な実施形態の以下の説明からより詳細に理解されるであろう。以下に説明する図面は、例証のみを目的とし、決して本教示の範囲を限定することを意図しないものと理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【００６８】

【図１】アクチビンＡ（１ｎｇ／ｍｌ又は４ｎｇ／ｍｌのＡｃｔＡ）の非存在下又は存在下において様々な培地中で培養された、ヒト人工万能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）の細胞形態の顕微鏡観察及び万能性マーカーのフローサイトメトリーを示す。

【図２】アクチビンＡ（１ｎｇ／ｍＬ、２ｎｇ／ｍＬ、４ｎｇ／ｍＬ又は１０ｎｇ／ｍＬ）添加又は無添加の培地中で培養された、ＴＧＦβＲＩＩノックアウトｈｉＰＳＣ（クローン７）又はＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｈｉＰＳＣ（クローン７）の形態を示す。

【図３】アクチビンＡ（１ｎｇ／ｍＬ、２ｎｇ／ｍＬ、４ｎｇ／ｍＬ又は１０ｎｇ／ｍＬ）含有又は非含有培地中で培養された、ＴＧＦβＲＩＩノックアウトｈｉＰＳＣ（クローン９）の形態を示す。

【図４Ａ】一重ノックアウト及び二重ノックアウトｈｉＰＳＣのＣＩＳＨ及びＴＧＦβＲＩＩ遺伝子座におけるバルク編集率を示す。
【図４Ｂ】アクチビンＡ中で培養されたＴＧＦβＲＩＩノックアウトｈｉＰＳＣ、ＣＩＳＨノックアウトｈｉＰＳＣ及び二重ノックアウトｈｉＰＳＣにおけるＯｃｔ４及びＳＳＥＡ４の発現を示す。
【図５】アクチビンＡ中で培養されたＴＧＦβＲＩＩノックアウトｈｉＰＳＣ、ＣＩＳＨノックアウトｈｉＰＳＣ、二重ノックアウトｈｉＰＳＣにおけるＮａｎｏｇ及びＴｒａ－１－６０の発現を示す。
【図６】ＳＴＥＭｄｉｆｆ（商標）Ｔｒｉｌｉｎｅａｇｅ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎキット（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．）に関する手順の概略図である。
【図７Ａ】アクチビンＡ中で培養されたＴＧＦβＲＩＩノックアウトｈｉＰＳＣｓ、ＣＩＳＨノックアウトｈｉＰＳＣｓ及び二重ノックアウトｈｉＰＳＣｓの分化マーカーの発現を示す。
【図７Ｂ】アクチビンＡ中で培養されたＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウトｈｉＰＳＣの核型を示す。
【図７Ｃ】未編集親ＰＳＣ株、編集ＴＧＦβＲＩＩ ＫＯクローン（Ｃ７）及びＲＵＣＤＲと称される追加的な代表的（未編集）細胞株上で実施された拡大アクチビンＡ濃度曲線を示す。各株の維持に必要なアクチビンＡの最小濃度は、わずかに変動し、ＴＧＦβＲＩＩ ＫＯクローンは、親対照と比較してより高いベースライン量のアクチビンＡを必要とした（０．５ｎｇ／ｍｌ対０．１ｎｇ／ｍｌ）。
【図７Ｄ】未編集親ＰＳＣ株、編集ＴＧＦβＲＩＩ ＫＯクローン（Ｃ７）及び未編集ＲＵＣＤＲ細胞株における、基礎培地単独（補足のアクチビンＡなし）で培養した場合の幹細胞性マーカーの発現を示す。ＴＧＦβＲＩＩ ＫＯ ｉＰＳＣは、幹細胞性マーカーの発現を維持しなかったが、２つの未編集株は、Ｅ８における幹細胞性マーカーの発現を維持できた。
【図８Ａ】編集ｉＰＳＣクローンを作製し、それに続いて、強化されたＣＤ５６＋ｉＮＫ細胞への分化及び特性評価を行うための例示的な方法を示す概略図である。
【図８Ｂ】分化プロセスの第２段階における、ＳＴＥＭＤｉｆｆ ＡＰＥＬ２を利用したｉＮＫ細胞分化プロセスの概略図である。
【図８Ｃ】分化プロセスの第２段階における、１５％の血清を含むＮＫ－ＭＡＣＳを利用したｉＮＫ細胞分化プロセスの概略図である。
【図８Ｄ】図８Ｃ及び図８Ｂにそれぞれ描かれているように、ＮＫ－ＭＡＣＳ法又はＡｐｅｌ２法を用いて分化させた場合の、分化３９日目における、未編集ＰＣＳ由来ｉＮＫ細胞の増殖倍数と、ＣＤ４５及びＣＤ５６を発現するｉＮＫ細胞の百分率とを示す。
【図８Ｅ】図８Ｃ及び図８Ｂにそれぞれ描かれているように、ＮＫ－ＭＡＣＳ法又はＡＰＥＬ２法を用いて分化させた場合の、未編集ＰＣＳ ｉＰＳＣ由来の分化ｉＮＫ細胞の表面発現表現型（集団の百分率として測定された）のヒートマップを上部パネルに示す。下側パネルは、２つの方法で作製されたｉＮＫの違いを示す代表的なヒストグラムプロットを表示する。
【図８Ｆ】図８Ｃ及び図８Ｂにそれぞれ描かれているように、ＮＫ－ＭＡＣＳ法又はＡＰＥＬ２法を用いて分化させた場合の、分化した編集ｉＮＫ（ＴＧＦβＲＩＩノックアウト、ＣＩＳＨノックアウト及び二重ノックアウト（ＤＫＯ））及び未編集親ｉＰＳＣ（ＷＴ）の表面発現表現型（集団の百分率として測定された）のヒートマップを示す。
【図８Ｇ】８Ｃ及び図８Ｂにそれぞれ描かれているように、ＮＫ－ＭＡＣＳ法又はＡＰＥＬ２法を用いて分化させた場合の未編集ｉＮＫ細胞エフェクター機能を示す。
【図９】親野生型クローンと比較した編集クローン（ＴＧＦβＲＩＩノックアウト、ＣＩＳＨノックアウト及び二重ノックアウト）の分化表現型を示す。
【図１０】親クローンｉＮＫ及び野性型細胞と比較した編集ｉＮＫ（ＴＧＦβＲＩＩノックアウト、ＣＩＳＨノックアウト及び二重ノックアウト）の表面発現表現型を示す。

【図１１Ａ】親クローンｉＮＫ（「ＷＴ」）及び末梢血由来ナチュラルキラー細胞と比較した編集ｉＮＫ（ＴＧＦβＲＩＩノックアウト、ＣＩＳＨノックアウト、二重ノックアウト）の表面発現表現型を示す。
【図１１Ｂ】親クローンｉＮＫ細胞（「未編集ｉＮＫ細胞」）と比較した編集ｉＮＫ細胞（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト）の表面発現表現型を示すフローサイトメトリーヒストグラムプロットである。
【図１１Ｃ】ｈｉＰＳＣ分化後２５日目、３２日目及び３９日目における、親クローンｉＮＫ細胞（「未編集ｉＮＫ細胞」）と比較した編集ｉＮＫ細胞（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨダ二重ノックアウト）の表面発現表現型（集団の百分率として測定された）を示す（少なくとも５つの別々の分化の平均値）。
【図１１Ｄ】ＩＬ－１５誘導活性化後１０分及び１２０分における、親クローンＣＤ５６＋ｉＮＫ細胞（「未編集ｉＮＫ」）と比較した編集ＣＤ５６＋ｉＮＫ細胞（「ＣＩＳＨ　ＫＯ　ｉＮＫ」）のｐＳＴＡＴ３発現表現型（集団の百分率として測定された）を示す。簡潔に述べると、３９日目又は４０日目のｉＮＫがサイトカイン飢餓状態で前日にプレーティングされる。翌日、細胞は、１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ１５で、示された時間にわたり刺激される。細胞は、その時点の終わりに即座に固定されてＣＤ５６で染色され、細胞内染色がそれに続いた。細胞は、ＮｏｖｏＣｙｔｅ　Ｑｕａｎｔｅｏｎで処理され、データは、ＦｌｏｗＪｏで解析された。示されているデータは、実施された３回を超える実験の代表的な実験である。
【図１１Ｅ】ＩＬ－１５及びＴＧＦ－β誘導活性化後１０分及び１２０分における、親クローンＣＤ５６＋ｉＮＫ細胞（「未編集ｉＮＫ細胞」）と比較した編集ＣＤ５６＋ｉＮＫ細胞（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト、「ＤＫＯ　ｉＮＫ」）のｐＳＭＡＤ２／３発現表現型（集団の百分率として測定された）を示す。簡潔に述べると、３９日目又は４０日目のｉＮＫがサイトカイン飢餓状態で前日にプレーティングされた。翌日細胞は、１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５と５０ｎｇ／ｍｌのＴＧＦ－βで、示された時間にわたり刺激された。細胞は、その時点の終わりに即座に固定されてＣＤ５６で染色され、細胞内染色がそれに続いた。細胞は、ＮｏｖｏＣｙｔｅ　Ｑｕａｎｔｅｏｎで処理され、データは、ＦｌｏｗＪｏで解析された。示されているデータは、実施された３回を超える実験の代表的な実験である。
【図１１Ｆ】ホルボールミリステート酢酸（ＰＭＡ）及びイオノマイシン（ＩＭＮ）刺激あり又はなしで、親クローンＣＤ５６＋ｉＮＫ細胞（未編集ｉＮＫ、「ＷＴ　ＩＦＮｇ」）と比較して、編集ＣＤ５６＋ｉＮＫ細胞（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト、「ＤＫＯ　ＩＦＮｇ」）のＩＦＮ－γ発現表現型（集団の百分率として測定された）を示す。データは、代表的なものである。これは、単一の分化から作成され、アッセイの各条件は、２つの技術的な複製で実行される。＊＊ｐ＜０．０５対未編集ｉＮＫ細胞（対応のあるＴ検定）。
【図１１Ｇ】ホルボールミリステート酢酸（ＰＭＡ）及びイオノマイシン（ＩＭＮ）刺激あり又はなしで、親クローンＣＤ５６＋ｉＮＫ細胞（未編集ｉＮＫ細胞、「ＷＴ　ＴＮＦα」）と比較して、編集ＣＤ５６＋ｉＮＫ細胞（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト、「ＤＫＯ　ＴＮＦα」）のＴＮＦ－α発現表現型（集団の百分率として測定された）を示す。データは、代表的なものである。これは、単一の分化から作成され、アッセイの各条件は、２つの技術的な複製で実行される。＊＊ｐ＜０．０５対未編集ｉＮＫ細胞（対応のあるＴ検定）。
【図１２Ａ】ＩＬ－１５及びＴＧＦ－βの存在下又は非存在下でＳＫ－ＯＶ－３卵巣細胞を殺滅するための編集ｉＮＫ細胞（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト）の使用を描いた、例示的な固体腫瘍細胞、殺滅アッセイの概略図である。
【図１２Ｂ】図１２Ａに記載されているような固形腫瘍殺滅アッセイの結果を示す。ｉＮＫ細胞は、腫瘍細胞の回転楕円サイズを縮小するように機能する。特定の編集ｉＮＫ細胞（ＣＩＳＨ一重ノックアウト「ＣＩＳＨ＿２、４、５及び８」）が親クローンｉＮＫ細胞（「ＷＴ＿２」）と有意に異なることはなかった一方、特定の編集ｉＮＫ細胞（ＴＧＦβ

ＲＩＩ一重ノックアウト、「ＴＧＦβＲＩＩ＿７」及びＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト「ＤＫＯ」）は、親クローンｉＮＫ細胞（「ＷＴ＿２」）と比較して、ＴＧＦ－βの存在下で測定した場合、エフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比が１以上の場合に有意に良好に機能した。＊＊＊＊ｐ＜０．０００１対未編集ｉＮＫ細胞（二元配置分散分析、シダックの多重比較検定）。

【図１２Ｃ】未編集ｉＮＫ細胞と比較した編集ｉＮＫ細胞エフェクター機能を示す。

【図１３】ｉＮＫ細胞が１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５及び１０ｎｇ／ｍｌのＴＧＦ－βの存在下において血液がん細胞（例えば、Ｎａｌｍ６細胞）で連続的にチャレンジされる、生体外連続殺滅アッセイの結果を示し；Ｘ軸は、時間を表し、腫瘍細胞が４８時間毎に追加される一方、Ｙ軸は、正規化された全赤色オブジェクト領域（例えば、腫瘍細胞の存在）によって測定された滅殺効果を表す。データは、編集ｉＮＫ細胞（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト）が血液がん細胞を殺滅し続ける一方、未編集ｉＮＫ細胞は、同等の時点でこの機能を失うことを示す。

【図１４】１ｎｇ／ｍＬ又は１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５の存在下で培養した場合の、ｈｉＰＳＣ分化後２５日目、３２日目及び３９日目における、親クローンｉＮＫ細胞（「ＷＴ」）と比較した、特定の編集ｉＮＫクローン細胞（ＣＩＳＨ一重ノックアウト「ＣＩＳＨ＿Ｃ２、Ｃ４、Ｃ５及びＣ８」、ＴＧＦβＲＩＩ一重ノックアウト「ＴＧＦβＲＩＩ－Ｃ７」及びＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト「ＤＫＯ－Ｃ１」）の表面発現表現型（集団の百分率として測定された）を示す。

【図１５Ａ】生体内腫瘍殺滅アッセイの概略図である。マウスは、1×10^{6}ＳＫＯＶ３－ｌｕｃ細胞を腹腔内接種され、マウスは、無作為化され、４日後に20×10^{6}ｉＮＫ細胞が腹腔内に導入された。マウスは、腫瘍移植後最大６０日間追跡された。Ｘ軸は、移植からの時間を表し、Ｙ軸は、全生物発光（ｐ／ｓ）によって測定された殺滅効率を表す。

【図１５Ｂ】図１５Ａに記載されているような生体内腫瘍殺滅アッセイの結果を示す。個々のマウスは、各水平線によって表される。データは、未編集ｉＮＫ細胞（「未編集ｉＮＫ」）とＤＫＯ編集ｉＮＫ細胞（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト）との両方がビヒクルよりも良好に腫瘍増殖を防ぎ、編集ｉＮＫ細胞が生体内でビヒクルよりも著しく良好に腫瘍細胞を殺滅することを示す。各実験群は、それぞれ９匹の動物を有した。＊＊ｐ＜０．００１、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１（二元配置分散分析による）。

【図１５Ｃ】図１５Ｂに記載されている生体内腫瘍殺滅アッセイの平均標準誤差を伴う平均化された結果を示す。マウスの個体数は、各水平線によって表される。データは、ＤＫＯ編集ｉＮＫ細胞（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト）が腫瘍増殖を防ぎ、生体内でビヒクル又は未編集ｉＮＫ細胞よりも著しく良好に腫瘍細胞を殺滅することを示す。＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１（二元配置分散分析による）。

【図１６Ａ】ｈｉＰＳＣ分化後２５日目、３２日目及び３９日目又は２８日目、３６日目及び３９日目における、親クローンｉＮＫ細胞（「ＰＣＳ＿ＷＴ」）と比較した、バルク編集ｉＮＫ細胞（左パネル：ＡＤＯＲＡ２Ａ一重ノックアウト）又は特定の編集ｉＮＫクローン細胞（右パネル：ＡＤＯＲＡ２Ａ一重ノックアウト）の表面発現表現型（集団の百分率として測定された）を示す。複数の分化からの代表的なデータ。

【図１６Ｂ】親クローンｉＮＫ細胞（「未編集ｉＮＫ」）と比較した、編集ｉＮＫクローン細胞（ＡＤＯＲＡ２Ａ一重ノックアウト）に対する５’－（Ｎ－エチルカルボキサミド）アデノシン（「ＮＥＣＡ」、アデノシン作動薬）活性化に続く、サイクリックＡＭＰ（ｃＡＭＰ）濃度表現型を示す。Ｙ軸は、ｎＭ（ＡＤＯＲＡ２Ａ活性化のプロキシ）単位での平均ｃＡＭＰ濃度を表し、Ｘ軸は、ｎＭ単位でのＮＥＣＡ濃度を表す。

【図１６Ｃ】ｉＮＫ細胞が１００μＭのＮＥＣＡ及び１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１５の存在下において血液がん細胞（例えば、Ｎａｌｍ６細胞）で連続的にチャレンジされる、生体外連続殺滅アッセイの結果を示し；Ｘ軸は、時間を表し、腫瘍細胞が４８時間毎に追加される一方、Ｙ軸は、全赤色オブジェクト領域（例えば、腫瘍細胞の存在）によって測定された滅殺効果を表す。データは、編集ｉＮＫ細胞（「ＡＤＯＲＡ２Ａ　ＫＯ　ｉＮＫ」）

が、アデノシン抑制を模倣する条件下で未編集ｉＮＫ細胞（「Ｃｔｒｌ　ｉＮＫ」）よりも効果的に血液がん細胞を殺滅することを示す。
【図１７Ａ】ｈｉＰＳＣ分化後２５日目、３２日目及び３９日目における、親クローンｉＮＫ細胞（「ＷＴ＿２」）と比較した、特定の編集ｉＮＫクローン細胞（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ／ＡＤＯＲＡ２Ａ三重ノックアウト、「ＣＲＡ＿６」及び「ＣＲ＋Ａ＿８」）の表面発現表現型（集団の百分率として測定された）を示す。データは、複数の分化の代表例である。
【図１７Ｂ】親クローンｉＮＫ細胞（「未編集ｉＮＫ」）と比較した、編集ｉＮＫクローン細胞（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ／ＡＤＯＲＡ２Ａ三重ノックアウト、「ＴＫＯ　ｉＮＫ」）のＮＥＣＡ（アデノシン作動薬）活性化に続く、サイクリックＡＭＰ（ｃＡＭＰ）濃度表現型を示す。Ｙ軸は、ｎＭ（ＡＤＯＲＡ２Ａ活性化のプロキシ）単位での平均ｃＡＭＰ濃度を表し、Ｘ軸は、ｎＭ単位でのＮＥＣＡ濃度を表す。
【図１７Ｃ】ＩＬ－１５なしでの、図１２Ａに記載されているような固形腫瘍殺滅アッセイの結果を示す。ｉＮＫ細胞は、腫瘍細胞の回転楕円サイズを縮小するように機能する。Ｙ軸は、統合された赤色オブジェクトの合計（例えば、腫瘍細胞の存在）を測定し、Ｘ軸は、エフェクターとターゲット（Ｅ：Ｔ）の細胞比を表す。編集ｉＮＫ細胞（ＡＤＯＲＡ２Ａ一重ノックアウト「ＡＤＯＲＡ２Ａ」、ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト「ＤＫＯ」又はＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ／ＡＤＯＲＡ２Ａ三重ノックアウト「ＴＫＯ」）は、親クローンｉＮＫ細胞（「対照」）と比較して、ＴＧＦ－βの存在下で測定した場合（少なくとも３回の別々の分化の平均値）より低いＥＣ５０率を有した。
【図１８】ｉＰＳ細胞における生体外編集を利用した、遺伝子座ＴＧＦβＲＩＩ、ＣＩＳＨ、ＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２ＡのガイドＲＮＡ選択アッセイの結果を示す。
【発明を実施するための形態】
【００６９】
本開示のいくつかの態様は、少なくとも部分的には、驚くべきことに、例えば胚性幹細胞又は人工万能性幹細胞などの幹細胞が、アクチビンＡを含む培養培地で培養され得、培養培地中のアクチビンの存在が例えばＴＧＦβなどのＴＧＦシグナル伝達作動薬の培養培地中の存在の要件を無効化するという認識に基づく。本開示のいくつかの態様は、驚くべきことに、培養培地中において、例えばＴＧＦβなどのＴＧＦβシグナル伝達作動薬が不在であっても、例えばヒト胚性幹細胞又はヒト人工万能性幹細胞などのヒト幹細胞をはじめとする幹細胞が、例えば、アクチビンＡなどのアクチビンを含む培地中で培養されたとき、それらの万能性を維持するという認識に関する。さらに、本開示は、驚くべきことに、ＴＧＦβＩＩＲを欠くｉＰＳＣ（例えば、遺伝子編集を介した遺伝的ノックアウト）がアクチビンを含む培養培地中で培養され得、このような細胞が、増殖するだけでなく、それらの万能性を維持するという認識に部分的に基づく。本開示は、胚性幹細胞と、アクチビン含む培地とを含む、細胞培養物並びにこのような幹細胞及び／又はその子孫を培養する方法をさらに包含する。
【００７０】
定義及び略語
特に明記されない限り、以下の各用語は、この項に記載されている意味を有する。
【００７１】
不定冠詞「１つの（ａ）」及び「１つの（ａｎ）」は、関連する名詞の少なくとも１つを指し、「少なくとも１つ」及び「１つ又は複数」という用語と互換的に使用される。接続詞「又は」及び「及び／又は」は、非排他的選言肢として同義的に使用される。
【００７２】
「がん」という用語（「過剰増殖性」及び「腫瘍性」という用語とも同義的に使用される）は、本明細書の用法では、自律的増殖能力、すなわち急速に増殖する細胞増殖を特徴とする異常な状態又は病状を有する細胞を指す。がん性の疾病状態は、病理学的なもの、すなわち例えば悪性腫瘍増殖などの病態を特徴付ける又は構成するものに分類され得るか

、又は非病理学的なもの、すなわち例えば創傷修復に伴う細胞増殖などの正常からの逸脱であるが病態とは関連しないものに分類され得る。用語には、組織病理学的タイプ又は侵襲段階にかかわりなく、全てのタイプのがん性増殖又は発がんプロセス、転移組織又は悪性に形質転換した細胞、組織又は臓器が含まれることが意図される。いくつかの実施形態では、「がん」としては、肺、乳房、甲状腺、リンパ系、胃腸及び生殖器尿路などの様々な器官系の悪性腫瘍又はそれに影響を与えるものが挙げられる。いくつかの実施形態では、「がん」としては、ほとんどの結腸がん、腎細胞がん、前立腺がん及び／又は精巣腫瘍、肺の非小細胞がん、小腸のがん及び／又は食道のがんなどの悪性腫瘍をはじめとする、腺がんが挙げられる。

【００７３】

本明細書の用法では、「がん腫」という用語は、呼吸器系がん腫、胃腸系がん腫、泌尿生殖器系がん腫、精巣がん腫、乳房がん腫、前立腺がん腫、内分泌系がん腫及び黒色腫をはじめとする、上皮又は内分泌組織の悪性腫瘍を指す。本明細書の用法では、がん腫という用語は、当技術分野で十分に認識されている。例示的ながん腫としては、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭頸部、結腸及び卵巣の組織から形成されるものが挙げられる。いくつかの実施形態では、がん腫には、例えば、がん性及び肉腫性組織からなる悪性腫瘍をはじめとするがん肉腫も含まれる。いくつかの実施形態では、「腺がん」は、腺組織に由来するがん腫であるか、又はその中で腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成するがん腫である。いくつかの実施形態では、「肉腫」は技術分野で認識されており、間葉由来の悪性腫瘍を指す。

【００７４】

「分化」という用語は、本明細書の用法では、特殊化されていないか（「分化増殖能未獲得」）又はあまり特殊化されていない細胞が例えば血球又は筋肉細胞などの特殊化細胞の特徴を獲得するプロセスである。いくつかの実施形態では、分化した又は分化誘導された細胞は、細胞の系統内でより特殊化された（「分化増殖能獲得」）地位についた細胞である。例えば、ｉＰＳＣは、細胞培養培地中で適切な分化因子で処理されると、例えば神経又は造血幹細胞、リンパ球、心筋細胞及び他の細胞型などの様々なより分化した細胞型に分化し得る。いくつかの実施形態では、万能性細胞型及び多能性細胞型をより分化した細胞型に分化させるための適切な方法、分化因子及び細胞培養培地は、当業者に周知である。いくつかの実施形態では、「分化増殖能獲得」という用語は、分化のプロセスに適用され、分化経路を通ってある点まで進行した細胞を指し、通常の状況下では、それは特定の細胞型又は細胞型のサブセットに分化するか又は分化し続け、通常の状況下では、それは異なる細胞型（特定の細胞型又は細胞型のサブセットを除く）に分化することも、より分化度の低い細胞型に戻ることもできない。

【００７５】

「分化マーカー」、「分化マーカー遺伝子」又は「分化遺伝子」という用語は、本明細書の用法では、その発現が、万能性細胞などの細胞内で起こっている細胞分化の指標である遺伝子又はタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、分化マーカー遺伝子としては、ＣＤ３４、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ４９、ＣＤ４５；ＮＫ細胞受容体（分化抗原群１６（ＣＤ１６））、ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）、ＣＤ６９、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＣＤ１５８ｂ、ＦＯＸＡ２、ＦＧＦ５、ＳＯＸ１７、ＸＩＳＴ、ＮＯＤＡＬ、ＣＯＬ３Ａ１、ＯＴＸ２、ＤＵＳＰ６、ＥＯＭＥＳ、ＮＲ２Ｆ２、ＮＲ０Ｂ１、ＣＸＣＲ４、ＣＹＰ２Ｂ６、ＧＡＴＡ３、ＧＡＴＡ４、ＥＲＢＢ４、ＧＡＴＡ６、ＨＯＸＣ６、ＩＮＨＡ、ＳＭＡＤ６、ＲＯＲＡ、ＮＩＰＢＬ、ＴＮＦＳＦ１１、ＣＤＨ１１、ＺＩＣ４、ＧＡＬ、ＳＯＸ３、ＰＩＴＸ２、ＡＰＯＡ２、ＣＸＣＬ５、ＣＥＲ１、ＦＯＸＱ１、ＭＬＬ５、ＤＰＰ１０、ＧＳＣ、ＰＣＤＨ１０、ＣＴＣＦＬ、ＰＣＤＨ２０、ＴＳＨＺ１、ＭＥＧＦ１０、ＭＹＣ、ＤＫＫ１、ＢＭＰ２、ＬＥＦＴＹ２、ＨＥＳ１、ＣＤＸ２、ＧＮＡＳ、ＥＧＲ１、ＣＯＬ３Ａ１、ＴＣＦ４、ＨＥＰＨ、ＫＤＲ、ＴＯＸ、ＦＯＸＡ１、ＬＣＫ、ＰＣＤＨ７、ＣＤ１ＤＦＯＸＧ１、ＬＥＦＴＹ１、ＴＵＪ１、Ｔ遺伝子（短尾）、ＺＩＣ１、ＧＡＴＡ１、ＧＡＴＡ

２、ＨＤＡＣ４、ＨＤＡＣ５、ＨＤＡＣ７、ＨＤＡＣ９、ＮＯＴＣＨ１、ＮＯＴＣＨ２、ＮＯＴＣＨ４、ＰＡＸ５、ＲＢＰＪ、ＲＵＮＸ１、ＳＴＡＴ１及びＳＴＡＴ３が挙げられるがこれらに限定されない。

【００７６】

「分化マーカー遺伝子プロファイル」又は「分化遺伝子プロファイル」、「分化遺伝子発現プロファイル」、「分化遺伝子発現シグネチャ」、「分化遺伝子発現パネル」、「分化遺伝子パネル」又は「分化遺伝子シグネチャ」という用語は、本明細書の用法では、複数の分化マーカー遺伝子の発現又は発現レベルを指す。

【００７７】

「編集ｉＮＫ細胞」という用語は、本明細書の用法では、細胞の発達のある時点で少なくとも１つの遺伝子の少なくとも１つの発現産物を変化させるように改変されたナチュラルキラー細胞を意味する。いくつかの実施形態では、改変は、例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓなどの遺伝子編集技術又は例えばドミナントネガティブコンストラクトを使用して導入され得る。いくつかの実施形態では、ｉＮＫ細胞は、それがｉＮＫ細胞に分化する前の時点、例えば前駆体段階、幹細胞段階などで編集される。いくつかの実施形態では、編集ｉＮＫ細胞は、未編集ｉＮＫ細胞（ｉＰＳＣ細胞を分化させることによって生成されたＮＫ細胞であり、ｉＰＳＣ細胞及び／又はｉＮＫ細胞は、例えば、遺伝子改変などの改変を有しない）と比較される。

【００７８】

「胚性幹細胞」という用語は、本明細書の用法では、胎芽胚盤胞の内細胞塊に由来する万能性幹細胞を指す。ある実施形態では、いくつかの実施形態では、胚性幹細胞は、万能性であり、発生過程で外胚葉、内胚葉及び中胚葉の３つの一次胚葉の全ての誘導体を生じさせる。いくつかのこのような実施形態では、胚性幹細胞は、胚外膜又は胎盤に寄与せず、すなわち全能性ではない。

【００７９】

核酸（例えば、遺伝子、タンパク質をコード化するゲノム領域、プロモーター）に関連して、本明細書で使用される「内在性」という用語は、例えば、細胞のゲノム内などのその自然な位置にある、天然の核酸又はタンパク質を指す。

【００８０】

例えば、発現コンストラクト、ｃＤＮＡ、インデル及び核酸ベクターのなどの核酸に関連して本明細書で使用される「外因性」という用語は、例えば、ＣＲＩＳＰＲベースの編集技術などの遺伝子編集又は遺伝子操作技術を用いて、細胞のゲノムに人為的に導入された核酸を指す。

【００８１】

「ゲノム編集システム」という用語は、ＲＮＡ誘導ＤＮＡ編集活性を有する任意のシステムを指す。

【００８２】

「ガイドＲＮＡ」及び「ｇＲＮＡ」という用語は、細胞内のゲノム又はエピソーム配列などの標的配列に対する、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）などのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの特定の結合（又は「標的化」）を促進する、任意の核酸を指す。

【００８３】

「造血幹細胞」又は「確定造血幹細胞」という用語は、本明細書の用法では、ＣＤ３４陽性幹細胞を指す。いくつかの実施形態では、ＣＤ３４陽性幹細胞は、成熟した骨髄系及び／又はリンパ系細胞型を生じさせることができる。いくつかの実施形態では、骨髄系及び／又はリンパ系細胞型としては、例えば、Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞及び／又はＢ細胞が挙げられる。

【００８４】

「人工万能性幹細胞」又は「ｉＰＳＣ」という用語は、本明細書の用法では、再プログラム化（例えば、脱分化）と称されるプロセスによって分化した体細胞（例えば、成人、新生児又は胎児）細胞から得られる幹細胞を指す。いくつかの実施形態では、再プログラ

ム化された細胞は、中胚葉、内胚葉及び外胚葉の３つの胚芽層又は皮層の全ての組織に分化できる。ｉＰＳＣは自然界では見られない。

【００８５】

「多能性幹細胞」という用語は、本明細書の用法では、１つ又は複数の胚葉（外胚葉、中胚葉及び内胚葉）細胞に分化する発生能を有するが、３つの胚葉全てに分化することはできない細胞を指す。したがって、いくつかの実施形態では、多能性細胞は、「部分的分化細胞」と称され得る。多能性細胞は、当技術分野で周知であり、多能性細胞の例としては、例えば、造血幹細胞及び神経幹細胞などの成体幹細胞が挙げられる。いくつかの実施形態では、「多能性」は、細胞が所与の系統で多くの種類の細胞を形成し得るが、他の系統の細胞は形成しなくてもよいことを示す。例えば、多能性造血細胞は、多くの異なる種類の血液細胞（赤、白、血小板など）を形成し得るが、神経細胞を形成することはできない。したがって、いくつかの実施形態では「多能性」という用語は、全能性及び万能性よりも低い発生能の程度を有する細胞の状態を指す。

【００８６】

「万能性」という用語は、本明細書の用法では、身体又は細胞体（すなわち適切な胚）又は所与の生物（例えば、ヒト）の全ての系統を形成する細胞の能力を指す。例えば、胚性幹細胞は、外胚葉、中胚葉及び内胚葉の３つの胚葉のそれぞれから細胞を形成できる、万能性幹細胞の一種である。一般に、万能性とは、完全な生物を生み出せない不完全又は部分的な万能性細胞（例えば、エピブラスト幹細胞又はＥｐｉＳＣ）から、完全な生物を生み出せるより原始的な万能性細胞（例えば、胚性幹細胞又は人工万能性幹細胞）に至る、連続した発生能力として記述され得る。

【００８７】

「万能性」という用語は、本明細書の用法では、３つの胚葉（外胚葉、中胚葉及び内胚葉）全ての細胞に分化する発生能を有する細胞を指す。いくつかの実施形態では、万能性は、細胞の万能性特性を評価することによってある程度判定され得る。いくつかの実施形態では、万能性の特徴としては、（ｉ）万能性幹細胞の形態；（ｉｉ）無制限の自己再生の可能性；（ｉｉｉ）ＳＳＥＡ１（マウスのみ）、ＳＳＥＡ３／４、ＳＳＥＡ５、ＴＲＡ１－６０／８１、ＴＲＡｌ－８５、ＴＲＡ２－５４、ＧＣＴＭ－２、ＴＧ３４３、ＴＧ３０、ＣＤ９、ＣＤ２９、ＣＤ１３３／ｐｒｏｍｉｎｉｎ、ＣＤ１４０ａ、ＣＤ５６、ＣＤ７３、ＣＤ９０、ＣＤ１０５、ＯＣＴ４、ＮＡＮＯＧ、ＳＯＸ２、ＣＤ３０及び／又はＣＤ５０をはじめとするが、これらに限定されない万能性幹細胞マーカーの発現；（ｉｖ）３つの体細胞系統（外胚葉、中胚葉、内胚葉）全てに分化する能力；（ｖ）３つの体細胞系統からなる奇形腫の形成；及び（ｖｉ）３つの体細胞系統からの細胞からなる胚様体の形成が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８８】

「万能性幹細胞形態」という用語は、本明細書の用法では、胚性幹細胞の古典的な形態学的特徴を指す。いくつかの実施形態では、正常な胚性幹細胞の形態は、高い核対細胞質比を有し、核小体が顕著に存在し、典型的な細胞間間隔を有する、小さくて丸い形状として特徴付けられる。

【００８９】

（「ヌクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」及び「オリゴヌクレオチド」を含むが、これらに限定されない）「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書の用法では、ＤＮＡ及びＲＮＡ中の一連のヌクレオチド塩基（「ヌクレオチド」とも称される）を指し、２つ以上のヌクレオチドの任意の鎖を意味する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド、ヌクレオチド配列、核酸などは、一本鎖又は二本鎖のキメラ混合物又はそれらの誘導体又は修飾バージョンであり得る。いくつかのこのような実施形態では、修飾は、塩基部分、糖部分又はリン酸骨格で起こり、例えば分子の安定性、そのハイブリッド形成パラメータなどが改善され得る。一般に、ヌクレオチド配列は、典型的には、タンパク質及び酵素を産生するために細胞機構によって使用される情報を含むが、これらに限定されない遺伝情報を保有する。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列及び

／又は遺伝情報は、二本鎖又は一本鎖のゲノムＤＮＡ、ＲＮＡ、任意の合成及び遺伝子操作されたポリヌクレオチド及び／又はセンス及び／又はアンチセンスポリヌクレオチドから構成される。いくつかの実施形態では、修飾塩基を含有する核酸である。

【００９０】

下記の表１に示されるように、慣用的なＩＵＰＡＣ表記法は、本明細書で提示されるヌクレオチド配列において使用される（参照により本明細書に援用されるＣｏｒｎｉｓｈ－Ｂｏｗｄｅｎ Ａ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９８５ Ｍａｙ １０；１３（９）：３０２１－３０も参照されたい）。しかし、配列がＤＮＡ又はＲＮＡのいずれかによって例えばｇＲＮＡ標的化ドメインにおいてコードされ得る場合、「Ｔ」は、「チミン又はウラシル」を示すことに留意すべきである。

【００９１】

【表１】

表 1: IUPAC 核酸表記法

文字	塩基
A	アデニン
T	チミン又はウラシル
G	グアニン
C	シトシン
U	ウラシル
K	G 又は T/U
M	A 又は C
R	A 又は G
Y	C 又は T/U
S	C 又は G
W	A 又は T/U
B	C、G 又は T/U
V	A、C 又は G
H	A、C 又は T/U
D	A、G 又は T/U
N	A、C、G 又は T/U

【００９２】

「能力」又は「発生能」という用語は、本明細書の用法では、特に例えば細胞発生能に関連して、細胞がアクセス可能な全ての発生的選択肢（すなわち発生能）の合計を指す。いくつかの実施形態では、細胞発生能の連続体としては、全能性細胞、万能性細胞、多能性細胞、少能性細胞、単能性細胞及び最終分化細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【００９３】

「予防する」、「予防すること」及び「予防」という用語は、本明細書の用法では、（ａ）疾患を回避又は排除すること；（ｂ）疾病に対する素因に影響を及ぼすこと；又は（

ｃ）疾病の少なくとも１つの症状の発症を予防又は遅延させることをはじめとする、例えばヒトなどの哺乳類における疾患の予防を指す。

【００９４】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」、「ペプチド」及び「ポリペプチド」という用語は、同義的に使用され、ペプチド結合を介して共に連結するアミノ酸の連続鎖を指す。この用語は、個々のタンパク質、共に結合するタンパク質の群又は複合体並びにそのようなタンパク質の断片又は部分、変異型、誘導体及び類似体を含む。別段の指定がない限り、ペプチド配列は、左側のアミノ又はＮ末端から開始して、右側のカルボキシル又はＣ末端に進む、慣用的な表記法を用いて本明細書に提示される。標準的な一文字又は三文字略語が使用され得る。

【００９５】

「再プログラム化」又は「脱分化」又は「細胞発生能を増加させる」又は「発生能を増加させる」という用語は、本明細書の用法では、細胞の発生能を増加させるか、又は細胞をより分化度の低い状態に脱分化させる方法を指す。例えば、いくつかの実施形態では、細胞分化能が増加した細胞は、再プログラム化されていない状態の同じ細胞と比較してより多くの発達可塑性を有する（すなわちより多くの細胞型に分化し得る）。すなわち、いくつかの実施形態では、再プログラム化された細胞は、再プログラム化されていない状態の同じ細胞よりも分化度の低い状態にある。いくつかの実施形態では、「再プログラム化」は、体細胞又は多能性幹細胞を人工万能性幹細胞又はｉＰＳＣとも称される万能性幹細胞に脱分化させることを指す。体細胞又は多能性幹細胞からｉＰＳＣを作製するための適切な方法は、当業者に周知である。

【００９６】

「ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ」及び「ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ分子」という用語は、本明細書では同義的に使用される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導ＤＮＡエンドヌクレアーゼ酵素である。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼはＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼである。ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの非限定的例は下の表２に列挙され、本明細書で開示される方法及び組成物は、本明細書で開示されているか又は当業者に知られている、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの任意の組み合わせを使用し得る。当業者は、本開示に関連した使用に適した追加的なヌクレアーゼ及びヌクレアーゼ変異型を承知しており、本開示は、この点において限定されないことが理解されるであろう。

【００９７】

【表２】

表 2. RNA 誘導ヌクレアーゼ

ヌクレアーゼ	長さ (a.a.)	PAM	参考文献
SpCas9	1368	NGG	Cong *et al.*, Science. 2013;339(6121):819-23
SaCas9	1053	NNGRRT	Ran *et al.*, Nature. 2015;520(7546):186-91.
(KKH) SaCas9	1067	NNNRRT	Kleinstiver *et al.*, Nat Biotechnol. 2015;33(12):1293-1298
AsCpf1 (AsCas12a)	1353	TTTV	Zetsche *et al.*, Nat Biotechnol. 2017;35(1):31-34.
LbCpf1 (LbCas12a)	1274	TTTV	Zetsche *et al.*, Cell. 2015;163(3):759-71.
CasX	980	TTC	Burstein *et al.*, Nature. 2017;542(7640):237-241.
CasY	1200	TA	Burstein *et al.*, Nature. 2017;542(7640):237-241.
Cas12h1	870	RTR	Yan *et al.*, Science. 2019;363(6422):88-91.
Cas12i1	1093	TTN	Yan *et al.*, Science. 2019;363(6422):88-91.

【００９８】

【表３】

Cas12c1	不明	TG	Yan *et al.*, Science. 2019;363(6422):88-91.
Cas12c2	不明	TN	Yan *et al.*, Science. 2019;363(6422):88-91.
eSpCas9	1423	NGG	Chen *et al.*, Nature. 2017;550(7676):407-410.
Cas9-HF1	1367	NGG	Chen *et al.*, Nature. 2017;550(7676):407-410.
HypaCas9	1404	NGG	Chen *et al.*, Nature. 2017;550(7676):407-410.
dCas9-FokI	1623	NGG	米国特許第9,322,037号明細書
Sniper-Cas9	1389	NGG	Lee *et al.*, Nat Commun. 2018;9(1):3048.
xCas9	1786	NGG, NG, GAA, GAT	Wang *et al.*, Plant Biotechnol J. 2018; pbi.13053.
AaCas12b	1129	TTN	Teng *et al.* Cell Discov. 2018;4:63.
evoCas9	1423	NGG	Casini *et al.*, Nat Biotechnol. 2018;36(3):265-271.
SpCas9-NG	1423	NG	Nishimasu *et al.*, Science. 2018;361(6408):1259-1262.
VRQR	1368	NGA	Li *et al.*, The CRISPR Journal, 2018; 01:01
VRER	1372	NGCG	Kleinstiver *et al.*, Nature. 2016;529(7587):490-5.
NmeCas9	1082	NNNNGATT	Amrani *et al.*, Genome Biol. 2018;19(1):214.
CjCas9	984	NNNNRYAC	Kim *et al.*, Nat Commun. 2017;8:14500.
BhCas12b	1108	ATTN	Strecker *et al.*, Nat Commun. 2019 Jan 22;10(1):212.
BhCas12b V4	1108	ATTN	Strecker *et al.*, Nat Commun. 2019 Jan 22;10(1):212.
CasΦ	700-800	TBN（B はG、T、又はC である）	Pausch *et al.*, Science 2020;369(6501):333-337.

【００９９】

例えば、Ｃａｓ９及びＣａｓ１２ヌクレアーゼなどの追加的な適切なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、本開示に鑑みて当業者に明らかであり、本開示は、本明細書で提供される例示的な適切なヌクレアーゼによって限定されない。いくつかの実施形態では、適切なヌクレアーゼは、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、本開示は、例えば、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１ヌクレアーゼ変異型などのヌクレアーゼ変異型も包含する。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ変異型であり、これはヌクレアーゼの野生型アミノ酸配列と比較して、１つ又は複数のアミノ酸置換、欠失又は付加によって特徴付けられるアミノ酸配列を含む、ヌクレアーゼを指す。いくつかの実施形態では、適切なヌクレアーゼ及び／又はヌクレアーゼ変異型は、精製タグ（例えば、ポリヒスチジンタグ）及び／又は例えば、核局在化シグナル配列を含むか又はそれからなるシグナル伝達ペプチドも含み得る。適切なヌクレアーゼ及びヌクレアーゼ変異型のいくつかの非限定的例は、本明細書の他の箇所でより詳細に記載されており、ま

たその内容全体が参照により本明細書に援用される、２０１９年３月１４日に出願された「Ｓｙｓｔｅｍｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅｍｏｇｌｏｂｉｎｏｐａｔｈｉｅｓ」という名称のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１９／２２３７４号明細書に記載されているものも含まれる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、アシダミノコッカス属（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）種Ｃｐｆ１変異型（ＡｓＣｐｆ１変異型）である。いくつかの実施形態では、適切なＡｓＣｐｆ１変異型をはじめとする適切なＣｐｆ１ヌクレアーゼ変異型は、本開示に基づいて当業者に知られているか又は明らかであり、本明細書で開示されているか又はさもなければ当技術分野で公知のＣｐｆ１変異型を含むが、これらに限定されない。例えば、いくつかの実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、アシダミノコッカス属（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）種Ｃｐｆ１ＲＲ変異型（ＡｓＣｐｆ１－ＲＲ）である。別の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１　ＲＶＲ変異型である。例えば、適切なＣｐｆ１変異型としては、Ｍ５３７Ｒ置換、Ｈ８００Ａ置換及び／又はＦ８７０Ｌ置換又はそれらの任意の組み合わせを有するものが挙げられる（番号付けスキームはＡｓＣｐｆ１野生型配列に準拠する）。

【０１００】

「対象」という用語は、本明細書の用法では、ヒト又は非ヒト動物を意味する。いくつかの実施形態では、ヒト対象は任意の年齢（例えば、胎児、乳児、小児、若年成人又は成人）であり得る。いくつかの実施形態では、ヒト対象は、疾患のリスクがあるか、又は疾患に苦しんでいるか、又は遺伝子又は特定の遺伝子の組み合わせの改変を必要とし得る。代わりに、いくつかの実施形態では、対象は、哺乳類を含み得るが、これらに限定されない非ヒト動物であり得る。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、非ヒト霊長類、齧歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなど）、ウサギ、イヌ、ネコなどである。本開示の特定の実施形態では、非ヒト動物対象は、例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギなどの家畜である。特定の実施形態では，非ヒト動物対象は、例えば、ニワトリ、七面鳥、アヒルなどの家禽である。

【０１０１】

「治療」、「治療する」及び「治療すること」という用語は、本明細書の用法では、疾患、障害若しくは病状又はその１つ以上の症状の逆転、緩和、発症の遅延又は進行の抑制、改善、重症度の軽減、再発の防止又は遅延及び／又は本明細書に記載されているような疾患、障害又は病状の１つ又は複数の症状の改善を目指した臨床的介入を指す。いくつかの実施形態では、病状は傷害を含む。いくつかの実施形態では、傷害は急性又は慢性であり得る（例えば、組織傷害などの二次的損傷を引き起こす、基礎疾患又は障害による組織損傷）。いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載されているような改変ＮＫ細胞又は改変ＮＫ細胞集団の形態での治療は、１つ又は複数の症状が発現した後及び／又は疾患が診断された後に対象に投与され得る。治療は、例えば、症状の発症を予防又は遅延するため又は疾患の発症又は進行を抑制するために、症状の非存在下で投与され得る。例えば、いくつかの実施形態では、治療は、症状の発症前に（例えば、遺伝的又は他の感受性因子に照らして）感受性のある個人に投与され得る。いくつかの実施形態では、治療は、症状が解消した後にも継続されて、例えば再発が予防又は遅延され得る。いくつかの実施形態では、治療は、疾患、障害又は病状の１つ又は複数の症状の改善及び／又は消散をもたらす。

【０１０２】

「変異型」とは、本明細書の用法では、参照実体との著しい構造的同一性を示すが、参照実体と比較して、１つ又は複数の化学部分の存在又はレベルが参照実体と構造的に異なる、ポリペプチド、ポリヌクレオチド又は小分子などの実体を指す。多くの実施形態では、変異型は、その参照実体と機能的にも異なる。一般に、特定の実体が参照実体の「変異型」であると適切に見なされるかどうかは、その参照実体との構造的同一性の程度に基づく。

【０１０３】

幹細胞
本開示の方法は、幹細胞を培養するために使用され得る。幹細胞は典型的には、未改変の娘細胞を生成する能力（自己再生；細胞分裂は親細胞と同一である少なくとも１つの娘細胞を生成する）を有し、特殊な細胞型を生じる細胞である（発生能）。幹細胞としては、胚性幹（ＥＳ）細胞、胚性生殖（ＥＧ）細胞、生殖細胞系幹（ＧＳ）細胞、ヒト間葉系幹細胞（ｈＭＳＣ）、脂肪組織由来幹細胞（ＡＤＳＣ）、多能性成体前駆細胞（ＭＡＰＣ）、多能性成体生殖系列幹細胞（ｍａＧＳＣ）及び非制限体細胞幹細胞（ＵＳＳＣ）が挙げられるが、これらに限定されない。一般に、幹細胞は無制限に分裂し得る。分裂後、幹細胞は幹細胞のままであるか、前駆細胞になるか又は最終分化に進行し得る。前駆細胞は、少なくとも１つの所与の細胞型の完全に分化した機能的細胞を生成し得る細胞である。一般に、前駆細胞は分裂し得る。分裂後、前駆細胞は、前駆細胞のままであるか又は最終分化に進行し得る。
【０１０４】
万能性幹細胞は、当技術分野で一般に公知である。本開示は、万能性幹細胞に関連する技術（例えば、システム、組成物、方法など）を提供する。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞は、（ａ）免疫不全（ＳＣＩＤ）マウスに移植すると奇形腫を誘発でき；（ｂ）３つの胚葉全ての細胞型に分化でき（例えば、外胚葉、中胚葉及び内胚葉の細胞型に分化し得る）；及び／又は（ｃ）胚性幹細胞の１つ又は複数のマーカーを発現する（例えば、ヒト胚性幹細胞は、Ｏｃｔ４、アルカリホスファターゼ、ＳＳＥＡ－３表面抗原，ＳＳＥＡ－４表面抗原、ｎａｎｏｇ、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＳＯＸ２、ＲＥＸ１などを発現する）、幹細胞である。いくつかの態様では、ヒト万能性幹細胞は、分化マーカーの発現を示さない。いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して培養されたＥＳ細胞及び／又はｉＰＳＣは、それらの万能性を維持する（例えば、（ａ）免疫不全（ＳＣＩＤ）マウスに移植すると奇形腫を誘発でき；（ｂ）３つの胚葉全ての細胞型に分化でき（例えば、外胚葉、中胚葉及び内胚葉の細胞型に分化し得る）；及び／又は（ｃ）胚性幹細胞の１つ又は複数のマーカーを発現する）。
【０１０５】
いくつかの実施形態では、ＥＳ細胞（例えば、ヒトＥＳ細胞）は、胚盤胞又は桑実胚の内細胞塊に由来し得る。いくつかの実施形態では、ＥＳ細胞は、例えば、胚の残りの部分を破壊することなく、胚の１つ又は複数の割球から単離され得る。いくつかの実施形態では、ＥＳ細胞は、体細胞核移植によって生成され得る。いくつかの実施形態では、ＥＳ細胞は、精子又はＤＮＡを用いた卵細胞の受精、核移植、単為発生に由来し得るか、又は例えばＨＬＡ領域における同型接合性を有するＥＳ細胞を作製する手段によって誘導され得る。いくつかの実施形態では、ヒトＥＳ細胞は、精子と卵細胞の融合、核移植、単為生殖又はクロマチンの再プログラム化とそれに続く再プログラム化されたクロマチンの原形質膜への組み込みによって生成された、接合体、割球又は胚盤胞期哺乳類胚から生成又は誘導されて、胚性細胞を生成し得る。例示的なヒトＥＳ細胞は、当技術分野で公知であり、ＭＡＯ１、ＭＡＯ９、ＡＣＴ－４、Ｎｏ．３、Ｈ１、Ｈ７、Ｈ９、Ｈ１４及びＡＣＴ３０ＥＳ細胞が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ヒトＥＳ細胞は、それらの供給源又はそれらを生成するために使用される特定の方法に関係なく、例えば（ｉ）３つの胚葉全ての細胞に分化する能力、（ｉｉ）少なくともＯｃｔ－４及びアルカリホスファターゼの発現、及び／又は（ｉｉｉ）免疫不全の動物に移植された場合に奇形腫を生成する能力に基づいて同定され得る。いくつかの実施形態では、ＥＳ細胞は、細胞株として連続的に継代された。
【０１０６】
ｉＰＳＣ
人工万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）は、特定遺伝子の発現を誘導することにより、成人の体細胞（例えば、線維芽細胞又は他の適切な体細胞）などの非万能性細胞から人工的に誘導された、万能性幹細胞の一種である。ｉＰＳＣは、哺乳類などの任意の生物に由来し得る。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヤギ、

ブタ、ウシ、非ヒト霊長類又はヒトから生成される。ｉＰＳＣは、特定の幹細胞遺伝子及びタンパク質の発現、クロマチンメチル化パターン、倍加時間、胚様体形成、奇形腫形成、生存キメラ形成、発生能及び／又は分化能などの多くの点でＥＳ細胞に類似している。ｉＰＳＣを生成するための様々な適切な方法は、当技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは、特定の幹細胞関連遺伝子（Ｏｃｔ－３／４（Ｐｏｕｆ５１）及びＳｏｘ２など）の、成体線維芽細胞などの非万能性細胞への形質移入によって誘導され得る。形質移入は、レトロウイルス、レンチウイルス又はアデノウイルスなどのウイルスベクターを通じて達成され得る。追加的な適切な再プログラム化方法としては、例えば、エピソームベクターなどの宿主細胞のゲノムに組み込まれないベクターの使用が挙げられるか、又は再プログラム化因子を、コード化ＲＮＡを介して若しくはタンパク質として直接送達することも報告されている。例えば、細胞は、レトロウイルスシステムを使用してＯｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４及び／若しくはｃ－Ｍｙｃを用いて、又はレンチウイルスシステムを使用してＯＣＴ４、ＳＯＸ２、ＮＡＮＯＧ及び／若しくはＬＩＮ２８を用いて形質移入され得る。３～４週間後、少数の形質移入細胞が、万能性幹細胞と形態学的及び生化学的に類似し始め、形態学的選択、倍加時間又はレポーター遺伝子と抗生物質の選択を通じて単離され得る。一例では、成人ヒト細胞からのｉＰＳＣは、Ｙｕ ｅｔ ａｌ．（Ｓｃｉｅｎｃｅ ３１８（５８５４）：１２２４（２００７））又はＴａｋａｈａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．（Ｃｅｌｌ １３１：８６１－７２（２００７））によって記述された方法によって作製される。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは、商業的供給源によって作製される。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは供給業者によって作製される。いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣは受託研究機関によって作製される。再プログラム化のための多数の適切な方法が当業者に知られており、本開示は、この点において限定されない。

【０１０７】

遺伝子操作された幹細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞（例えば、ｉＰＳＣ）は、本明細書に記載の１つ又は複数の標的に破壊を導入するように遺伝子操作される。例えば、いくつかの実施形態では、幹細胞（例えば、ｉＰＳＣ）は、１つ又は複数の標的遺伝子の全部又は一部をノックアウトし、１つ又は複数の標的遺伝子にフレームシフトを導入し、且つ／又は（例えば、早発停止コドンを導入することによって）コード化遺伝子産物のトランケーションを誘発するように遺伝子操作され得る。いくつかの実施形態では、幹細胞（例えば、ｉＰＳＣ）は、例えば、本明細書に記載されているように、遺伝子編集システムを用いて、標的遺伝子の全部又は一部をノックアウトするように遺伝子操作され得る。いくつかのこのような実施形態では、遺伝子編集システムは、ＣＲＩＳＰＲシステム、ジンクフィンガーヌクレアーゼシステム、ＴＡＬＥＮ及び／又はメガヌクレアーゼであるか又はそれらを含み得る。

【０１０８】

ＴＧＦシグナル伝達

特定の実施形態では、本開示は、例えば、ＴＧＦβシグナル伝達などのＴＧＦシグナル伝達中に破壊を含む、遺伝子操作された幹細胞及び／又は子孫細胞を提供する。これは、例えば、万能性幹細胞から分化した細胞を作製することが望ましい状況において有用であり、ここで、例えば、ＴＧＦβシグナル伝達などのＴＧＦシグナル伝達は、分化した細胞中で破壊される。

【０１０９】

例えば、ＴＧＦβシグナル伝達は、治療用途に有用ないくつかの分化細胞型の生存及び／又は活性を阻害し又は低下させ、例えば、ＴＧＦβシグナル伝達は、ナチュラルキラー細胞の負の調節因子であり、免疫療法の用途に使用され得る。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβシグナル伝達を破壊する遺伝子改変を含む臨床的に有効な数のナチュラルキラー細胞を作製し、したがってこのような細胞の臨床的有効性に対するＴＧＦβの負の効果を回避することが望ましい。いくつかの実施形態では、このようなＮＫ細胞を、例えば、ド

ナーから得られた成熟ＮＫ細胞から調達する代わりに、万能性幹細胞から調達することが有利である。分化細胞の代わりに幹細胞を改変することは、とりわけ、例えば特定の遺伝子改変（例えば、望ましくない（例えば、オフターゲット）改変の不在下における、ＴＧＦβＲＩＩの標的化破壊）を保有する特定の幹細胞クローンなどの特定の遺伝子型のクローンの誘導、特性評価及び／又は増殖を可能にする利点を有する。いくつかの実施形態では、例えば、ヒトｉＰＳＣなどの幹細胞は、例えば、ＴＧＦβＲＩＩなどの１つ又は複数のＴＧＦβ受容体を発現しないように、又は例えばドミナントネガティブＴＧＦβＲＩＩ変異型などのＴＧＦβ受容体のドミナントネガティブ変異型を発現するように遺伝子操作される。ＴＧＦβＲＩＩの例示的な配列は、ＫＲ７１０９２３．１、ＮＭ＿００１０２４８４７．２及びＮＭ＿００３２４２．５に記載されている。例示的なドミナントネガティブＴＧＦβＲＩＩは、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．２０００　Ｆｅｂ；１２（２）：１７１－８１で開示されている。

【０１１０】

追加的な機能喪失改変

特定の実施形態では、本開示は、追加的又は代替的に、例えばＩＬ－１５シグナル伝達などのインターロイキンシグナル伝達の破壊を含む遺伝子操作された幹細胞及び／又は子孫細胞を提供する。ＩＬ－１５は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）と構造的に類似したサイトカインであり、これは、ＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体β鎖（ＣＤ１２２）と共通γ鎖（γ－Ｃ、ＣＤ１３２）から構成される複合体に結合し、それを介してシグナルを伝達する。ＩＬ－１５の例示的な配列は、ＮＧ＿０２９６０５．２に提供されている。ＩＬ－１５シグナル伝達の破壊は、例えば、万能性幹細胞から分化細胞を作製することが望ましいが、分化細胞中で特定のシグナル伝達経路（例えば、ＩＬ－１５）が破壊されている状況において有用であり得る。ＩＬ－１５シグナル伝達は、治療用途に有用であり得る細胞など、一部の分化細胞型の生存及び／又は活性を阻害又は低減し得る。例えば、ＩＬ－１５シグナル伝達はナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の負の調節因子である。ＣＩＳＨ（ＣＩＳＨ遺伝子によってコード化される）はＩＬ－１５受容体の下流にあり、ＮＫ細胞におけるＩＬ－１５シグナル伝達の負の調節因子として作用し得る。本明細書の用法では、「ＣＩＳＨ」という用語は、サイトカイン誘導性ＳＨ２含有タンパク質を指す（例えば、Ｄｅｌｃｏｎｔｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１６　Ｊｕｌ；１７（７）：８１６－２４を参照されたい；ＣＩＳＨの例示的な配列は、ＮＧ＿０２３１９４．１として記載されている）。いくつかの実施形態では、ＣＩＳＨ調節の破壊は、Ｊａｋ／ＳＴＡＴ経路の活性化を増加させ、ＮＫ細胞の生存、増殖及び／又はエフェクター機能の増加をもたらし得る。したがって、いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたＮＫ細胞（例えば、ｉＮＫ細胞、例えばＣＩＳＨ調節の破壊を含む遺伝子操作されたｈｉＰＳＣから作製された）は、遺伝子操作されていないＮＫ細胞よりもＩＬ－１５媒介シグナル伝達に対してより高い応答性を示す。いくつかのこのような実施形態では、遺伝子操作されたＮＫ細胞は、遺伝子操作されていないＮＫ細胞と比較してより大きいエフェクター機能を示す。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された幹細胞及び／又は子孫細胞は、追加的又は代替的に、Ｂ２Ｍ、ＮＫＧ２Ａ、ＰＤ１、ＴＩＧＩＴ、ＡＤＯＲＡ２ａ、ＣＩＩＴＡ、ＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子、ＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子、ＣＤ３２Ｂ又はＴＲＡＣの１つ又は複数における、機能の破壊及び／又は喪失を含む。

【０１１２】

本明細書の用法では、「Ｂ２Ｍ」（β２ミクログロブリン）という用語は、ほぼ全ての有核細胞の表面上にある主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩの重鎖に関連して見られる、血清タンパク質を指す。Ｂ２Ｍの例示的な配列は、ＮＧ＿０１２９２０．２として記載されている。

【０１１３】

本明細書の用法では、「ＮＫＧ２Ａ」（ナチュラルキラーグループ２Ａ）という用語は

、ＮＫ細胞で優先的に発現される膜貫通タンパク質のグループである、ＮＫＧ２ファミリーとも称されるキラー細胞レクチン様受容体ファミリーに属するタンパク質を指す。このタンパク質ファミリーは、ＩＩ型の膜配向とＣ型レクチンドメインの存在によって特徴付けられる。例えば、Ｋａｍｉｙａ－Ｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ２０１９ ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１７２／ＪＣＩ１２３９５５を参照されたい。ＮＫＧ２Ａの例示的な配列は、ＡＦ４６１８１２．１として記載されている。

【０１１４】

本明細書の用法では、ＣＤ２７９（分化抗原群２７９）しても知られる「ＰＤ１」（プログラム細胞死タンパク質１）という用語は、細胞の表面上に見られるタンパク質を指し、これは、免疫系を下方制御することによって人体の細胞に対する免疫系の応答を調節し、Ｔ細胞の炎症活性を抑制することによって自己寛容を促進する役割を有する。ＰＤ１は免疫チェックポイントであり、自己免疫を防ぐ。ＰＤ１の例示的な配列は、ＮＭ＿００５０１８．３として記載されている。

【０１１５】

「ＴＩＧＩＴ」（Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体）という用語は、本明細書の用法では、免疫グロブリンタンパク質のＰＶＲ（ポリオウイルス受容体）ファミリーのメンバーを指す。この遺伝子の産物は、濾胞Ｂヘルパー Ｔ細胞（ＴＦＨ）をはじめとするいくつかのクラスのＴ細胞上で発現される。ＴＩＧＩＴの例示的な配列は、ＮＭ＿１７３７９９．４に記載されている。

【０１１６】

本明細書の用法では、「ＡＤＯＲＡ２Ａ」という用語は、クラス及びサブタイプに細分化されるグアニンヌクレオチド結合タンパク質（Ｇタンパク質）共役型受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーのメンバーである、アデノシンＡ２ａ受容体を指す。Ａ２Ａサブタイプのアデノシン受容体であるこのタンパク質は、好ましい内在性作動薬としてアデノシンを使用し、Ｇタンパク質のＧ（ｓ）及びＧ（ｏｌｆ）ファミリーと優先的に相互作用して細胞内ｃＡＭＰレベルを増加させる。ＡＤＯＲＡ２ａの例示的な配列は、ＮＧ＿０５２８０４．１に提供されている。

【０１１７】

本明細書の用法では、「ＣＩＩＴＡ」という用語は、クラスＩＩ主要組織適合遺伝子複合体遺伝子転写の正の調節因子の役割を果たす、核内に位置するタンパク質を指し、これらの遺伝子の発現の「マスター制御因子」と称される。タンパク質はＧＴＰにも結合し、ＧＴＰ結合を使用して、核内への自身の輸送を容易にする。この遺伝子の変異は、裸リンパ球症候群ＩＩ型（遺伝性ＭＨＣクラスＩＩ欠損症又はＨＬＡクラスＩＩ欠損複合免疫不全症としても知られている）、関節リウマチ、多発性硬化症及び場合により心筋梗塞に対する感受性増加に関連付けられている。例えば、そのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される、Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １８０：１３６７－１３７４；及びＣｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．１９９６ Ｆｅｂ；４（２）：１６７－７８を参照されたい。ＣＩＩＴＡの例示的な配列は、ＮＧ＿００９６２８．１として記載されている。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子及び／又は２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子は、例えば、ノックアウトされるなどして、例えばゲノム編集によって破壊される。例えば、いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、ＨＬＡ－ＤＭＡ、ＨＬＡ－ＤＱＡ２及びＨＬＡ－ＤＯＡから選択される２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原α鎖遺伝子は、例えば、ノックアウトされるなどして破壊される。別の例として、いくつかの実施形態では、ＨＬＡ－ＤＭＢ、ＨＬＡ－ＤＯＢ、ＨＬＡ－ＤＰＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ３、ＨＬＡ－ＤＱＢ２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３、ＨＬＡ－ＤＲＢ４及びＨＬＡ－ＤＲＢ５から選択される２つ以上のＨＬＡクラスＩＩ組織適合性抗原β鎖遺伝子は、例えば、ノックアウトされるなどして破壊される。例えば、その

内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｃｒｉｖｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｊａｎｕａｒｙ ２０１９，ｊｉ１８００２５７；ＤＯＩ：ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．４０４９／ｊｉｍｍｕｎｏｌ．１８００２５７を参照されたい。

【０１１９】

本明細書の用法では、「ＣＤ３２Ｂ」（分化抗原群３２Ｂ）という用語は、ヒトにおいてＦＣＧＲ２Ｂ遺伝子によってコード化される、低親和性免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩ－ｂタンパク質を指す。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｒａｎｋｉｎ－ＣＴ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ２００６ １０８（７）：２３８４－９１を参照されたい。

【０１２０】

本明細書の用法では、「ＴＲＡＣ」という用語は、ＴＲＡＣ遺伝子座によってコード化されるＴ細胞受容体αサブユニット（定常）を指す。

【０１２１】

機能獲得型改変

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された幹細胞及び／又は子孫細胞は、追加的又は代替的に、１つ又は複数のＣＡＲの発現をもたらす遺伝子改変；ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）の非天然変異型；インターロイキン１５（ＩＬ－１５）；ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）作動薬又はＩＬ－１５受容体の構成的に活性な変異型；インターロイキン１２（ＩＬ－１２）；ＩＬ－１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）作動薬又はＩＬ－１２受容体の構成的に活性な変異型；ヒト白血球抗原Ｇ（ＨＬＡ－Ｇ）；ヒト白血球抗原Ｅ（ＨＬＡ－Ｅ）；又は白血球表面抗原分化抗原群ＣＤ４７（ＣＤ４７）を含む。

【０１２２】

本明細書の用法では、「キメラ抗原受容体」又は「ＣＡＲ」という用語は、ＣＡＲを発現する細胞に、特異的ンパク質を標的化する新しい能力を与えるように改変された受容体タンパク質を指す。本開示に関連して、ＣＡＲを含むように改変された細胞は、例えば、がん細胞などの疾患又は障害に関連する細胞を標的化して破壊するための免疫療法で使用され得る。

【０１２３】

関心のあるＣＡＲとしては、メソセリン、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２及び／又はＭＩＣＡ／Ｂを標的化するＣＡＲが挙げられるが、これらに限定されない。現在までに、メソセリン標的化ＣＡＲ Ｔ細胞療法は、中皮腫、非小細胞肺がん及び乳がんを有する対象の第Ｉ相臨床試験で、有効性の初期の証拠を示している（ＮＣＴ０２４１４２６９）。同様に、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、ＭＩＣＡ／Ｂを標的化するＣＡＲは、初期の研究で有望であることが示されている（例えば、そのそれぞれの全内容が参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に援用される、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（２０１８），Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ＆Ｄｉｓｅａｓｅ，９（１７７）；Ｈａｎ ｅｔ ａｌ．（２０１８）Ａｍ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，８（１）：１０６－１１９；及びＤｅｍｏｕｌｉｎ ２０１７）Ｆｕｔｕｒｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，１３（８）を参照されたい）。

【０１２４】

ＣＡＲは、当業者に周知であり、例えばそのそれぞれの全内容が参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に援用される国際公開第１３／０６３４１９号パンフレット（メソセリン）、国際公開第１５／１６４５９４号パンフレット（ＥＧＦＲ）、国際公開第１３／０６３４１９号パンフレット（ＨＥＲ２）、国際公開第１６／１５４５８５号パンフレット（ＭＩＣＡ及びＭＩＣＢ）に記載されているものが挙げられる。例えば、ＮＫ細胞などの細胞を、例えば、疾患又は障害に関連する細胞などの標的細胞に標的化する任意の適切なＣＡＲ、ＮＫ－ＣＡＲ又は他の結合剤が、本明細書で提供される改変ＮＫ細胞中で発現され得る。例示的なＣＡＲ及び結合剤としては、ＢＣＭＡ、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２０、ＣＤ３３、ＣＤ１２３、アンドロゲン受容体、ＰＳＭＡ、ＰＳＣＡ、Ｍｕｃ１、ＨＰＶウイルスペプチド（すなわちＥ７）、ＥＢＶウイルスペプチド、ＣＤ７０、ＷＴ１、

ＣＥＡ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＩＬ１３Ｒα２及びＧＤ２、ＣＡ１２５、ＣＤ７、ＥｐＣＡＭ、Ｍｕｃ１６、ＣＤ３０に結合するＣＡＲ及び結合剤が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で提供される改変ＮＫ細胞で使用するための追加的な適切なＣＡＲ及び結合剤は、本開示に基づいて且つ当技術分野の一般知識に基づいて、当業者に明らかになるであろう。このような追加的な適切なＣＡＲとしては、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｄａｖｉｅｓ ａｎｄ Ｍａｈｅｒ，Ａｄｏｐｔｉｖｅ Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ Ｕｓｉｎｇ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ－Ｇｒａｆｔｅｄ Ｔ Ｃｅｌｌｓ，Ａｒｃｈｉｖｕｍ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉａｅ ｅｔ Ｔｈｅｒａｐｉａｅ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌｉｓ ５８（３）：１６５－７８（２０１０）の図３に記載されているものが挙げられる。

【０１２５】

本明細書の用法では、「ＣＤ１６」という用語は、免疫グロブリンＧのＦｃ部分の受容体（ＦｃγＲＩＩＩ）を指し、それは、循環からの抗原－抗体複合体の除去並びに他の抗体依存性応答に関与する。

【０１２６】

本明細書の用法では、「ＩＬ－１５／ＩＬ１５ＲＡ」又は「インターロイキン－１５」（ＩＬ－１５）という用語は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）と構造的に類似しているサイトカインを指す。ＩＬ－２と同様に、ＩＬ－１５は、ＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体β鎖（ＣＤ１２２）と共通γ鎖（γ－Ｃ、ＣＤ１３２）からなる複合体に結合し、それを介してシグナル伝達する。ＩＬ－１５は、ウイルスによる感染に続いて、単核食細胞（及び他のいくつかの細胞）によって分泌される。このサイトカインは、その主な役割がウイルス感染細胞を死滅させることである、自然免疫系の細胞である、ナチュラルキラー細胞の細胞増殖を誘導する。ＩＬ－１５受容体α（ＩＬ１５ＲＡ）は、非常に高い親和性でＩＬ－１５に特異的に結合し、他のサブユニットとは独立してＩＬ－１５に結合できる。この特性により、ＩＬ－１５が１つの細胞によって産生され、別の細胞によって取り込まれ、次に第三者の細胞に提示できるようになることが示唆される。ＩＬ１５ＲＡは、細胞増殖とアポトーシス阻害剤ＢＣＬ２Ｌ１／ＢＣＬ２－ＸＬ及びＢＣＬ２の発現を増強すると報告されている。ＩＬ－１５の例示的な配列はＮＧ＿０２９６０５．２に提供され、ＩＬ－１５ＲＡの例示的な配列はＮＭ＿００２１８９．４に提供されている。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒ変異型は、構成的に活性なＩＬ－１５Ｒ変異型である。いくつかの実施形態では、構成的に活性なＩＬ－１５Ｒ変異型は、例えば、ＩＬ－１５タンパク質又はそのＩＬ－１５Ｒ－結合断片などのＩＬ－１５Ｒ及びＩＬ－１５Ｒ作動薬間の融合体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒ作動薬は、ＩＬ－１５又はそのＩＬ－１５Ｒ結合変異型である。例示的な適切なＩＬ－１５Ｒ変異型としては、限定されることなく、例えばそのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用されるＭｏｒｔｉｅｒ Ｅｔ ａｌ，２００６；Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２００６ ２８１：１６１２－１６１９；又はＢｅｓｓａｒｄ－Ａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ．２００９ Ｓｅｐ；８（９）：２７３６－４５に記載されているものが挙げられる。

【０１２７】

本明細書の用法では、「ＩＬ－１２」という用語は、Ｔ細胞及びナチュラルキラー細胞に作用するサイトカインである、インターロイキン－１２を指す。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された幹細胞及び／又は子孫細胞は、インターロイキン１２（ＩＬ１２）経路アゴニスト、例えばＩＬ－１２、インターロイキン１２受容体（ＩＬ－１２Ｒ）又はその変異型（例えば、ＩＬ－１２Ｒの構成活性変異型、例えばＩＬ－１２Ｒアゴニスト（ＩＬ－１２ＲＡ）と融合したＩＬ－１２Ｒ）の１つ又は複数の発現をもたらす、遺伝子改変を含む。

【０１２８】

本明細書の用法では、「ＨＬＡ－Ｇ」という用語は、ＨＬＡ非古典的クラスＩ重鎖パラログを指す。このクラスＩ分子は、重鎖及び軽鎖（β－２ミクログロブリン）からなるヘ

テロ二量体である。重鎖は膜に固定されている。ＨＬＡ－Ｇは、胎児由来の胎盤細胞上で発現される。ＨＬＡ－ＧはＮＫ細胞阻害性受容体ＫＩＲ２ＤＬ４のリガンドであり、したがって栄養膜によるこのＨＬＡの発現は、ＮＫ細胞媒介死から栄養膜を守る。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｆａｖｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｔｏｌｅｒｏｇｅｎｉｃ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｄｉｍｅｒｉｃ Ｆｏｒｍｓ ｏｆ ＨＬＡ－Ｇ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ａ Ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ Ｓｔｕｄｙ Ｉｎ Ｖｉｖｏ ＰＬＯＳ Ｏｎｅ ２０１１を参照されたい。ＨＬＡ－Ｇの例示的な配列は、ＮＧ＿０２９０３９．１として記載されている。

【０１２９】

本明細書の用法では、「ＨＬＡ－Ｅ」という用語は、ＭＨＣクラスＩ抗原Ｅと称されることもある、ＨＬＡクラスＩ組織適合性抗原、α鎖Ｅを指す。ヒトのＨＬＡ－Ｅタンパク質は、ＨＬＡ－Ｅ遺伝子によってコード化されている。ヒトＨＬＡ－Ｅは非古典的なＭＨＣクラスＩ分子であり、その古典的なパラログよりも限られた多型性と、低い細胞表面発現によって特徴付けられる。このクラスＩ分子は、重鎖及び軽鎖（β－２ミクログロブリン）からなるヘテロ二量体である。重鎖は膜に固定されている。ＨＬＡ－Ｅは、他のクラスＩ分子のリーダーペプチドに由来するペプチドの限定されたサブセットに結合する。ＨＬＡ－Ｅ発現細胞は、ＮＫ細胞による同種異系応答及び溶解を回避する。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｇｅｏｒｎａｌｕｓｓｅ－Ｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０１７ ３５（８）を参照されたい。ＨＬＡ－Ｅタンパク質の例示的な配列は、ＮＭ＿００５５１６．６に提供されている。

【０１３０】

本明細書の用法では、「インテグリン関連タンパク質」（ＩＡＰ）と称されることもある「ＣＤ４７」という用語は、ヒトにおいてＣＤ４７遺伝子によってコード化される、膜貫通タンパク質を指す。ＣＤ４７は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、膜インテグリンとパートナーを組み、リガンドであるトロンボスポンジン－１（ＴＳＰ－１）及びシグナル調節タンパク質α（ＳＩＲＰα）にも結合する。ＣＤ４７はマクロファージへのシグナルの役割を果たし、ＣＤ４７発現細胞がマクロファージの攻撃から逃れることを可能にする。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、Ｄｅｕｓｅ－Ｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０１９ ３７：２５２－２５８を参照されたい。

【０１３１】

ｉＮＫ細胞の作製

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の幹細胞に由来するｉＮＫ細胞（例えば、遺伝子改変ｉＮＫ細胞）を作製する方法を提供する。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、本開示のｉＮＫ細胞中に存在する遺伝子改変（例えば、ゲノム編集）は、ドナー細胞からｉＰＳＣへの再プログラム化プロセス中の任意の段階で、ｉＰＳＣ段階中の任意の段階及び／又はｉＰＳＣをｉＮＫ状態に分化させるプロセス中の任意の段階、例えばｉＰＳＣ由来のＨＳＣ状態などの中間状態若しくは最終ｉＮＫ細胞状態まで又は最終ｉＮＫ細胞状態で生成され得る。

【０１３３】

例えば、本開示の編集ｉＮＫ細胞中に存在する１つ又は複数のゲノム編集は、１つ又は複数の異なる細胞段階（例えば、ドナーからｉＰＳＣへの再プログラム化、ｉＰＳＣからｉＮＫへの分化）で行われ得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される改変された改変遺伝子改変ｉＮＫ細胞に存在する１つ又は複数のゲノム編集は、ドナー細胞をｉＰＳＣ状態に再プログラム化する前に行われる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変ｉＮＫ細胞に存在する全ての編集は、同時に、時間的に近接して、且つ／又は例えばドナー細胞段階、再プログラム化プロセス中、ｉＰＳＣ段階又は例えばｉＰＳＣからｉＮＫへなどの分化プロセス中などの再プログラム化／分化プロセスの同じ細胞段階で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変ｉＮＫ細

胞中に存在する２つ以上の編集は、ドナー細胞からｉＰＳＣからｉＮＫへの再プログラム化／分化プロセスの異なる時点及び／又は異なる細胞段階で行われる。例えば、いくつかの実施形態では、第１の編集はドナー細胞段階で行われ、第２の（異なる）編集はｉＰＳＣ段階で行われる。いくつかの実施形態では、第１の編集は、再プログラム化段階（例えば、ドナーからｉＰＳＣへの）で行われ、第２の（異なる）編集は、ｉＰＳＣ段階で行われる。

【０１３４】

様々な細胞型が、本明細書に記載の再プログラム化、分化及び／又はゲノム編集ストラテジーに供し得るドナー細胞として使用され得る。例えば、ドナー細胞は、例えば、線維芽細胞又はＴリンパ球などの体細胞などの万能性幹細胞又は分化細胞であり得る。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は操作されて（例えば、再プログラム化、分化及び／又はゲノム編集を受けて）、本明細書に記載のｉＮＫ細胞を生成する。

【０１３５】

ドナー細胞は、任意の適切な生物に由来し得る。例えば、いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、例えば、ヒト細胞又は非ヒト霊長類細胞などの哺乳類細胞である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、体細胞である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、幹細胞又は前駆細胞である。特定の実施形態では、ドナー細胞は、ヒト胚の一部ではないか又はそうであったわけでもなく、その誘導は、ヒト胚の破壊を伴わない。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、編集ｉＮＫ細胞はｉＰＳＣに由来し、このｉＰＳＣは体細胞ドナー細胞に由来する。任意の適切な体細胞が、ｉＰＳＣの作製、したがってｉＮＫ細胞の作製に使用され得る。様々な体細胞ドナー細胞型からｉＰＳＣ胞を誘導するための適切なストラテジーが記載されており、当技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、体細胞ドナー細胞は、線維芽細胞である。いくつかの実施形態では、体細胞ドナー細胞は、成熟したＴ細胞である。

【０１３７】

例えば、いくつかの実施形態では、ｉＰＳＣ及びそれに続くｉＮＫ細胞が由来する体細胞ドナー細胞は、発生的に成熟したＴ細胞（胸腺選択を経たＴ細胞）である。発達的に成熟したＴ細胞の特徴の１つは、再配列されたＴ細胞受容体遺伝子座である。Ｔ細胞の成熟中に、ＴＣＲ遺伝子座はＶ（Ｄ）Ｊ再配列を被り、完全なＶドメインエクソンを生成する。これらの再配列は、Ｔ細胞からｉＰＳＣへの再プログラム化全体を通じて、且つ得られたｉＰＳＣから体細胞への分化全体を通じて維持される。

【０１３８】

特定の実施形態では、体細胞ドナー細胞は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ８$^{+}$ナイーブＴ細胞、ＣＤ４$^{+}$中枢性記憶Ｔ細胞、ＣＤ８$^{+}$中枢性記憶Ｔ細胞、ＣＤ４$^{+}$エフェクター記憶Ｔ細胞、ＣＤ４$^{+}$エフェクター記憶Ｔ細胞、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ４$^{+}$幹細胞記憶Ｔ細胞、ＣＤ８$^{+}$幹細胞記憶Ｔ細胞、ＣＤ４$^{+}$ヘルパーＴ細胞、制御性Ｔ細胞、細胞傷害性Ｔ細胞、ナチュラルキラーＴ細胞、ＣＤ４＋ナイーブＴ細胞、ＴＨ１７ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ＴＨ１ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ＴＨ２ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ＴＨ９ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＣＤ１２７$^{-}$Ｔ細胞又はＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＣＤ１２７$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$Ｔ細胞である。

【０１３９】

Ｔ細胞は、ｉＰＳＣの作製に有利であり得る。例えば、Ｔ細胞は、例えば、ＣＲＩＳＰＲベースの方法又は他の遺伝子編集法によって比較的容易に編集され得る。さらに、再配置されたＴＣＲ遺伝子座は、個々の細胞とその娘細胞の遺伝子追跡を可能にする。例えば、ＮＫ細胞の作製に関与する再プログラム化、増殖、培養及び／又は分化ストラテジーが単一細胞のクローン増殖である場合、再配列されたＴＣＲ遺伝子座は、細胞及びその娘細胞を明確に識別する遺伝子マーカーとして使用され得る。これにより、細胞集団の真性クローンとしての特徴付け、又は混合集団の同定、又はクローン集団内の混入細胞の同定が可能になる。複数の編集を有するｉＮＫ細胞を作製するのに、Ｔ細胞を使用する別の可能

な利点は、染色体転座に関連する特定の核型異常が、Ｔ細胞培養に対して選択されることである。このような異常は、ＣＲＩＳＰＲ技術によって細胞を編集する場合、特に複数の編集を有する細胞を作製する場合に懸念を引き起し得る。治療用リンパ球を誘導するための出発点としてＴ細胞由来のｉＰＳＣを使用すると、例えば腫瘍抗原などの特異的抗原に対する結合活性についてＴ細胞を選択することと、選択されたＴ細胞をｉＰＳＣに再プログラム化することと、次にＴＣＲを発現するこれらのｉＰＳＣ（例えば、Ｔ細胞）からリンパ球を誘導することとを介して、リンパ球中で予備スクリーニングされたＴＣＲの発現が可能になる。このストラテジーは、例えば、遺伝的な又はエピジェネティックなストラテジーにより、他の細胞型においてＴＣＲを活性化することも可能にし得る。さらに、Ｔ細胞は、再プログラム化プロセス全体を通じて「エピジェネティックな記憶」の少なくとも一部を維持し、したがって、ｉＮＫ細胞などの同一又は近縁の細胞型のその後の分化は、ｉＮＫ誘導の出発点として、線維芽細胞などの無関係な細胞を用いたアプローチと比較してより効率的であり、且つ／又はより高品質の細胞集団をもたらし得る。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、例えば、再プログラム化され、且つ／又はゲノム編集を受ける細胞などの操作されるドナー細胞は、長期造血幹細胞、短期造血幹細胞、多能性前駆細胞、系統制限前駆細胞、リンパ系前駆細胞、骨髄系前駆細胞、共通骨髄系前駆細胞、赤血球前駆細胞、巨核球赤血球前駆細胞、網膜細胞、光受容体細胞、桿体細胞、円錐細胞、網膜色素上皮細胞、小柱網細胞、蝸牛毛細胞、外有毛細胞、内有毛細胞、肺上皮細胞、気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞、肺上皮前駆細胞、横紋筋細胞、心筋細胞、筋肉衛星細胞、神経細胞、神経細胞幹細胞、間葉系幹細胞、人工万能性幹（ｉＰＳ）細胞、胚性幹細胞、線維芽細胞、単球由来マクロファージ又は樹状細胞、巨核球、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞、網状赤血球、Ｂ細胞（例えば、前駆Ｂ細胞、プレＢ細胞、プロＢ細胞、記憶Ｂ細胞、プラズマＢ細胞）、胃腸上皮細胞、胆管上皮細胞、膵管上皮細胞、腸幹細胞、肝実質細胞、肝臓星細胞、クッパー細胞、骨芽細胞、破骨細胞、脂肪細胞、前脂肪細胞、膵島細胞（例えば、β細胞、α細胞、δ細胞）、膵臓外分泌細胞、シュワン細胞又は乏突起膠細胞の１つ又は複数である。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、例えば、細網細胞、巨核球赤血球前駆細胞（ＭＥＰ）細胞、骨髄系前駆細胞（ＣＭＰ／ＧＭＰ）、リンパ系前駆細胞（ＬＰ）細胞、造血幹／前駆細胞（ＨＳＣ）又は内皮細胞（ＥＣ）などの循環血液細胞の１つ又は複数である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、骨髄細胞（例えば、細網細胞、赤血球細胞（例えば、赤芽球）、ＭＥＰ細胞、骨髄系前駆細胞（ＣＭＰ／ＧＭＰ）、ＬＰ細胞、赤芽球前駆（ＥＰ）細胞、ＨＳＣ、多能性前駆細胞（ＭＰＰ）細胞、内皮細胞（ＥＣ）、造血性内皮（ＨＥ）細胞又は間葉系幹細胞）の１つ又は複数である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、骨髄系前駆細胞（例えば、共通骨髄系前駆（ＣＭＰ）細胞又は顆粒球マクロファージ前駆細胞（ＧＭＰ）細胞）の１つ又は複数である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、例えば、共通リンパ系前駆（ＣＬＰ）細胞などのリンパ系前駆細胞の１つ又は複数である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、赤血球前駆細胞（例えば、ＭＥＰ細胞）の１つ又は複数である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、造血幹／前駆細胞（例えば、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＭＰＰ細胞又は系統制限前駆（ＬＲＰ）細胞）の１つ又は複数である。特定の実施形態では、ドナー細胞は、ＣＤ３４$^{+}$細胞、ＣＤ３４$^{+}$ＣＤ９０$^{+}$細胞、ＣＤ３４$^{+}$ＣＤ３８$^{-}$細胞、ＣＤ３４$^{+}$ＣＤ９０$^{+}$ＣＤ４９ｆ$^{+}$ＣＤ３８$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$細胞、ＣＤ１０５$^{+}$細胞、ＣＤ３１$^{+}$若しくはＣＤ１３３$^{+}$細胞又はＣＤ３４$^{+}$ＣＤ９０$^{+}$ＣＤ１３３$^{+}$細胞である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、臍帯血ＣＤ３４$^{+}$ＨＳＰＣ、臍帯静脈内皮細胞、臍帯動脈内皮細胞、羊水ＣＤ３４$^{+}$細胞、羊水内皮細胞、胎盤内皮細胞又は胎盤造血ＣＤ３４$^{+}$細胞の１つ又は複数である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、動員末梢血造血ＣＤ３４$^{+}$細胞の１つ又は複数である（患者が例えば、Ｇ－ＣＳＦ又はプレリキサフォルなどの動員剤で治療された後）。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、末梢

血内皮細胞である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、末梢血ナチュラルキラー細胞である。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、分裂細胞である。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は、非分裂細胞である。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の１つ又は複数の方法及び／又はストラテジーから得られる遺伝子改変（例えば、編集）ｉＮＫ細胞は、例えば、免疫腫瘍学治療アプローチに関連して、それを必要とする対象に投与される。いくつかの実施形態では、ドナー細胞又は本明細書で提供される再プログラム化、分化及び／又は編集ストラテジーの任意の段階の任意の細胞は、例えば、特性評価又はそれを必要とする対象への投与のために、培養中で維持されるか、又は当技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して保存され得る（例えば、液体窒素中の凍結）。

【０１４４】

ゲノム編集システム

本開示のゲノム編集システムは、例えば、幹細胞を編集するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本開示のゲノム編集システムは、天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムから適合された、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの少なくとも２つの構成要素を含む。これらの２つの構成要素は、特定の核酸配列と結合して、例えば１つ又は複数の一本鎖切断（ＳＳＢ又はニック）、二重鎖切断（ＤＳＢ）及び／又は点変異を生成することにより、核酸配列中又はその周囲のＤＮＡを編集できる複合体を形成する。

【０１４５】

天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムは、進化的に２つのクラス及び５つの型に組織化され（Ｍａｋａｒｏｖａ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２０１１ Ｊｕｎ；９（６）：４６７－４７７（「Ｍａｋａｒｏｖａ」））、本開示のゲノム編集システムは、任意の型又はクラスの天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムの構成要素を適合させ得る一方、本明細書に提示される実施形態は、一般にクラス２及びＩＩ型又はＶ型のＣＲＩＳＰＲシステムから適合される。ＩＩ型及びＶ型を包含するクラス２システムは、相対的に大型の多ドメインＲＮＡ誘導ヌクレアーゼタンパク質（例えば、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１）と、１つ又は複数のガイドＲＮＡ（例えば、ｃｒＲＮＡ、任意選択的にｔｒａｃｒＲＮＡ）とによって特徴付けられ、それは、ｃｒＲＮＡの標的（又はスペーサー）配列に相補的な特定の遺伝子座と会合（標的化）して切断するリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成する。本開示によるゲノム編集システムは、細胞ＤＮＡ配列を同様に標的化して編集するが、天然に存在するＣＲＩＳＰＲシステムと著しく異なる。例えば、本明細書に記載の単分子ガイドＲＮＡは、自然界に存在せず、且つ本開示によるガイドＲＮＡ及びＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、いずれも天然に存在しない任意の数の修飾を組み込み得る。

【０１４６】

ゲノム編集システムは、様々な方法で実装され得（例えば、細胞又は対象に投与又は送達され得る）、異なる実装形態が異なる用途に適し得る。例えば、ゲノム編集システムは、特定の実施形態では、タンパク質／ＲＮＡ複合体（リボ核タンパク質又はＲＮＰ）として実装され、それは、脂質又はポリマーの微粒子又はナノ粒子、ミセル、リポソームなどの薬学的に許容可能な担体及び／又は封入剤を任意選択的に含む医薬組成物に含まれ得る。特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、上述したＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ及びガイドＲＮＡ構成要素をコード化する１つ又は複数の核酸として（任意選択的に１つ又は複数の追加的な構成要素と共に）実装され；特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、このような核酸を含む１つ又は複数のベクター、例えばアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターとして実装され；特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、前述のいずれかの組合せとして実装される。本明細書に記載の原理に従って動作する追加的な又は修正された実装形態は、当業者に明らかであり、本開示の範囲内である。

【０１４７】
本開示のゲノム編集システムは、単一の特定のヌクレオチド配列を標的化し得るか又は標的化し得、２つ以上のガイドＲＮＡの使用により、２つ以上の特定のヌクレオチド配列を並行して編集できることに留意すべきである。複数のｇＲＮＡの使用は、本開示を通して「多重化」と称され、関心のある複数の無関係の標的配列を標的化するため又は単一の標的ドメイン内に複数のＳＳＢ若しくはＤＳＢを形成するため、場合によりこのような標的ドメイン内で特定の編集をするために用いられ得る。例えば、Ｍａｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．による国際公開第２０１５／１３８５１０号パンフレット（「Ｍａｅｄｅｒ」）は、潜在的なスプライス部位の生成をもたらし、その結果として遺伝子の機能を低下させ又は排除する、ヒトＣＥＰ２９０遺伝子における点変異を修正する（Ｃ．２９９１＋１６５５ＡからＧへ）ためのゲノム編集システムを記載する。Ｍａｅｄｅｒのゲノム編集システムは、点変異の両側の（すなわちそれを挟む）配列を標的化する２つのガイドＲＮＡを利用して、変異側面に位置するＤＳＢを形成する。これは、次に、変異を含む介在配列の欠失を促進し、それによって潜在的スプライス部位を除去し、正常な遺伝子機能を回復させる。

【０１４８】
別の例として、Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏらによる国際公開第２０１６／０７３９９０号パンフレット（「Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏ」）は、「二重ニッカーゼシステム」と称される配置である、Ｃａｓ９ニッカーゼ（Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｄ１０Ａなどの一本鎖ニックを生じるＣａｓ９）と組み合わせて、２つのｇＲＮＡを利用するゲノム編集システムを記載する。Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏの二重ニッカーゼシステムは、１つ又は複数のヌクレオチドでオフセットされている目的の配列の逆ストランドに２つのニックを生じるように構成され、上記ニックが組み合わされて、オーバーハングを有する二本鎖切断を作り出す（Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏの場合には５’であるが、３’オーバーハングも可能である）。オーバーハングは、次に、いくつかの状況において相同指向修復事象を促進し得る。また、別の例として、Ｐａｌｅｓｔｒａｎｔらによる国際公開第２０１５／０７００８３号パンフレット（「Ｐａｌｅｓｔｒａｎｔ」）は、Ｃａｓ９をコードするヌクレオチド配列を標的化するｇＲＮＡ（「支配ＲＮＡ」と称される）を記載し、それは、例えば、いくつかのウイルス形質導入細胞において、さもなければ構成的に発現され得るＣａｓ９の一過性発現を可能にするために、１つ又は複数の追加的なｇＲＮＡを含むゲノム編集システムに含まれ得る。これらの多重化用途は、限定的ではなく、むしろ例示的であること意図しており、当業者は、他の多重化用途が、一般に、本明細書に記載のゲノム編集システムと適合性があることを理解するであろう。

【０１４９】
ゲノム編集システムは、場合によっては、ＮＨＥＪ又はＨＤＲなどの細胞ＤＮＡ二本鎖切断機序によって修復される二本鎖切断を形成し得る。これらの機序は、例えば、Ｄａｖｉｓ＆Ｍａｉｚｅｌｓ，ＰＮＡＳ，１１１（１０）：Ｅ９２４－９３２，Ｍａｒｃｈ １１，２０１４（「Ｄａｖｉｓ」）（Ａｌｔ－ＨＤＲを記載している）；Ｆｒｉｔ ｅｔ ａｌ．ＤＮＡ Ｒｅｐａｉｒ １７（２０１４）８１－９７（「Ｆｒｉｔ」）（Ａｌｔ－ＮＨＥＪを記載している）；及びＩｙａｍａ ａｎｄ Ｗｉｌｓｏｎ ＩＩＩ，ＤＮＡ Ｒｅｐａｉｒ（Ａｍｓｔ．）２０１３－Ａｕｇ；１２（８）：６２０－６３６（「Ｉｙａｍａ」）（概して標準的なＨＤＲ経路及びＮＨＥＪ経路を記載している）などの文献全体を通じて記載されている。

【０１５０】
ゲノム編集システムがＤＳＢを形成することによって機能する場合、このようなシステムは、任意選択的に、特定の様式の二本鎖切断修復又は特定の修復結果を促進するか又は容易にする１つ又は複数の構成要素を含む。例えば、Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏは、その中に一本鎖オリゴヌクレオチド「ドナー鋳型」が付加されているゲノム編集システムも記載しており；ドナー鋳型は、ゲノム編集システムによって切断される細胞ＤＮＡの標的領域に組み込まれ、標的配列の変化をもたらし得る。

【０１５１】
特定の実施形態では、ゲノム編集システムは、一本鎖又は二本鎖の切断を引き起こすことなく、標的配列を改変するか又は標的配列中若しくはその付近の標的遺伝子の発現を改変する。例えば、ゲノム編集システムは、ＤＮＡに作用する機能ドメインに融合したＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを含み得、それによって標的配列又はその発現を改変する。一例として、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、シチジンデアミナーゼ機能ドメインに結合（例えば、融合）し得、標的化されたＣからＡへの置換を生成することによって機能し得る。例示的なヌクレアーゼ／デアミナーゼ融合 体は、Ｋｏｍｏｒ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ５３３，４２０－４２４（１９ Ｍａｙ２０１６）（「Ｋｏｍｏｒ」）に記載される。代わりに、ゲノム編集システムは、死滅したＣａｓ９（ｄＣａｓ９）などの切断不活性化（すなわち「死滅した」）ヌクレアーゼを利用し得、細胞ＤＮＡの１つ又は複数の標的化領域上に安定な複合体を形成し、それにより、限定されないが、ｍＲＮＡ転写、クロマチンリモデリングなどをはじめとする、標的領域が関与する機能を妨害することによって機能し得る。

【０１５２】
ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）分子
本明細書のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）は、単分子（単一のＲＮＡ分子を含み、代替え的にキメラと称される）又はモジュール型（例えば、二重化によって通常互いに結合する、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡなどの２つ以上、典型的には２つの別々のＲＮＡ分子を含む）であり得る。ｇＲＮＡ及びそれらの構成部分は、例えば、Ｂｒｉｎｅｒ ｅｔ ａｌ．（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ ５６（２），３３３－３３９，Ｏｃｔｏｂｅｒ２３，２０１４（「Ｂｒｉｎｅｒ」））及びＣｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏなどの文献全体を通じて記載されている。

【０１５３】
細菌及び古細菌では、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムは、一般に、Ｃａｓ９などのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼタンパク質；外来配列に相補的な５’領域を含むＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）；及びｃｒＲＮＡの３’領域に相補的であり、それと二重鎖を形成する、５’領域を含むトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含む。いかなる理論にも拘束されることは意図されないが、この二重鎖は、Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体の形成を促進し、その活性に必要であると考えられる。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムを遺伝子編集における使用に適合させる間、１つの非限定的例において、ｃｒＲＮＡ（その３’末端）及びｔｒａｃｒＲＮＡ（その５’末端）の相補的領域を架橋する４ヌクレオチド（例えば、ＧＡＡＡ）「テトラループ」又は「リンカー」配列により、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡが単一の単分子又はキメラガイドＲＮＡに連結され得ることが発見された。（Ｍａｌｉ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１３ Ｆｅｂ １５；３３９（６１２１）：８２３－８２６（「Ｍａｌｉ」）；Ｊｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１３ Ｍａｒ；３１（３）：２３３－２３９（「Ｊｉａｎｇ」）；及びＪｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．，２０１２ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ａｕｇ．１７；３３７（６０９６）：８１６－８２１（「Ｊｉｎｅｋ ２０１２」））。

【０１５４】
ガイドＲＮＡは、単分子又はモジュラー型を問わず、編集が望まれる細胞のゲノム中のＤＮＡ配列などの標的配列中の標的ドメインに完全に又は部分的に相補的な「標的化ドメイン」を含む。標的化ドメインは、限定されないが、「ガイド配列」（Ｈｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１３ Ｓｅｐ；３１（９）：８２７－８３２（「Ｈｓｕ」））、「相補的領域」（Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏ）、「スペーサー」（Ｂｒｉｎｅｒ）及び包括的に「ｃｒＲＮＡ」（Ｊｉａｎｇ）をはじめとする文献において様々な名称で呼ばれている。それらに与えられた名称とはかかわりなく、標的化ドメインは、典型的には１０～３０ヌクレオチド長であり、特定の実施形態では１６～２４ヌクレオチド長（例えば、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３又は２４ヌクレオチド長）であり、Ｃａｓ９ ｇＲＮＡの場合には５’末端又はその付近にあり、Ｃｐｆ

１　ｇＲＮＡの場合には３’末端又はその付近にある。

【０１５５】

標的化ドメインに加えて、ｇＲＮＡは、典型的には（以下で考察されるように必ずしもそうとは限らないが）、ｇＲＮＡ／Ｃａｓ９複合体の形成又は活性に影響を及ぼし得る複数のドメインを含む。例えば、上記のように、ｇＲＮＡの第１及び第２の相補的ドメイン（リピート：アンチリピート二重鎖とも称される）によって形成される二重鎖構造は、Ｃａｓ９の認識（ＲＥＣ）ローブと相互作用して、Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体の形成を媒介し得る（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１５６，９３５－９４９，Ｆｅｂｒｕａｒｙ　２７，２０１４（「Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　２０１４」）及びＮｉｓｈｉｍａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１６２，１１１３－１１２６，Ａｕｇｕｓｔ　２７，２０１５（「Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　２０１５」））。第１及び／又は第２の相補的ドメインは、ＲＮＡポリメラーゼによって終結シグナルとして認識され得る１つ又は複数のポリＡ鎖を含有し得ることに留意すべきである。そのため、第１及び第２の相補的ドメインの配列は、例えば、Ｂｒｉｎｅｒに記載されるようなＡ－Ｇスワップの使用又はＡ－Ｕスワップの使用を通じて任意選択的に修飾され、これらの区域が除去されてｇＲＮＡの完全なインビトロ転写が促進される。第１及び第２の相補的ドメインに対するこれらの及び他の類似の改変は、本開示の範囲内である。

【０１５６】

第１及び第２の相補的ドメインと共に、Ｃａｓ９ｇ　ＲＮＡは、典型的には、インビボでヌクレアーゼ活性に関与するが、インビトロで必ずしも関与しない２つ以上の追加的な二重鎖領域を含む。（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　２０１５）。第二の相補的ドメインの３’部分の付近にある第１のステムループ１は、「近位ドメイン」（Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏ）、「ステムループ１」（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　２０１４及び２０１５）及び「ｎｅｘｕｓ」（Ｂｒｉｎｅｒ）など、様々に呼ばれる。１つ又は複数の追加的なステムループ構造は、一般に、ｇＲＮＡの３’末端の付近に存在し、数は、種によって異なり、ｓ．ピオゲネス（ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）ｇＲＮＡは、典型的に２つの３’ステムループ（リピート：アンチリピート二重鎖を含む合計４つのステムループ構造：アンチリピート二重鎖）を含む一方、Ｓ．アウレウス（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）及び他の種は、単に１つのみ有する（合計３つのステムループ構造）。種毎にまとめられた保存的ステムループ構造（及びより一般的にはｇＲＮＡ構造）の説明は、Ｂｒｉｎｅｒに提供されている。

【０１５７】

前述の説明は、Ｃａｓ９と共に使用するためのｇＲＮＡに焦点を当ててきたが、ここまでに記載されているものといくつかの点で異なるｇＲＮＡを利用する、他のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼが発見され又は発明されている（又は将来的に発見される可能性がある）ことを理解されたい。例えば、Ｃｐｆ１（「Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ａｎｄ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｅｌｌａ　１由来のＣＲＩＳＰＲ」）は最近発見されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼであり、機能するためにｔｒａｃｒＲＮＡを必要としない。（Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５，Ｃｅｌｌ　１６３，７５９－７７１　Ｏｃｔｏｂｅｒ　２２，２０１５（「Ｚｅｔｓｃｈｅ　Ｉ」））。Ｃｐｆ１ゲノム編集システムにおいて使用するためのｇＲＮＡは、一般に、標的化ドメイン及び相補的ドメイン（代わりに「ハンドル」と称される）を含む。Ｃｐｆ１と共に使用するためのｇＲＮＡにおいて、標的化ドメインは、通常、Ｃａｓ９　ｇＲＮＡに関して上述したように、５’末端ではなく、むしろ３’末端又はその付近に存在する（ハンドルは、Ｃｐｆ１　ｇＲＮＡの５’末端又はその付近にある）ことにも留意すべきである。

【０１５８】

しかしながら、当業者は、異なる原核生物種由来のｇＲＮＡ間又はＣｐｆ１及びＣａｓ９のｇＲＮＡ間に構造上の相違が存在し得るが、ｇＲＮＡが作用する原理が概して一貫していることを理解するであろう。この動作の一貫性のため、ｇＲＮＡは、広い意味でそれらの標的化ドメイン配列によって定義され得、当業者は、所与の標的化ドメイン配列が、単分子若しくはキメラｇＲＮＡ又は１つ若しくは複数の化学修飾及び／若しくは配列修飾

（置換、追加のヌクレオチド、切断など）を含むｇＲＮＡをはじめとする任意の適切なｇＲＮＡに組み込まれ得ることを理解するであろう。したがって、本開示における提示の経済性のため、ｇＲＮＡは、それらの標的化ドメイン配列の観点のみから記載され得る。

【０１５９】

より一般的には、当業者は、本開示のいくつかの態様が、複数のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを使用して実装され得るシステム、方法及び組成物に関することを理解するであろう。この理由から、別段の指定がない限り、ｇＲＮＡという用語は、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１の特定の種と適合性のｇＲＮＡだけでなく、任意のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと共に使用され得る任意の適切なｇＲＮＡを包含するものと理解されるべきである。例として、ｇＲＮＡという用語は、特定の実施形態では、ＩＩ型又はＶ型などのクラス２　ＣＲＩＳＰＲシステム又はＣＲＩＳＰＲシステムに存在する任意のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと共に又はそれに由来するか若しくはそれから適合化されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと共に使用するためのｇＲＮＡを含み得る。

【０１６０】

ｇＲＮＡ設計

標的配列の選択及び検証並びにオフターゲット解析の方法は、例えば、Ｍａｌｉ；Ｈｓｕ；Ｆｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４　Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　３２（３）：２７９－８４，Ｈｅｉｇｗｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４　Ｎａｔ　ｍｅｔｈｏｄｓ　１１（２）：１２２－３；Ｂａｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　３０（１０）：１４７３－５；及びＸｉａｏ　Ａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　３０（８）：１１８０－１１８２に以前記載されている。非限定的例として、ｇＲＮＡ設計は、例えば、ゲノム全体にわたる総オフターゲット活性を最小化するために、使用者の標的配列に対応する潜在的な標的配列の選択を最適化するためのソフトウェアツールの使用を伴い得る。オフターゲット活性は、切断に限定されないものの、各オフターゲット配列における切断効率は、例えば、実験的に導出された重み付けスキームを用いて予測され得る。これらの及び他のガイド選択方法は、Ｍａｅｄｅｒ及びＣｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏに詳細に記載されている。

【０１６１】

例えば、ｃａｓ－ｏｆｆｉｎｄｅｒを使用して、標的配列の選択と検証及びオフターゲット解析のための方法が実施され得る（Ｂａｅ　Ｓ，Ｐａｒｋ　Ｊ，Ｋｉｍ　Ｊ－Ｓ．Ｃａｓ－ＯＦＦｉｎｄｅｒ：ａ　ｆａｓｔ　ａｎｄ　ｖｅｒｓａｔｉｌｅ　ａｌｇｏｒｉｔｈｍ　ｔｈａｔ　ｓｅａｒｃｈｅｓ　ｆｏｒ　ｐｏｔｅｎｔｉａｌ　ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｓｉｔｅｓ　ｏｆ　Ｃａｓ９　ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ　ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅｓ．Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ．２０１４；３０：１４７３－５）。Ｃａｓ－ｏｆｆｉｎｄｅｒは、ガイド配列とのミスマッチが指定された数までである、ゲノム内の全ての配列を速やかに同定し得るツールである。

【０１６２】

別の例として、所与の配列がオフターゲットである可能性がどの程度あるかをスコアリングするための方法が、実施され得る（例えば、ひとたび標的候補配列が同定された後）。例示的なスコアは、Ｄｏｅｎｃｈ　ＪＧ，Ｆｕｓｉ　Ｎ，Ｓｕｌｌｅｎｄｅｒ　Ｍ，Ｈｅｇｄｅ　Ｍ，Ｖａｉｍｂｅｒｇ　ＥＷ，Ｄｏｎｏｖａｎ　ＫＦ，ｅｔ　ａｌ．Ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ　ｓｇＲＮＡ　ｄｅｓｉｇｎ　ｔｏ　ｍａｘｉｍｉｚｅ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　ａｎｄ　ｍｉｎｉｍｉｚｅ　ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｅｆｆｅｃｔｓ　ｏｆ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１６；３４：１８４－９１によって記載されているような、切断頻度判定（ＣＦＤ）スコアを含む。

【０１６３】

ｇＲＮＡ修飾

特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、本明細書の用法では、修飾又は未修飾ｇＲＮＡであり得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、１つ又は複数の修飾を含み得る。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ホスホロチオエート結合修飾、ホスホロジチオエート

（ＰＳ２）結合修飾、２’－Ｏ－メチル修飾又はそれらの組み合わせを含み得る。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端又はそれらの組み合わせにおけるものであり得る。

【０１６４】

特定の実施形態では、ｇＲＮＡ修飾は、１つ又は複数のホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾を含み得る。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、本明細書で「ＤＮＡ延長」とも称される、１つ又は複数の又は一続きのデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）塩基を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端又はそれらの組み合わせにＤＮＡ延長を含む。特定の実施形態では、ＤＮＡ伸長は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９又は１００ＤＮＡ塩基長であり得る。例えば、特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、１、２、３、４、５、１０、１５、２０又は２５ＤＮＡ塩基長であり得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）又はチミン（Ｔ）から選択される１つ又は複数のＤＮＡ塩基を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は同一ＤＮＡ塩基を含む。例えば、ＤＮＡ延長は、一続きのアデニン（Ａ）塩基を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、一続きのチミン（Ｔ）塩基を含み得る。特定の実施形態では、ＤＮＡ延長は、異なるＤＮＡ塩基の組み合わせを含む。特定の実施形態では、ＤＮＡ伸長は、表３に記載されている配列を含み得る。

【０１６６】

Ｃｐｆ１ガイドＲＮＡの適切な５’伸長の例は、以下の表３に示される：

【０１６７】

【表４】

表 3: 例示的な Cpf1 gRNA 5'伸長

配列番号	5'伸長配列	5'修飾
1	rCrUrUrUrU	+5 RNA
2	rArArGrArCrCrUrUrUrU	+10 RNA
3	rArUrGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+25 RNA
4	rArGrGrCrCrArGrCrUrUrGrCrCrGrGrUrUrUrUrUrUrArGrUrCrGrUrGrCrUrGrCrUrUrCrArUrGrUrGrUrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+60 RNA
5	CTTTT	+5 DNA
6	AAGACCTTTT	+10 DNA
7	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+25 DNA
8	AGGCCAGCTTGCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+60 DNA
9	TTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+20 DNA
10	GCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+30 DNA
11	GCCGGTTTTTTAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+50 DNA
12	TAGTCGTGCTGCTTCATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+40 DNA

【０１６８】

【表５】

13	C*C*GAAGTTTTCTTCGGTTTT	+20 DNA + 2xPS
14	T*T*TTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+25 DNA + 2xPS
15	A*A*CGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+30 DNA + 2xPS
16	G*C*GTTGTTTTCAACGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+41 DNA + 2xPS
17	G*G*CTTCTTTTGAAGCCTTTTTGCGTTGTTTTCAACGCTTTTTCCGAAGTTTTCTTCGGTTTT	+62 DNA + 2xPS
18	A*T*GTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTT	+25 DNA + 2xPS
19	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	+25 A
20	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	+25 T
21	mA*mU*rGrUrGrUrUrUrUrGrUrCrArArArArGrArCrCrUrUrUrU	+25 RNA + 2xPS
22	mA*mA*rArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArArA	ポリ A RNA + 2×PS
23	mU*mU*rUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrU	ポリ U RNA + 2×PS
全ての塩基は大文字である 小文字「r」はRNA、2'-ヒドロキシを表し;「r」で修飾されていない塩基はDNAである 全ての塩基は、特に記載されている場合を除き、標準的なホスホジエステル結合を介して連結されている: 「*」はホスホロチオエート修飾を表す 「PS」はホスホロチオエート修飾を表す		

【０１６９】
特定の実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ＤＮＡ伸長と並んで、例えば１つ若しくは複数のホスホロチオエート結合修飾、１つ若しくは複数のホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、１つ若しくは複数の２’－Ｏ－メチル修飾又は本明細書で開示される１つ若しくは複数の追加的な適切な化学的ｇＲＮＡ修飾或いはそれらの組み合わせなどの化学修飾を含む。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端又はそれらの組み合わせにおけるものであり得る。
【０１７０】
理論による拘束は望まないが、ｇＲＮＡによって標的化される標的核酸とハイブリッド形成せず、このようなＤＮＡ伸長を含まないｇＲＮＡと比較して標的核酸部位における編集の増加を示す限り、本明細書で開示された任意のｇＲＮＡと共に、任意のＤＮＡ伸長が使用され得ることが想定される。
【０１７１】
いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、本明細書で「ＲＮＡ延長」とも称される、１つ又は複数の又は一続きのリボ核酸（ＲＮＡ）塩基を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’

末端又はそれらの組み合わせにＲＮＡ延長を含む。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９又は１００ＲＮＡ塩基長であり得る。例えば、特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、１、２、３、４、５、１０、１５、２０又は２５ＲＮＡ塩基長であり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、アデニン（ｒＡ）、グアニン（ｒＧ）、シトシン（ｒＣ）又はウラシル（ｒＵ）から選択される１つ又は複数のＲＮＡ塩基を含み得、その中で「ｒ」は、ＲＮＡ、２’－ヒドロキシを表す。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、同一ＲＮＡ塩基を含む。例えば、ＲＮＡ延長は、一続きのアデニン（ｒＡ）塩基を含み得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長は、異なるＲＮＡ塩基の組み合わせを含む。特定の実施形態では、本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ＲＮＡ伸長と並んで、１つ若しくは複数のホスホロチオエート結合修飾、１つ若しくは複数のホスホロジチオエート（ＰＳ２）結合修飾、１つ若しくは複数の２’－Ｏ－メチル修飾、例えば本明細書で開示された化学修飾などの１つ若しくは複数の追加的な適切なｇＲＮＡ修飾又はそれらの組み合わせを含む。特定の実施形態では、１つ又は複数の修飾は、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端又はそれらの組み合わせにおけるものであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長を含むｇＲＮＡは、本明細書に記載の配列を含み得る。

【０１７２】

本明細書で使用されるｇＲＮＡは、ＲＮＡ伸長及びＤＮＡ伸長も含み得ることが想定される。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長及びＤＮＡ延長のいずれも、ｇＲＮＡの５’末端、ｇＲＮＡの３’末端又はそれらの組み合わせにおけるものであり得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ伸長はｇＲＮＡの５’末端にあり、ＤＮＡ伸長はｇＲＮＡの３’末端にある。特定の実施形態では、ＲＮＡ延長はｇＲＮＡの３’末端にあり、ＤＮＡ延長はｇＲＮＡの５’末端にある。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、例えば、５’末端のＤＮＡ伸長などの修飾及び／又は本明細書で開示されるような化学修飾を含むｇＲＮＡは、例えば、ＡｓＣｐｆ１ヌクレアーゼなどのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼと複合体形成してＲＮＰを形成し、次にこれを使用して、例えば万能性幹細胞又はその娘細胞などの標的細胞が編集される。

【０１７４】

追加的な適切なｇＲＮＡ修飾は、本開示に基づいて当業者に明らかであろう。適切なｇＲＮＡ修飾としては、例えば、そのそれぞれの内容全体が参照により本明細書に援用される、２０１８年１０月２日に出願された「ＭＯＤＩＦＩＥＤ　ＣＰＦ１　ＧＵＩＤＥ　ＲＮＡ」という名称のＰＣＴ出願ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０５４０２７号明細書；２０１５年１２月３日に出願された「ＧＵＩＤＥ　ＲＮＡ　ＷＩＴＨ　ＣＨＥＭＩＣＡＬ　ＭＯＤＩＦＩＣＡＴＩＯＮＳ」という名称のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１５／０００１４３号明細書；２０１６年４月５日に出願された「ＣＨＥＭＩＣＡＬＬＹ　ＭＯＤＩＦＩＥＤ　ＧＵＩＤＥ　ＲＮＡＳ　ＦＯＲ　ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳ－ＭＥＤＩＡＴＥＤ　ＧＥＮＥ　ＲＥＧＵＬＡＴＩＯＮ」という名称のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１６／０２６０２８号明細書；及び２０１６年９月２３日に出願された「ＮＵＣＬＥＡＳＥ－ＭＥＤＩＡＴＥＤ　ＧＥＮＯＭＥ　ＥＤＩＴＩＮＧ　ＯＦ　ＰＲＩＭＡＲＹ　ＣＥＬＬＳ　ＡＮＤ　ＥＮＲＩＣＨＭＥＮＴ　ＴＨＥＲＥＯＦ」という名称のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１６／０５３３４４号明細書に記載されているものが挙げられる。

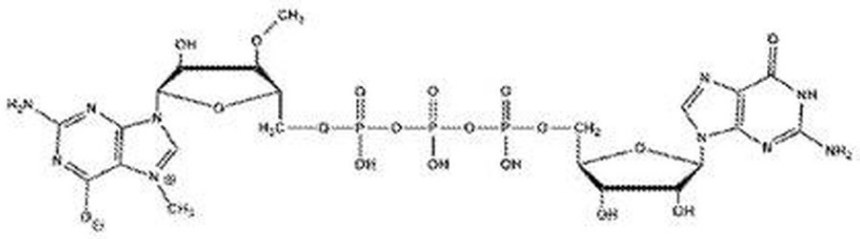
【０１７５】

このセクションで論じられる特定の例示的な修飾は、限定されないが、５’末端又はその付近（例えば、５’末端の１～１０、１～５又は１～２ヌクレオチド以内）及び／又は３’末端又はその付近（例えば、３’末端の１～１０、１～５又は１～２ヌクレオチド以内）などのｇＲＮＡ配列中の任意の位置に含まれ得る。場合により、修飾は、Ｃａｓ９　ｇＲＮＡのリピート：アンチリピート二重鎖、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１　ｇＲＮＡのステムループ構造及び／又はｇＲＮＡの標的化ドメインなどの機能的モチーフ内に位置する。

【０１７６】

一例として、ｇＲＮＡの５’末端は、以下で示されるような真核生物のｍＲＮＡキャップ構造又はＧキャップ類似体（例えば、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇキャップ類似体、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇキャップ類似体又は３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ抗キャップ類似体（ＡＲＣＡ））を含み得る。

【化１】



キャップ又はキャップ類似体は、ｇＲＮＡの化学又は酵素合成中に含まれ得る。

【０１７７】

類似した路線でｇＲＮＡの５’末端には５’三リン酸基が欠如し得る。例えば、インビトロ転写ｇＲＮＡを（例えば、仔ウシ腸アルカリホスファターゼを使用することで）ホスファターゼ処理して、５’三リン酸基が除去され得る。

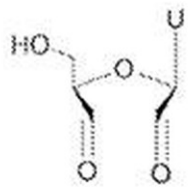
【０１７８】

別の一般的な修飾は、ｇＲＮＡの３’末端に、ポリＡトラクトと称される複数の（例えば、１～１０、１０～２０又は２５～２００個の）アデニン（Ａ）残基を付加することを伴う。ポリＡ配列は、ポリアデノシンポリメラーゼ（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ポリ（Ａ）ポリメラーゼ）を使用した化学又は酵素合成中にｇＲＮＡに付加され得る。

【０１７９】

ガイドＲＮＡは、３’末端Ｕリボースで修飾され得る。例えば、Ｕリボースの２つの末端ヒドロキシル基は、アルデヒド基に酸化され得、同時のリボース環の開環は、下に示される修飾ヌクレオシドをもたらし、

【化２】

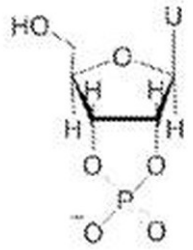


式中、「Ｕ」は、未修飾又は修飾ウリジンであり得る。

【０１８０】

３’末端Ｕリボースは、以下で示されるように２’３’環状リン酸エステルで修飾され得、

【化３】



式中、「Ｕ」は、未修飾又は修飾ウリジンであり得る。

【０１８１】

ガイドＲＮＡは、例えば、本明細書に記載の修飾ヌクレオチドの１つ又は複数を組み込むことによって分解に対して安定化され得る３’ヌクレオチドを含有し得る。特定の実施形態では、ウリジンは、例えば、５－（２－アミノ）プロピルウリジン及び５－ブロモウリジン又は本明細書に記載されるいずれかの修飾ウリジンなどの修飾ウリジンで置換され得；アデノシン及びグアノシンは、例えば、８－ブロモグアノシンなどの例えば８位が修飾された修飾アデノシン及びグアノシン又は本明細書に記載されるいずれかの修飾アデノシン又はグアノシンによって置換され得る。

【０１８２】

特定の実施形態では、糖修飾リボヌクレオチドがｇＲＮＡに組み込まれ得、例えば、２’ＯＨ基は、Ｈ、－ＯＲ、－Ｒ（式中、Ｒは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール又は糖であり得る）、ハロ、－ＳＨ、－ＳＲ（式中、Ｒは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール又は糖であり得る）、アミノ（式中、アミノは、例えば、NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ又はアミノ酸であり得る）；又はシアノ（－ＣＮ）から選択される基によって置換される。特定の実施形態では、リン酸骨格は、例えば、ホスホチオエート（ＰｈＴｘ）基で、本明細書に記載されるように修飾され得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡのヌクレオチドの１つ又は複数は、それぞれ独立して、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－メトキシエチルなどの２’－糖修飾又は例えば２’－Ｆ若しくは２’－Ｏ－メチル、アデノシン（Ａ）、２’－Ｆ若しくは２’－Ｏ－メチル、シチジン（Ｃ）、２’－Ｆ若しくは２’－Ｏ－メチル、ウリジン（Ｕ）、２’－Ｆ若しくは２’－Ｏ－メチル、チミジン（Ｔ）１，２’－Ｆ若しくは２’－Ｏ－メチル、グアノシン（Ｇ）をはじめとする２’－フルオロ修飾、２’－Ｏ－メトキシエチル－５－メチルウリジン（Ｔｅｏ）、２’－Ｏ－メトキシエチルアデノシン（Ａｅｏ）、２’－Ｏ－メトキシエチル－５－メチルシチジン（ｍ５Ｃｅ０）及びそれらの任意の組み合わせをはじめとするが、これに限定されない修飾又は未修飾ヌクレオチドであり得る。

【０１８３】

ガイドｇＲＮＡは、「ロックド」核酸（ＬＮＡ）も含み得、ここで、２’ＯＨ基は、例えば、同一リボース糖の４’炭素へのＣ１～６アルキレン又はＣ１～６ヘテロアルキレン架橋によって結合され得る。このような架橋を提供するために、限定されないが、メチレン、プロピレン、エーテル又はアミノ架橋；Ｏ－アミノ（式中、アミノは、例えば、NH_2、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン又はポリアミノであり得る）及びアミノアルコキシ又はＯ（CH_2）$_n$－アミノ（式中、アミノは、例えば、NH_2、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ又はジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン又はポリアミノであり得る）をはじめとする任意の適切な部分が使用され得る。

【０１８４】

特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、多環である修飾ヌクレオチド（例えば、トリシクロ

；及びグリコール核酸（ＧＮＡ）などの「アンロックド」形態（例えば、その中でリボースがリン酸ジエステル結合に付着するグリコール単位で置換される、Ｒ－ＧＮＡ又はＳ－ＧＮＡ）又はトレオース核酸（その中でリボースがα－Ｌ－トレオフラノシル－（３’→２’）で置換されるＴＮＡ）を含み得る。

【０１８５】

一般に、ｇＲＮＡは、酸素を有する５員環の糖類であるリボースを含む。代表的な修飾ｇＲＮＡとしては、限定されないが、リボース中の酸素の置換（例えば、硫黄（Ｓ）、セレン（Ｓｅ）又は例えばメチレン又はエチレンなどのアルキレンによる）；二重結合の付加（例えば、リボースをシクロペンテニル又はシクロヘキセニルで置換する）；リボース環縮小（例えば、シクロブタン又はオキセタンの４員環を形成する）；リボース環拡大（例えば、アンヒドロヘキシトール、アルトリトール、マンニトール、シクロヘキサニル、シクロヘキセニル及びホスホロアミダート骨格も有するモルホリノなどの追加的な炭素又はヘテロ原子を有する６又は７員環を形成する）が挙げられる。糖類似体改変の大部分は、２’位に局在するが、４’位をはじめとする他の部位も修飾を受け入れ易い。特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、４’－Ｓ、４’－Ｓｅ又は４’－Ｃ－アミノメチル－２’－Ｏ－Ｍｅ修飾を含む。

【０１８６】

特定の実施形態では、例えば、７－デアザ－アデノシンなどのデアザヌクレオチドがｇＲＮＡに組み込まれ得る。特定の実施形態では、例えばＮ６－メチルアデノシンなどのＯ－及びＮ－アルキル化ヌクレオチドがｇＲＮＡに組み込まれ得る。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ中の１つ又は複数の又は全てのヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドである。

【０１８７】

ガイドＲＮＡは、ｃｒＲＮＡの相補的領域（３’末端）とｔｒａｃｒＲＮＡ（５’末端）との間の１つ又は複数の架橋も含み得る（例えば、「テトラループ」構造内及び／又はｇＲＮＡ内で発生する任意のステムループ構造内に配置される）。様々なリンカーが使用に適する。例えば、ガイドＲＮＡは、限定されることなく、ポリビニルエーテル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリグリコリド（ＰＧＡ）、ポリラクチド（ＰＬＡ）、ポリカプロラクトン（ＰＣＬ）及びこれらの共重合体などの共通結合部分を含み得る。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、二官能性架橋剤が使用されて、第１のｇＲＮＡ断片の５’末端と第２のｇＲＮＡ断片の３’末端が連結され、連結されるｇＲＮＡ断片の３’又は５’末端は、架橋剤の反応性基と反応する官能基で修飾される。一般に、これらの修飾は、アミン、スルフヒドリル、カルボキシル、ヒドロキシル、アルケン（例えば、末端アルケン）、アジ化物及び／又は別の適切な官能基の１つ又は複数を含む。多官能性（例えば、二官能性）架橋剤も当技術分野で一般に公知であり、ヘテロ機能異種官能性又は同種官能性のいずれでもあり得、イソチオシアネート、イソシアネート、アシルアジ化物、ＮＨＳエステル、塩化スルホニル、トシルエステル、トレシルエステル、アルデヒド、アミン、エポキシド、炭酸塩（例えば、ビス（ｐ－ニトロフェニル）炭酸塩）、アリールハロゲン化物、ハロゲン化アルキル、イミドエステル、カルボン酸塩、アルキルリン酸塩、酸無水物、フルオロフェニルエステル、ＨＯＢｔエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、Ｏ－メチルイソ尿素、ＤＳＣ、ＮＨＳカルバメート、グルタルアルデヒド、活性化二重結合、環状ヘミアセタール、ＮＨＳ炭酸塩、イミダゾールカルバメート、アシルイミダゾール、メチルピリジニウムエーテル、アズラクトン、シアネートエステル、環状イミド炭酸塩、クロロトリアジン、デヒドロアゼピン、６－スルホ－シトシン誘導体、マレイミド、アジリジン、ＴＮＢチオール、エルマン試薬、過酸化物、ビニルスルホン、フェニルチオエステル、ジアゾアルカン、ジアゾアセチル、エポキシド、ジアゾニウム、ベンゾフェノン、アントラキノン、ジアゾ誘導体、ジアジリン誘導体、ソラレン誘導体、アルケン、フェニルボロン酸などをはじめとするがこれに限定されない、任意の適切な官能基を含み得る。いく

つかの実施形態では、第１のｇＲＮＡ断片は第１の反応性基を含み、第２のｇＲＮＡ断片は第２の反応性基を含む。例えば、第１及び第２の反応性基はそれぞれ、炭酸塩含有二官能性架橋試薬を用いて架橋されて尿素結合を形成する、アミン部分を含み得る。他の場合、（ａ）第１の反応性基はブロモアセチル部分を含み、第２の反応性基はスルフヒドリル部分を含むか、又は（ｂ）第１の反応性基はスルフヒドリル部分を含み、第２の反応性基はブロモアセチル部分を含み、ブロモアセチル部分とスルフヒドリル部分を反応させてブロモアセチル－チオール結合を形成することによって架橋される。これら及び他の架橋化学は、当技術分野で公知であり、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓによって公開されたＧｒｅｇ　Ｔ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，３ｒｄ　Ｅｄ．２０１３をはじめとする文献に要約されている。

【０１８９】

追加的な適切なｇＲＮＡ修飾は、本開示に基づいて当業者に明らかであろう。適切なｇＲＮＡ修飾としては、例えば、そのそれぞれの内容全体が参照により本明細書に援用される、２０１８年１０月２日に出願された「ＭＯＤＩＦＩＥＤ　ＣＰＦ１　ＧＵＩＤＥ　ＲＮＡ」という名称のＰＣＴ出願ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０５４０２７号明細書；２０１５年１２月３日に出願された「ＧＵＩＤＥ　ＲＮＡ　ＷＩＴＨ　ＣＨＥＭＩＣＡＬ　ＭＯＤＩＦＩＣＡＴＩＯＮＳ」という名称のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１５／０００１４３号明細書；２０１６年４月５日に出願された「ＣＨＥＭＩＣＡＬＬＹ　ＭＯＤＩＦＩＥＤ　ＧＵＩＤＥ　ＲＮＡＳ　ＦＯＲ　ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳ－ＭＥＤＩＡＴＥＤ　ＧＥＮＥ　ＲＥＧＵＬＡＴＩＯＮ」という名称のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１６／０２６０２８号明細書；及び２０１６年９月２３日に出願された「ＮＵＣＬＥＡＳＥ－ＭＥＤＩＡＴＥＤ　ＧＥＮＯＭＥ　ＥＤＩＴＩＮＧ　ＯＦ　ＰＲＩＭＡＲＹ　ＣＥＬＬＳ　ＡＮＤ　ＥＮＲＩＣＨＭＥＮＴ　ＴＨＥＲＥＯＦ」という名称のＰＣＴ出願第ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１６／０５３３４４号明細書に記載されているものが挙げられる。

【０１９０】

例示的なｇＲＮＡ

本開示に包含される特定の実施形態に適したガイドＲＮＡの非限定的な例は、本明細書において例えば以下の表に提供される。当業者は、ＤＮＡ又はＲＮＡ配列のいずれかとしての標的化ドメイン配列の開示から、例えばＣａｓ９又はＣｐｆ－１ヌクレアーゼなどの特定のヌクレアーゼのための適切なガイドＲＮＡ配列を予見できるであろう。例えば、ＲＮＡヌクレオチドからなる標的配列を含むガイドＲＮＡは、ＤＮＡ配列として提供される標的ドメイン配列に対応するＲＮＡ配列を含み、これは、チミジンヌクレオチドの代わりにウラシルを含む。例えば、ＲＮＡヌクレオチドからなる標的化ドメイン配列を含み、ＤＮＡ配列ＴＣＴＧＣＡＧＡＡＡＴＧＴＴＣＣＣＣＧＴ（配列番号２４）によって記載されているガイドＲＮＡは、対応するＲＮＡ配列ＵＣＵＧＣＡＧＡＡＡＵＧＵＵＣＣＣＣＧＵ（配列番号２５）の標的化ドメインを有するであろう。当業者に明らかであるように、このような標的化配列は、例えば、ｃｒＲＮＡスキャフォールド配列又はキメラｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡスキャフォールド配列などの適切なガイドＲＮＡスキャフォールドに連結されるであろう。適切なｇＲＮＡスキャフォールド配列は、当業者に知られている。ＡｓＣｐｆ１の場合、例えば、適切なスキャフォールド配列は、標的化ドメインの５’末端に付加された配列ＵＡＡＵＵＵＣＵＡＣＵＣＵＵＧＵＡＧＡＵ（配列番号２６）を含む。上記の例では、これは、配列ＵＡＡＵＵＵＣＵＡＣＵＣＵＵＧＵＡＧＡＵＵＣＵＧＣＡＧＡＡＡＵＧＵＵＣＣＣＣＧＵ（配列番号２７）のＣｐｆ１ガイドＲＮＡをもたらすであろう。当業者は、例えば、ＤＮＡ伸長を付加することにより、このようなガイドＲＮＡを修飾する方法をさらに理解するであろう（例えば、上記の例では、本明細書に記載されているような２５量体のＤＮＡ伸長を付加することは、配列ＡＴＧＴＧＴＴＴＴＧＴＣＡＡＡＧＡＣＣＴＴＴＴｒＵｒＡｒＡｒＵｒＵｒＵｒＣｒＵｒＡｒＣｒＵｒＣｒＵｒＵｒＧｒＵｒＡｒＧｒＡｒＵｒＵｒＣｒＵｒＧｒＣｒＡｒＧｒＡｒＡｒＡｒＵｒＧｒＵｒＵｒＣｒＣｒＣｒＣｒＧｒＵ）（配列番号２８）のガイドＲＮＡをもたらすであろう）。本明

細書で提供される例示的な標的化配列は限定的なものではなく、例えば、本明細書で開示される特異的配列の変異型などの追加的な適切な配列は、当技術分野の一般的な知識に鑑みて、本開示に基づいて当業者に明らかであろう。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＴＧＦβＲＩＩを標的化するｇＲＮＡ（ＴＧＦβＲＩＩ　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、ＴＧＦβＲＩＩを標的化するｇＲＮＡは、表４に記載されているｇＲＮＡの１つ又は複数である。

【０１９２】

【表６】

表4: 例示的なTGFβRII gRNA

名称	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	長さ	酵素	配列番号
TGFBR24326	CAGGACGATGTGCAGCGGCC	20	AsCpf1 RR	29
TGFBR24327	ACCGCACGTTCAGAAGTCGG	20	AsCpf1 RR	30
TGFBR24328	ACAACTGTGTAAATTTTGTG	20	AsCpf1 RR	31
TGFBR24329	CAACTGTGTAAATTTTGTGA	20	AsCpf1 RR	32
TGFBR24330	ACCTGTGACAACCAGAAATC	20	AsCpf1 RR	33
TGFBR24331	CCTGTGACAACCAGAAATCC	20	AsCpf1 RR	34

【０１９３】

【表７】

TGFBR24332	TGTGGCTTCTCACAGATGGA	20	AsCpf1 RR	35
TGFBR24333	TCTGTGAGAAGCCACAGGAA	20	AsCpf1 RR	36
TGFBR24334	AAGCTCCCCTACCATGACTT	20	AsCpf1 RR	37
TGFBR24335	GAATAAAGTCATGGTAGGGG	20	AsCpf1 RR	38
TGFBR24336	AGAATAAAGTCATGGTAGGG	20	AsCpf1 RR	39
TGFBR24337	CTACCATGACTTTATTCTGG	20	AsCpf1 RR	40
TGFBR24338	TACCATGACTTTATTCTGGA	20	AsCpf1 RR	41
TGFBR24339	TAATGCACTTTGGAGAAGCA	20	AsCpf1 RR	42
TGFBR24340	TTCATAATGCACTTTGGAGA	20	AsCpf1 RR	43
TGFBR24341	AAGTGCATTATGAAGGAAAA	20	AsCpf1 RR	44
TGFBR24342	TGTGTTCCTGTAGCTCTGAT	20	AsCpf1 RR	45
TGFBR24343	TGTAGCTCTGATGAGTGCAA	20	AsCpf1 RR	46
TGFBR24344	AGTGACAGGCATCAGCCTCC	20	AsCpf1 RR	47
TGFBR24345	AGTGGTGGCAGGAGGCTGAT	20	AsCpf1 RR	48
TGFBR24346	AGGTTGAACTCAGCTTCTGC	20	AsCpf1 RR	49
TGFBR24347	CAGGTTGAACTCAGCTTCTG	20	AsCpf1 RR	50
TGFBR24348	ACCTGGGAAACCGGCAAGAC	20	AsCpf1 RR	51
TGFBR24349	CGTCTTGCCGGTTTCCCAGG	20	AsCpf1 RR	52
TGFBR24350	GCGTCTTGCCGGTTTCCCAG	20	AsCpf1 RR	53
TGFBR24351	TGAGCTTCCGCGTCTTGCCG	20	AsCpf1 RR	54
TGFBR24352	GCGAGCACTGTGCCATCATC	20	AsCpf1 RR	55
TGFBR24353	GGATGATGGCACAGTGCTCG	20	AsCpf1 RR	56
TGFBR24354	AGGATGATGGCACAGTGCTC	20	AsCpf1 RR	57
TGFBR24355	CGTGTGCCAACAACATCAAC	20	AsCpf1 RR	58
TGFBR24356	GCTCAATGGGCAGCAGCTCT	20	AsCpf1 RR	59

【０１９４】

【表８】

TGFBR24357	ACCAGGGTGTCCAGCTCAAT	20	AsCpf1 RR	60
TGFBR24358	CACCAGGGTGTCCAGCTCAA	20	AsCpf1 RR	61
TGFBR24359	CCACCAGGGTGTCCAGCTCA	20	AsCpf1 RR	62
TGFBR24360	GCTTGGCCTTATAGACCTCA	20	AsCpf1 RR	63
TGFBR24361	GAGCAGTTTGAGACAGTGGC	20	AsCpf1 RR	64
TGFBR24362	AGAGGCATACTCCTCATAGG	20	AsCpf1 RR	65
TGFBR24363	CTATGAGGAGTATGCCTCTT	20	AsCpf1 RR	66
TGFBR24364	AAGAGGCATACTCCTCATAG	20	AsCpf1 RR	67
TGFBR24365	TATGAGGAGTATGCCTCTTG	20	AsCpf1 RR	68
TGFBR24366	GATTGATGTCTGAGAAGATG	20	AsCpf1 RR	69
TGFBR24367	CTCCTCAGCCGTCAGGAACT	20	AsCpf1 RR	70
TGFBR24368	GTTCCTGACGGCTGAGGAGC	20	AsCpf1 RR	71
TGFBR24369	GCTCCTCAGCCGTCAGGAAC	20	AsCpf1 RR	72
TGFBR24370	TGACGGCTGAGGAGCGGAAG	20	AsCpf1 RR	73
TGFBR24371	TCTTCCGCTCCTCAGCCGTC	20	AsCpf1 RR	74
TGFBR24372	AACTCCGTCTTCCGCTCCTC	20	AsCpf1 RR	75
TGFBR24373	CAACTCCGTCTTCCGCTCCT	20	AsCpf1 RR	76
TGFBR24374	CCAACTCCGTCTTCCGCTCC	20	AsCpf1 RR	77
TGFBR24375	ACGCCAAGGGCAACCTACAG	20	AsCpf1 RR	78
TGFBR24376	CGCCAAGGGCAACCTACAGG	20	AsCpf1 RR	79
TGFBR24377	AGCTGATGACATGCCGCGTC	20	AsCpf1 RR	80
TGFBR24378	GGGCGAGGGAGCTGCCCAGC	20	AsCpf1 RR	81
TGFBR24379	CGGGCGAGGGAGCTGCCCAG	20	AsCpf1 RR	82
TGFBR24380	CCGGGCGAGGGAGCTGCCCA	20	AsCpf1 RR	83
TGFBR24381	TCGCCCGGGGGATTGCTCAC	20	AsCpf1 RR	84

【０１９５】

【表９】

TGFBR24382	ACATGGAGTGTGATCACTGT	20	AsCpf1 RR	85
TGFBR24383	CAGTGATCACACTCCATGTG	20	AsCpf1 RR	86
TGFBR24384	TGTGGGAGGCCCAAGATGCC	20	AsCpf1 RR	87
TGFBR24385	TGTGCACGATGGGCATCTTG	20	AsCpf1 RR	88
TGFBR24386	CGAGGATATTGGAGCTCTTG	20	AsCpf1 RR	89
TGFBR24387	ATATCCTCGTGAAGAACGAC	20	AsCpf1 RR	90
TGFBR24388	GACGCAGGGAAAGCCCAAAG	20	AsCpf1 RR	91
TGFBR24389	CTGCGTCTGGACCCTACTCT	20	AsCpf1 RR	92
TGFBR24390	TGCGTCTGGACCCTACTCTG	20	AsCpf1 RR	93
TGFBR24391	CAGACAGAGTAGGGTCCAGA	20	AsCpf1 RR	94
TGFBR24392	GCCAGCACGATCCCACCGCA	20	AsCpf1 RVR	95
TGFBR24393	AAGGAAAAAAAAAAGCCTGG	20	AsCpf1 RVR	96
TGFBR24394	ACACCAGCAATCCTGACTTG	20	AsCpf1 RVR	97
TGFBR24395	ACTAGCAACAAGTCAGGATT	20	AsCpf1 RVR	98
TGFBR24396	GCAACTCCCAGTGGTGGCAG	20	AsCpf1 RVR	99
TGFBR24397	TGTCATCATCATCTTCTACT	20	AsCpf1 RVR	100
TGFBR24398	GACCTCAGCAAAGCGACCTT	20	AsCpf1 RVR	101
TGFBR24399	AGGCCAAGCTGAAGCAGAAC	20	AsCpf1 RVR	102
TGFBR24400	AGGAGTATGCCTCTTGGAAG	20	AsCpf1 RVR	103
TGFBR24401	CCTCTTGGAAGACAGAGAAG	20	AsCpf1 RVR	104
TGFBR24402	TTCTCATGCTTCAGATTGAT	20	AsCpf1 RVR	105
TGFBR24403	CTCGTGAAGAACGACCTAAC	20	AsCpf1 RVR	106
TGFbR2036	GGCCGCTGCACATCGTCCTG	20	SpyCas9	107
TGFbR2037	GCGGGGTCTGCCATGGGTCG	20	SpyCas9	108
TGFbR2038	AGTTGCTCATGCAGGATTTC	20	SpyCas9	109

【０１９６】

【表１０】

TGFbR2039	CCAGAATAAAGTCATGGTAG	20	SpyCas9	110
TGFbR2040	CCCCTACCATGACTTTATTC	20	SpyCas9	111
TGFbR2041	AAGTCATGGTAGGGGAGCTT	20	SpyCas9	112
TGFbR2042	AGTCATGGTAGGGGAGCTTG	20	SpyCas9	113
TGFbR2043	ATTGCACTCATCAGAGCTAC	20	SpyCas9	114
TGFbR2044	CCTAGAGTGAAGAGATTCAT	20	SpyCas9	115
TGFbR2045	CCAATGAATCTCTTCACTCT	20	SpyCas9	116
TGFbR2046	AAAGTCATGGTAGGGGAGCT	20	SpyCas9	117
TGFbR2047	GTGAGCAATCCCCCGGGCGA	20	SpyCas9	118
TGFbR2048	GTCGTTCTTCACGAGGATAT	20	SpyCas9	119
TGFbR2049	GCCGCGTCAGGTACTCCTGT	20	SpyCas9	120
TGFbR2050	GACGCGGCATGTCATCAGCT	20	SpyCas9	121
TGFbR2051	GCTTCTGCTGCCGGTTAACG	20	SpyCas9	122
TGFbR2052	GTGGATGACCTGGCTAACAG	20	SpyCas9	123
TGFbR2053	GTGATCACACTCCATGTGGG	20	SpyCas9	124
TGFbR2054	GCCCATTGAGCTGGACACCC	20	SpyCas9	125
TGFbR2055	GCGGTCATCTTCCAGGATGA	20	SpyCas9	126
TGFbR2056	GGGAGCTGCCCAGCTTGCGC	20	SpyCas9	127
TGFbR2057	GTTGATGTTGTTGGCACACG	20	SpyCas9	128
TGFbR2058	GGCATCTTGGGCCTCCCACA	20	SpyCas9	129
TGFbR2059	GCGGCATGTCATCAGCTGGG	20	SpyCas9	130
TGFbR2060	GCTCCTCAGCCGTCAGGAAC	20	SpyCas9	131
TGFbR2061	GCTGGTGTTATATTCTGATG	20	SpyCas9	132
TGFbR2062	CCGACTTCTGAACGTGCGGT	20	SpyCas9	133
TGFbR2063	TGCTGGCGATACGCGTCCAC	20	SpyCas9	134

【０１９７】

【表１１】

TGFbR2064	CCCGACTTCTGAACGTGCGG	20	SpyCas9	135
TGFbR2065	CCACCGCACGTTCAGAAGTC	20	SpyCas9	136
TGFbR2066	TCACCCGACTTCTGAACGTG	20	SpyCas9	137
TGFbR2067	CCCACCGCACGTTCAGAAGT	20	SpyCas9	138
TGFbR2068	CGAGCAGCGGGGTCTGCCAT	20	SpyCas9	139
TGFbR2069	ACGAGCAGCGGGGTCTGCCA	20	SpyCas9	140
TGFbR2070	AGCGGGGTCTGCCATGGGTC	20	SpyCas9	141
TGFbR2071	CCTGAGCAGCCCCCGACCCA	20	SpyCas9	142
TGFbR2072	CCATGGGTCGGGGGCTGCTC	20	SpyCas9	143
TGFbR2073	AACGTGCGGTGGGATCGTGC	20	SpyCas9	144
TGFbR2074	GGACGATGTGCAGCGGCCAC	20	SpyCas9	145
TGFbR2075	GTCCACAGGACGATGTGCAG	20	SpyCas9	146
TGFbR2076	CATGGGTCGGGGGCTGCTCA	20	SpyCas9	147
TGFbR2077	CAGCGGGGTCTGCCATGGGT	20	SpyCas9	148
TGFbR2078	ATGGGTCGGGGGCTGCTCAG	20	SpyCas9	149
TGFbR2079	CGGGGTCTGCCATGGGTCGG	20	SpyCas9	150
TGFbR2080	AGGAAGTCTGTGTGGCTGTA	20	SpyCas9	151
TGFbR2081	CTCCATCTGTGAGAAGCCAC	20	SpyCas9	152
TGFbR2082	ATGATAGTCACTGACAACAA	20	SpyCas9	153
TGFbR2083	GATGCTGCAGTTGCTCATGC	20	SpyCas9	154
TGFbR2084	ACAGCCACACAGACTTCCTG	20	SpyCas9	155
TGFbR2085	GAAGCCACAGGAAGTCTGTG	20	SpyCas9	156
TGFbR2086	TTCCTGTGGCTTCTCACAGA	20	SpyCas9	157
TGFbR2087	CTGTGGCTTCTCACAGATGG	20	SpyCas9	158
TGFbR2088	TCACAAAATTTACACAGTTG	20	SpyCas9	159

【０１９８】

【表１２】

TGFbR2089	GACAACATCATCTTCTCAGA	20	SpyCas9	160
TGFbR2090	TCCAGAATAAAGTCATGGTA	20	SpyCas9	161
TGFbR2091	GGTAGGGGAGCTTGGGGTCA	20	SpyCas9	162
TGFbR2092	TTCTCCAAAGTGCATTATGA	20	SpyCas9	163
TGFbR2093	CATCTTCCAGAATAAAGTCA	20	SpyCas9	164
TGFbR2094	CACATGAAGAAAGTCTCACC	20	SpyCas9	165
TGFbR2095	TTCCAGAATAAAGTCATGGT	20	SpyCas9	166
TGFbR2096	TTTTCCTTCATAATGCACTT	20	SpyCas9	167
TGFBR24024	CACAGTTGTGGAAACTTGAC	20	AsCpf1	168
TGFBR24039	CCCAACTCCGTCTTCCGCTC	20	AsCpf1	169
TGFBR24040	GGCTTTCCCTGCGTCTGGAC	20	AsCpf1	170
TGFBR24036	CTGAGGTCTATAAGGCCAAG	20	AsCpf1	171
TGFBR24026	TGATGTGAGATTTTCCACCT	20	AsCpf1	172
TGFBR24038	CCTATGAGGAGTATGCCTCT	20	AsCpf1	173
TGFBR24033	AAGTGACAGGCATCAGCCTC	20	AsCpf1	174
TGFBR24028	CCATGACCCCAAGCTCCCCT	20	AsCpf1	175
TGFBR24031	CTTCATAATGCACTTTGGAG	20	AsCpf1	176
TGFBR24032	TTCATGTGTTCCTGTAGCTC	20	AsCpf1	177
TGFBR24029	TTCTGGAAGATGCTGCTTCT	20	AsCpf1	178
TGFBR24035	CCCACCAGGGTGTCCAGCTC	20	AsCpf1	179
TGFBR24037	AGACAGTGGCAGTCAAGATC	20	AsCpf1	180
TGFBR24041	CCTGCGTCTGGACCCTACTC	20	AsCpf1	181
TGFBR24025	CACAACTGTGTAAATTTTGT	20	AsCpf1	182
TGFBR24030	GAGAAGCAGCATCTTCCAGA	20	AsCpf1	183
TGFBR24027	TGGTTGTCACAGGTGGAAAA	20	AsCpf1	184

【０１９９】

【表１３】

TGFBR24034	CCAGGTTGAACTCAGCTTCT	20	AsCpf1	185
TGFBR24043	ATCACAAAATTTACACAGTTG	21	SauCas9	186
TGFBR24065	GGCATCAGCCTCCTGCCACCA	21	SauCas9	187
TGFBR24110	GTTAGCCAGGTCATCCACAGA	21	SauCas9	188
TGFBR24099	GCTGGGCAGCTCCCTCGCCCG	21	SauCas9	189
TGFBR24064	CAGGAGGCTGATGCCTGTCAC	21	SauCas9	190
TGFBR24094	GAGGAGCGGAAGACGGAGTTG	21	SauCas9	191
TGFBR24108	CGTCTGGACCCTACTCTGTCT	21	SauCas9	192
TGFBR24058	TTTTTCCTTCATAATGCACTT	21	SauCas9	193
TGFBR24075	CCATTGAGCTGGACACCCTGG	21	SauCas9	194
TGFBR24057	CTTCTCCAAAGTGCATTATGA	21	SauCas9	195
TGFBR24103	GCCCAAGATGCCCATCGTGCA	21	SauCas9	196
TGFBR24060	TCATGTGTTCCTGTAGCTCTG	21	SauCas9	197
TGFBR24048	GTGATGCTGCAGTTGCTCATG	21	SauCas9	198
TGFBR24087	TCTCATGCTTCAGATTGATGT	21	SauCas9	199
TGFBR24081	TCCCTATGAGGAGTATGCCTC	21	SauCas9	200
TGFBR24044	CATCACAAAATTTACACAGTT	21	SauCas9	201
TGFBR24077	ATTGAGCTGGACACCCTGGTG	21	SauCas9	202
TGFBR24080	CAGTCAAGATCTTTCCCTATG	21	SauCas9	203
TGFBR24046	AGGATTTCTGGTTGTCACAGG	21	SauCas9	204
TGFBR24101	TCCACAGTGATCACACTCCAT	21	SauCas9	205
TGFBR24079	AGCAGAACACTTCAGAGCAGT	21	SauCas9	206
TGFBR24072	CCGGCAAGACGCGGAAGCTCA	21	SauCas9	207
TGFBR24074	GATGTCAGAGCGGTCATCTTC	21	SauCas9	208
TGFBR24062	TCATTGCACTCATCAGAGCTA	21	SauCas9	209

【０２００】

【表１４】

TGFBR24054	CTTCCAGAATAAAGTCATGGT	21	SauCas9	210
TGFBR24045	AGATTTTCCACCTGTGACAAC	21	SauCas9	211
TGFBR24049	ACTGCAGCATCACCTCCATCT	21	SauCas9	212
TGFBR24098	AGCTGGGCAGCTCCCTCGCCC	21	SauCas9	213
TGFBR24090	TGACGGCTGAGGAGCGGAAGA	21	SauCas9	214
TGFBR24076	CATTGAGCTGGACACCCTGGT	21	SauCas9	215
TGFBR24078	AGCAAAGCGACCTTTCCCCAC	21	SauCas9	216
TGFBR24067	CGCGTTAACCGGCAGCAGAAG	21	SauCas9	217
TGFBR24063	GAAATATGACTAGCAACAAGT	21	SauCas9	218
TGFBR24107	AGACAGAGTAGGGTCCAGACG	21	SauCas9	219
TGFBR24047	CAGGATTTCTGGTTGTCACAG	21	SauCas9	220
TGFBR24096	CTCCTGTAGGTTGCCCTTGGC	21	SauCas9	221
TGFBR24105	ACAGAGTAGGGTCCAGACGCA	21	SauCas9	222
TGFBR24056	GCTTCTCCAAAGTGCATTATG	21	SauCas9	223
TGFBR24068	GCAGCAGAAGCTGAGTTCAAC	21	SauCas9	224
TGFBR24093	TGAGGAGCGGAAGACGGAGTT	21	SauCas9	225
TGFBR24055	CTTTGGAGAAGCAGCATCTTC	21	SauCas9	226
TGFBR24053	CTCCCCTACCATGACTTTATT	21	SauCas9	227
TGFBR24106	GACAGAGTAGGGTCCAGACGC	21	SauCas9	228
TGFBR24092	CTGAGGAGCGGAAGACGGAGT	21	SauCas9	229
TGFBR24102	GGGCATCTTGGGCCTCCCACA	21	SauCas9	230
TGFBR24082	CCAAGAGGCATACTCCTCATA	21	SauCas9	231
TGFBR24051	AGAATGACGAGAACATAACAC	21	SauCas9	232
TGFBR24097	CCTGACGCGGCATGTCATCAG	21	SauCas9	233
TGFBR24073	AGCGAGCACTGTGCCATCATC	21	SauCas9	234

【０２０１】

【表１５】

TGFBR24104	GCAGGTTAGGTCGTTCTTCAC	21	SauCas9	235
TGFBR24050	ACCTCCATCTGTGAGAAGCCA	21	SauCas9	236
TGFBR24052	TAAAGTCATGGTAGGGGAGCT	21	SauCas9	237
TGFBR24061	TCAGAGCTACAGGAACACATG	21	SauCas9	238
TGFBR24086	TCTCAGACATCAATCTGAAGC	21	SauCas9	239
TGFBR24066	CATCAGCCTCCTGCCACCACT	21	SauCas9	240
TGFBR24089	CGCTCCTCAGCCGTCAGGAAC	21	SauCas9	241
TGFBR24071	AACCTGGGAAACCGGCAAGAC	21	SauCas9	242
TGFBR24095	TCCACGCCAAGGGCAACCTAC	21	SauCas9	243
TGFBR24100	GAGGTGAGCAATCCCCCGGGC	21	SauCas9	244
TGFBR24069	CAGCAGAAGCTGAGTTCAACC	21	SauCas9	245
TGFBR24083	TCCAAGAGGCATACTCCTCAT	21	SauCas9	246
TGFBR24070	AGCAGAAGCTGAGTTCAACCT	21	SauCas9	247
TGFBR24088	CCAGTTCCTGACGGCTGAGGA	21	SauCas9	248
TGFBR24085	AGGAGTATGCCTCTTGGAAGA	21	SauCas9	249
TGFBR24084	TTCCAAGAGGCATACTCCTCA	21	SauCas9	250
TGFBR24042	CAACTGTGTAAATTTTGTGAT	21	SauCas9	251
TGFBR24059	TGAAGGAAAAAAAAAAAGCCTG	21	SauCas9	252
TGFBR24091	CGTCTTCCGCTCCTCAGCCGT	21	SauCas9	253
TGFBR24109	CCAGGTCATCCACAGACAGAG	21	SauCas9	254
TGFBR2736	GCCTAGAGTGAAGAGATTCAT	21	SpyCas9	255
TGFBR2737	GTTCTCCAAAGTGCATTATGA	21	SpyCas9	256
TGFBR2738	GCATCTTCCAGAATAAAGTCA	21	SpyCas9	257
TGFBR2739	TGATGTGAGATTTTCCACCTG	21	Cas12a	1172

【０２０２】

いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的化するｇＲＮＡ（ＣＩＳＨ　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、ＣＩＳＨを標的化するｇＲＮＡは、表５に記載されているｇＲＮＡの１つ又は複数である。

【０２０３】

【表１６】

表5：例示的なCISH gRNA

名称	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	長さ	酵素	配列番号
CISH0873	CAACCGTCTGGTGGCCGACG	20	SpyCas9	258
CISH0874	CAGGATCGGGGCTGTCGCTT	20	SpyCas9	259
CISH0875	TCGGGCCTCGCTGGCCGTAA	20	SpyCas9	260
CISH0876	GAGGTAGTCGGCCATGCGCC	20	SpyCas9	261
CISH0877	CAGGTGTTGTCGGGCCTCGC	20	SpyCas9	262
CISH0878	GGAGGTAGTCGGCCATGCGC	20	SpyCas9	263
CISH0879	GGCATACTCAATGCGTACAT	20	SpyCas9	264
CISH0880	CCGCCTTGTCATCAACCGTC	20	SpyCas9	265
CISH0881	AGGATCGGGGCTGTCGCTTC	20	SpyCas9	266
CISH0882	CCTTGTCATCAACCGTCTGG	20	SpyCas9	267
CISH0883	TACTCAATGCGTACATTGGT	20	SpyCas9	268
CISH0884	GGGTTCCATTACGGCCAGCG	20	SpyCas9	269
CISH0885	GGCACTGCTTCTGCGTACAA	20	SpyCas9	270
CISH0886	GGTTGATGACAAGGCGGCAC	20	SpyCas9	271
CISH0887	TGCTGGGGCCTTCCTCGAGG	20	SpyCas9	272
CISH0888	TTGCTGGCTGTGGAGCGGAC	20	SpyCas9	273
CISH0889	TTCTCCTACCTTCGGGAATC	20	SpyCas9	274
CISH0890	GACTGGCTTGGGCAGTTCCA	20	SpyCas9	275
CISH0891	CATGCAGCCCTTGCCTGCTG	20	SpyCas9	276
CISH0892	AGCAAAGGACGAGGTCTAGA	20	SpyCas9	277

【０２０４】

【表１７】

CISH0893	GCCTGCTGGGGCCTTCCTCG	20	SpyCas9	278
CISH0894	CAGACTCACCAGATTCCCGA	20	SpyCas9	279
CISH0895	ACCTCGTCCTTTGCTGGCTG	20	SpyCas9	280
CISH0896	CTCACCAGATTCCCGAAGGT	20	SpyCas9	281
CISH7048	TACGCAGAAGCAGTGCCCGC	20	AsCpf1	282
CISH7049	AGGTGTACAGCAGTGGCTGG	20	AsCpf1	283
CISH7050	GGTGTACAGCAGTGGCTGGT	20	AsCpf1	284
CISH7051	CGGATGTGGTCAGCCTTGTG	20	AsCpf1	285
CISH7052	CACTGACAGCGTGAACAGGT	20	AsCpf1	286
CISH7053	ACTGACAGCGTGAACAGGTA	20	AsCpf1	287
CISH7054	GCTCACTCTCTGTCTGGGCT	20	AsCpf1	288
CISH7055	CTGGCTGTGGAGCGGACTGG	20	AsCpf1	289
CISH7056	GCTCTGACTGTACGGGGCAA	20	AsCpf1 RR	290
CISH7057	AGCTCTGACTGTACGGGGCA	20	AsCpf1 RR	291
CISH7058	ACAGTACCCCTTCCAGCTCT	20	AsCpf1 RR	292
CISH7059	CGTCGGCCACCAGACGGTTG	20	AsCpf1 RR	293
CISH7060	CCAGCCACTGCTGTACACCT	20	AsCpf1 RR	294
CISH7061	ACCCCGGCCCTGCCTATGCC	20	AsCpf1 RR	295
CISH7062	GGTATCAGCAGTGCAGGAGG	20	AsCpf1 RR	296
CISH7063	GATGTGGTCAGCCTTGTGCA	20	AsCpf1 RR	297
CISH7064	GGATGTGGTCAGCCTTGTGC	20	AsCpf1 RR	298
CISH7065	GGCCACGCATCCTGGCCTTT	20	AsCpf1 RR	299
CISH7066	GAAAGGCCAGGATGCGTGGC	20	AsCpf1 RR	300
CISH7067	ACTGCTTGTCCAGGCCACGC	20	AsCpf1 RR	301
CISH7068	TCTGGACTCCAACTGCTTGT	20	AsCpf1 RR	302

【０２０５】

【表１８】

CISH7069	GTCTGGACTCCAACTGCTTG	20	AsCpf1 RR	303
CISH7070	GCTTCCGTCTGGACTCCAAC	20	AsCpf1 RR	304
CISH7071	GACGGAAGCTGGAGTCGGCA	20	AsCpf1 RR	305
CISH7072	CGCTGTCAGTGAAAACCACT	20	AsCpf1 RR	306
CISH7073	CTGACAGCGTGAACAGGTAG	20	AsCpf1 RR	307
CISH7074	TTACGGCCAGCGAGGCCCGA	20	AsCpf1 RR	308
CISH7075	ATTACGGCCAGCGAGGCCCG	20	AsCpf1 RR	309
CISH7076	GGAATCTGGTGAGTCTGAGG	20	AsCpf1 RR	310
CISH7077	CCCTCAGACTCACCAGATTC	20	AsCpf1 RR	311
CISH7078	CGAAGGTAGGAGAAGGTCTT	20	AsCpf1 RR	312
CISH7079	GAAGGTAGGAGAAGGTCTTG	20	AsCpf1 RR	313
CISH7080	GCACCTTTGGCTCACTCTCT	20	AsCpf1 RR	314
CISH7081	TCGAGGAGGTGGCAGAGGGT	20	AsCpf1 RR	315
CISH7082	TGGAACTGCCCAAGCCAGTC	20	AsCpf1 RR	316
CISH7083	AGGGACGGGGCCCACAGGGG	20	AsCpf1 RR	317
CISH7084	GGGACGGGGCCCACAGGGGC	20	AsCpf1 RR	318
CISH7085	CTCCACAGCCAGCAAAGGAC	20	AsCpf1 RR	319
CISH7086	CAGCCAGCAAAGGACGAGGT	20	AsCpf1 RR	320
CISH7087	CTGCCTTCTAGACCTCGTCC	20	AsCpf1 RR	321
CISH7088	CCTAAGGAGGATGCGCCTAG	20	AsCpf1 RVR	322
CISH7089	TGGCCTCCTGCACTGCTGAT	20	AsCpf1 RVR	323
CISH7090	AGCAGTGCAGGAGGCCACAT	20	AsCpf1 RVR	324
CISH7091	CCGACTCCAGCTTCCGTCTG	20	AsCpf1 RVR	325
CISH7092	GGGGTTCCATTACGGCCAGC	20	AsCpf1 RVR	326
CISH7093	CACAGCAGATCCTCCTCTGG	20	AsCpf1 RVR	327

【０２０６】

【表１９】

CISH7094	ATTGCCCCGTACAGTCAGAG	20	SauCas9	328
CISH7095	CCCGTACAGTCAGAGCTGGA	20	SauCas9	329
CISH7096	TGGTGGAGGAGCAGGCAGTG	20	SauCas9	330
CISH7097	TCCTTAGGCATAGGCAGGGC	20	SauCas9	331
CISH7098	CGGCCCTGCCTATGCCTAAG	20	SauCas9	332
CISH7099	TAGGCATAGGCAGGGCCGGG	20	SauCas9	333
CISH7100	AGGCAGGGCCGGGGTGGGAG	20	SauCas9	334
CISH7101	GCAGGATCGGGGCTGTCGCT	20	SauCas9	335
CISH7102	CTGCACAAGGCTGACCACAT	20	SauCas9	336
CISH7103	TGCACAAGGCTGACCACATC	20	SauCas9	337
CISH7104	CTGACCACATCCGGAAAGGC	20	SauCas9	338
CISH7105	GGCCACGCATCCTGGCCTTT	20	SauCas9	339
CISH7106	GCGTGGCCTGGACAAGCAGT	20	SauCas9	340
CISH7107	GACAAGCAGTTGGAGTCCAG	20	SauCas9	341
CISH7108	GTTGGAGTCCAGACGGAAGC	20	SauCas9	342
CISH7109	ATGCGTACATTGGTGGGGCC	20	SauCas9	343
CISH7110	TGGCCCCACCAATGTACGCA	20	SauCas9	344
CISH7111	GCTACCTGTTCACGCTGTCA	20	SauCas9	345
CISH7112	TGACAGCGTGAACAGGTAGC	20	SauCas9	346
CISH7113	GTCGGGCCTCGCTGGCCGTA	20	SauCas9	347
CISH7114	GCACTTGCCTAGGCTGGTAT	20	SauCas9	348
CISH7115	GGGAATCTGGTGAGTCTGAG	20	SauCas9	349
CISH7116	CTCACCAGATTCCCGAAGGT	20	SauCas9	350
CISH7117	CTCCTACCTTCGGGAATCTG	20	SauCas9	351
CISH7118	CAAGACCTTCTCCTACCTTC	20	SauCas9	352

【０２０７】

【表２０】

CISH7119	CCAAGACCTTCTCCTACCTT	20	SauCas9	353
CISH7120	GCCAAGACCTTCTCCTACCT	20	SauCas9	354
CISH7121	TATGCACAGCAGATCCTCCT	20	SauCas9	355
CISH7122	CAAAGGTGCTGGACCCAGAG	20	SauCas9	356
CISH7123	GGCTCACTCTCTGTCTGGGC	20	SauCas9	357
CISH7124	AGGGTACCCCAGCCCAGACA	20	SauCas9	358
CISH7125	AGAGGGTACCCCAGCCCAGA	20	SauCas9	359
CISH7126	GTACCCTCTGCCACCTCCTC	20	SauCas9	360
CISH7127	CCTTCCTCGAGGAGGTGGCA	20	SauCas9	361
CISH7128	ATGACTGGCTTGGGCAGTTC	20	SauCas9	362
CISH7129	GGCCCCTGTGGGCCCCGTCC	20	SauCas9	363
CISH7130	AGGACGAGGTCTAGAAGGCA	20	SauCas9	364
CISH7131	ACTGACAGCGTGAACAGGTAG	21	Cas12a	1173

【０２０８】

いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、Ｂ２Ｍを標的化するｇＲＮＡ（Ｂ２Ｍ　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、Ｂ２Ｍを標的化するｇＲＮＡは、表６に記載されているｇＲＮＡの１つ又は複数である。

【０２０９】

【表２１】

表6: 例示的なB2M gRNA

gRNA名称	gRNA標的化ドメイン標的配列 (DNA)	長さ	酵素	配列番号
B2M1	TATAAGTGGAGGCGTCGCGC	20	SpyCas9	365
B2M2	GGGCACGCGTTTAATATAAG	20	SpyCas9	366
B2M3	ACTCACGCTGGATAGCCTCC	20	SpyCas9	367
B2M4	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	20	SpyCas9	368
B2M5	CACGCGTTTAATATAAGTGG	20	SpyCas9	369
B2M6	AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG	20	SpyCas9	370

【０２１０】

【表２２】

B2M7	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA	20	SpyCas9	371
B2M8	AGTGGAGGCGTCGCGCTGGC	20	SpyCas9	372
B2M9	GCCCGAATGCTGTCAGCTTC	20	SpyCas9	373
B2M10	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	20	SpyCas9	374
B2M11	CTCGCGCTACTCTCTCTTTC	20	SpyCas9	375
B2M12	GGCCACGGAGCGAGACATCT	20	SpyCas9	376
B2M13	CGTGAGTAAACCTGAATCTT	20	SpyCas9	377
B2M14	AGTCACATGGTTCACACGGC	20	SpyCas9	378
B2M15	AAGTCAACTTCAATGTCGGA	20	SpyCas9	379
B2M16	CAGTAAGTCAACTTCAATGT	20	SpyCas9	380
B2M17	ACCCAGACACATAGCAATTC	20	SpyCas9	381
B2M18	GCATACTCATCTTTTTCAGT	20	SpyCas9	382
B2M19	ACAGCCCAAGATAGTTAAGT	20	SpyCas9	383
B2M20	GGCATACTCATCTTTTTCAG	20	SpyCas9	384
B2M21	TTCCTGAAGCTGACAGCATT	20	SpyCas9	385
B2M22	TCACGTCATCCAGCAGAGAA	20	SpyCas9	386
B2M23	CAGCCCAAGATAGTTAAGTG	20	SpyCas9	387
B2M-c1	AAUUCUCUCUCCAUUCUU	18	AsCpf1	388
B2M-c2	AAUUCUCUCUCCAUUCUUC	19	AsCpf1	389
B2M-c3	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCA	20	AsCpf1	390
B2M-c4	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAG	21	AsCpf1	391
B2M-c5	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGU	22	AsCpf1	392
B2M-c6	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGUA	23	AsCpf1	393
B2M-c7	AAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGUAA	24	AsCpf1	394
B2M-c8	ACUUUCCAUUCUCUGCUG	18	AsCpf1	395

【０２１１】

【表２３】

B2M-c9	ACUUUCCAUUCUCUGCUGG	19	AsCpf1	396
B2M-c10	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGA	20	AsCpf1	397
B2M-c11	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAU	21	AsCpf1	398
B2M-c12	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAUG	22	AsCpf1	399
B2M-c13	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAUGA	23	AsCpf1	400
B2M-c14	ACUUUCCAUUCUCUGCUGGAUGAC	24	AsCpf1	401
B2M-c15	AGCAAGGACUGGUCUUUC	18	AsCpf1	402
B2M-c16	AGCAAGGACUGGUCUUUCU	19	AsCpf1	403
B2M-c17	AGCAAGGACUGGUCUUUCUA	20	AsCpf1	404
B2M-c18	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAU	21	AsCpf1	405
B2M-c19	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAUC	22	AsCpf1	406
B2M-c20	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAUCU	23	AsCpf1	407
B2M-c21	AGCAAGGACUGGUCUUUCUAUCUC	24	AsCpf1	408
B2M-c22	AGUGGGGGUGAAUUCAGU	18	AsCpf1	409
B2M-c23	AGUGGGGGUGAAUUCAGUG	19	AsCpf1	410
B2M-c24	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGU	20	AsCpf1	411
B2M-c25	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUA	21	AsCpf1	412
B2M-c26	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAG	22	AsCpf1	413
B2M-c27	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAGU	23	AsCpf1	414
B2M-c28	AGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAGUA	24	AsCpf1	415
B2M-c29	AUCCAUCCGACAUUGAAG	18	AsCpf1	416
B2M-c30	AUCCAUCCGACAUUGAAGU	19	AsCpf1	417
B2M-c31	AUCCAUCCGACAUUGAAGUU	20	AsCpf1	418
B2M-c32	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUG	21	AsCpf1	419
B2M-c33	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUGA	22	AsCpf1	420

【０２１２】

【表２４】

B2M-c34	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUGAC	23	AsCpf1	421
B2M-c35	AUCCAUCCGACAUUGAAGUUGACU	24	AsCpf1	422
B2M-c36	CAAUUCUCUCUCCAUUCU	18	AsCpf1	423
B2M-c37	CAAUUCUCUCUCCAUUCUU	19	AsCpf1	424
B2M-c38	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUC	20	AsCpf1	425
B2M-c39	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCA	21	AsCpf1	426
B2M-c40	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAG	22	AsCpf1	427
B2M-c41	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGU	23	AsCpf1	428
B2M-c42	CAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGUA	24	AsCpf1	429
B2M-c43	CAGUGGGGGUGAAUUCAG	18	AsCpf1	430
B2M-c44	CAGUGGGGGUGAAUUCAGU	19	AsCpf1	431
B2M-c45	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUG	20	AsCpf1	432
B2M-c46	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGU	21	AsCpf1	433
B2M-c47	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUA	22	AsCpf1	434
B2M-c48	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAG	23	AsCpf1	435
B2M-c49	CAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAGU	24	AsCpf1	436
B2M-c50	CAUUCUCUGCUGGAUGAC	18	AsCpf1	437
B2M-c51	CAUUCUCUGCUGGAUGACG	19	AsCpf1	438
B2M-c52	CAUUCUCUGCUGGAUGACGU	20	AsCpf1	439
B2M-c53	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUG	21	AsCpf1	440
B2M-c54	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUGA	22	AsCpf1	441
B2M-c55	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUGAG	23	AsCpf1	442
B2M-c56	CAUUCUCUGCUGGAUGACGUGAGU	24	AsCpf1	443
B2M-c57	CCCGAUAUUCCUCAGGUA	18	AsCpf1	444
B2M-c58	CCCGAUAUUCCUCAGGUAC	19	AsCpf1	445

【０２１３】

【表２５】

B2M-c59	CCCGAUAUUCCUCAGGUACU	20	AsCpf1	446
B2M-c60	CCCGAUAUUCCUCAGGUACUC	21	AsCpf1	447
B2M-c61	CCCGAUAUUCCUCAGGUACUCC	22	AsCpf1	448
B2M-c62	CCCGAUAUUCCUCAGGUACUCCA	23	AsCpf1	449
B2M-c63	CCCGAUAUUCCUCAGGUACUCCAA	24	AsCpf1	450
B2M-c64	CCGAUAUUCCUCAGGUAC	18	AsCpf1	451
B2M-c65	CCGAUAUUCCUCAGGUACU	19	AsCpf1	452
B2M-c66	CCGAUAUUCCUCAGGUACUC	20	AsCpf1	453
B2M-c67	CCGAUAUUCCUCAGGUACUCC	21	AsCpf1	454
B2M-c68	CCGAUAUUCCUCAGGUACUCCA	22	AsCpf1	455
B2M-c69	CCGAUAUUCCUCAGGUACUCCAA	23	AsCpf1	456
B2M-c70	CCGAUAUUCCUCAGGUACUCCAAA	24	AsCpf1	457
B2M-c71	CUCACGUCAUCCAGCAGA	18	AsCpf1	458
B2M-c72	CUCACGUCAUCCAGCAGAG	19	AsCpf1	459
B2M-c73	CUCACGUCAUCCAGCAGAGA	20	AsCpf1	460
B2M-c74	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAA	21	AsCpf1	461
B2M-c75	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAAU	22	AsCpf1	462
B2M-c76	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAAUG	23	AsCpf1	463
B2M-c77	CUCACGUCAUCCAGCAGAGAAUGG	24	AsCpf1	464
B2M-c78	CUGAAUUGCUAUGUGUCU	18	AsCpf1	465
B2M-c79	CUGAAUUGCUAUGUGUCUG	19	AsCpf1	466
B2M-c80	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGG	20	AsCpf1	467
B2M-c81	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGG	21	AsCpf1	468
B2M-c82	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGGU	22	AsCpf1	469
B2M-c83	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGGUU	23	AsCpf1	470

【０２１４】

【表２６】

B2M-c84	CUGAAUUGCUAUGUGUCUGGGUUU	24	AsCpf1	471
B2M-c85	GAGUACCUGAGGAAUAUC	18	AsCpf1	472
B2M-c86	GAGUACCUGAGGAAUAUCG	19	AsCpf1	473
B2M-c87	GAGUACCUGAGGAAUAUCGG	20	AsCpf1	474
B2M-c88	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGG	21	AsCpf1	475
B2M-c89	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGGA	22	AsCpf1	476
B2M-c90	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGGAA	23	AsCpf1	477
B2M-c91	GAGUACCUGAGGAAUAUCGGGAAA	24	AsCpf1	478
B2M-c92	UAUCUCUUGUACUACACU	18	AsCpf1	479
B2M-c93	UAUCUCUUGUACUACACUG	19	AsCpf1	480
B2M-c94	UAUCUCUUGUACUACACUGA	20	AsCpf1	481
B2M-c95	UAUCUCUUGUACUACACUGAA	21	AsCpf1	482
B2M-c96	UAUCUCUUGUACUACACUGAAU	22	AsCpf1	483
B2M-c97	UAUCUCUUGUACUACACUGAAUU	23	AsCpf1	484
B2M-c98	UAUCUCUUGUACUACACUGAAUUC	24	AsCpf1	485
B2M-c99	UCAAUUCUCUCUCCAUUC	18	AsCpf1	486
B2M-c100	UCAAUUCUCUCUCCAUUCU	19	AsCpf1	487
B2M-c101	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUU	20	AsCpf1	488
B2M-c102	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUC	21	AsCpf1	489
B2M-c103	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUCA	22	AsCpf1	490
B2M-c104	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAG	23	AsCpf1	491
B2M-c105	UCAAUUCUCUCUCCAUUCUUCAGU	24	AsCpf1	492
B2M-c106	UCACAGCCCAAGAUAGUU	18	AsCpf1	493
B2M-c107	UCACAGCCCAAGAUAGUUA	19	AsCpf1	494
B2M-c108	UCACAGCCCAAGAUAGUUAA	20	AsCpf1	495

【０２１５】

【表２７】

B2M-c109	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAG	21	AsCpf1	496
B2M-c110	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAGU	22	AsCpf1	497
B2M-c111	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAGUG	23	AsCpf1	498
B2M-c112	UCACAGCCCAAGAUAGUUAAGUGG	24	AsCpf1	499
B2M-c113	UCAGUGGGGGUGAAUUCA	18	AsCpf1	500
B2M-c114	UCAGUGGGGGUGAAUUCAG	19	AsCpf1	501
B2M-c115	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGU	20	AsCpf1	502
B2M-c116	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUG	21	AsCpf1	503
B2M-c117	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUGU	22	AsCpf1	504
B2M-c118	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUA	23	AsCpf1	505
B2M-c119	UCAGUGGGGGUGAAUUCAGUGUAG	24	AsCpf1	506
B2M-c120	UGGCCUGGAGGCUAUCCA	18	AsCpf1	507
B2M-c121	UGGCCUGGAGGCUAUCCAG	19	AsCpf1	508
B2M-c122	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGC	20	AsCpf1	509
B2M-c123	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCG	21	AsCpf1	510
B2M-c124	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCGU	22	AsCpf1	511
B2M-c125	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCGUG	23	AsCpf1	512
B2M-c126	UGGCCUGGAGGCUAUCCAGCGUGA	24	AsCpf1	513
B2M-c127	AUAGAUCGAGACAUGUAA	18	AsCpf1	514
B2M-c128	AUAGAUCGAGACAUGUAAG	19	AsCpf1	515
B2M-c129	AUAGAUCGAGACAUGUAAGC	20	AsCpf1	516
B2M-c130	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCA	21	AsCpf1	517
B2M-c131	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCAG	22	AsCpf1	518
B2M-c132	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCAGC	23	AsCpf1	519
B2M-c133	AUAGAUCGAGACAUGUAAGCAGCA	24	AsCpf1	520

【０２１６】

【表２８】

B2M-c134	CAUAGAUCGAGACAUGUA	18	AsCpf1	521
B2M-c135	CAUAGAUCGAGACAUGUAA	19	AsCpf1	522
B2M-c136	CAUAGAUCGAGACAUGUAAG	20	AsCpf1	523
B2M-c137	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGC	21	AsCpf1	524
B2M-c138	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGCA	22	AsCpf1	525
B2M-c139	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGCAG	23	AsCpf1	526
B2M-c140	CAUAGAUCGAGACAUGUAAGCAGC	24	AsCpf1	527
B2M-c141	CUCCACUGUCUUUUUCAU	18	AsCpf1	528
B2M-c142	CUCCACUGUCUUUUUCAUA	19	AsCpf1	529
B2M-c143	CUCCACUGUCUUUUUCAUAG	20	AsCpf1	530
B2M-c144	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	21	AsCpf1	531
B2M-c145	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	22	AsCpf1	532
B2M-c146	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGAUC	23	AsCpf1	533
B2M-c147	CUCCACUGUCUUUUUCAUAGAUCG	24	AsCpf1	534
B2M-c148	UCAUAGAUCGAGACAUGU	18	AsCpf1	535
B2M-c149	UCAUAGAUCGAGACAUGUA	19	AsCpf1	536
B2M-c150	UCAUAGAUCGAGACAUGUAA	20	AsCpf1	537
B2M-c151	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAG	21	AsCpf1	538
B2M-c152	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAGC	22	AsCpf1	539
B2M-c153	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAGCA	23	AsCpf1	540
B2M-c154	UCAUAGAUCGAGACAUGUAAGCAG	24	AsCpf1	541
B2M-c155	UCCACUGUCUUUUUCAUA	18	AsCpf1	542
B2M-c156	UCCACUGUCUUUUUCAUAG	19	AsCpf1	543
B2M-c157	UCCACUGUCUUUUUCAUAGA	20	AsCpf1	544
B2M-c158	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	21	AsCpf1	545

【０２１７】

【表２９】

B2M-c159	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAUC	22	AsCpf1	546
B2M-c160	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAUCG	23	AsCpf1	547
B2M-c161	UCCACUGUCUUUUUCAUAGAUCGA	24	AsCpf1	548
B2M-c162	UCUCCACUGUCUUUUUCA	18	AsCpf1	549
B2M-c163	UCUCCACUGUCUUUUUCAU	19	AsCpf1	550
B2M-c164	UCUCCACUGUCUUUUUCAUA	20	AsCpf1	551
B2M-c165	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	21	AsCpf1	552
B2M-c166	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	22	AsCpf1	553
B2M-c167	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	23	AsCpf1	554
B2M-c168	UCUCCACUGUCUUUUUCAUAGAUC	24	AsCpf1	555
B2M-c169	UUCUCCACUGUCUUUUUC	18	AsCpf1	556
B2M-c170	UUCUCCACUGUCUUUUUCA	19	AsCpf1	557
B2M-c171	UUCUCCACUGUCUUUUUCAU	20	AsCpf1	558
B2M-c172	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUA	21	AsCpf1	559
B2M-c173	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	22	AsCpf1	560
B2M-c174	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	23	AsCpf1	561
B2M-c175	UUCUCCACUGUCUUUUUCAUAGAU	24	AsCpf1	562
B2M-c176	UUUCUCCACUGUCUUUUU	18	AsCpf1	563
B2M-c177	UUUCUCCACUGUCUUUUUC	19	AsCpf1	564
B2M-c178	UUUCUCCACUGUCUUUUUCA	20	AsCpf1	565
B2M-c179	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAU	21	AsCpf1	566
B2M-c180	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAUA	22	AsCpf1	567
B2M-c181	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	23	AsCpf1	568
B2M-c182	UUUCUCCACUGUCUUUUUCAUAGA	24	AsCpf1	569
B2M-c183	UUUUCUCCACUGUCUUUU	18	AsCpf1	570

【０２１８】

【表３０】

B2M-c184	UUUUCUCCACUGUCUUUUU	19	AsCpf1	571
B2M-c185	UUUUCUCCACUGUCUUUUUC	20	AsCpf1	572
B2M-c186	UUUUCUCCACUGUCUUUUUCA	21	AsCpf1	573
B2M-c187	UUUUCUCCACUGUCUUUUUCAU	22	AsCpf1	574
B2M-c188	UUUUCUCCACUGUCUUUUUCAUA	23	AsCpf1	575
B2M-c189	UUUUCUCCACUGUCUUUUUCAUAG	24	AsCpf1	576

【０２１９】

いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＰＤ１を標的化するｇＲＮＡである。本開示で使用するためのＢ２Ｍ及びＰＤ１を標的化するｇＲＮＡは、いずれもその全体が参照により本明細書に援用される、Ｗｅｌｓｔｅａｄ　ｅｔ　ａｌ．による国際公開第２０１５１６１２７６号パンフレット及び国際公開第２０１７１５２０１５号パンフレットでさらに説明される。

【０２２０】

いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＮＫＧ２Ａを標的化するｇＲＮＡ（ＮＫＧ２Ａ　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、ＮＫＧ２Ａを標的化するｇＲＮＡは、表７に記載されているｇＲＮＡの１つ又は複数である。

【０２２１】

【表３１】

表7: 例示的なNKG2A gRNA

名称	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	長さ	酵素	配列番号
NKG2A55	GAGGTAAAGCGTTTGCATTTG	21	AsCpf1	577
NKG2A56	CCTCTAAAGCTTATGCTTACA	21	AsCpf1	578
NKG2A57	AGTCGATTTACTTGTAGCACT	21	AsCpf1	579
NKG2A58	CTTGTAGCACTGCACAGTTAA	21	AsCpf1	580
NKG2A59	TCCATTACAGGATAAAAGACT	21	AsCpf1	581
NKG2A60	CTCCATTACAGGATAAAAGAC	21	AsCpf1	582
NKG2A61	TCTCCATTACAGGATAAAAGA	21	AsCpf1	583
NKG2A62	ATCCTGTAATGGAGAAAAATC	21	AsCpf1	584
NKG2A63	TCCTGTAATGGAGAAAAATCC	21	AsCpf1	585

【０２２２】

【表３２】

NKG2A136	AAACATGAGTAAGTTGTTTTG	21	AsCpf1	586
NKG2A137	GCTTTCAAACATGAGTAAGTT	21	AsCpf1	587
NKG2A138	AAAGCCAAACCATTCATTGTC	21	AsCpf1	588
NKG2A139	GTAACAGCAGTCATCATCCAT	21	AsCpf1	589
NKG2A140	ACCATCCTCATGGATTGGTGT	21	AsCpf1	590
NKG2A141	TGTCCATCATTTCACCATCCT	21	AsCpf1	591
NKG2A142	GAAATTTCTGTCCATCATTTC	21	AsCpf1	592
NKG2A143	AGAAATTTCTGTCCATCATTT	21	AsCpf1	593
NKG2A144	TTTTAGAAATTTCTGTCCATC	21	AsCpf1	594
NKG2A145	CTTTTAGAAATTTCTGTCCAT	21	AsCpf1	595
NKG2A146	TTTTCTTTTAGAAATTTCTGT	21	AsCpf1	596
NKG2A147	TAAAAGAAAAGAAAGAATTTT	21	AsCpf1	597
NKG2A270	AAACATTTACATCTTACCATT	21	AsCpf1	598
NKG2A271	CATCTTACCATTTCTTCTTCA	21	AsCpf1	599
NKG2A272	TATAGATAATGAAGAAGAAAT	21	AsCpf1	600
NKG2A273	TTCTTCATTATCTATAGAAAG	21	AsCpf1	601
NKG2A274	CTGGCCTGTACTTCGAAGAAC	21	AsCpf1	602
NKG2A275	CTTACCAATGTAGTAACAACT	21	AsCpf1	603
NKG2A276	GCACGTCATTGTGGCCATTGT	21	AsCpf1	604
NKG2A277	TTTAGCACGTCATTGTGGCCA	21	AsCpf1	605
NKG2A414	CCATCAGCTCCAGAGAAGCTC	21	AsCpf1	606
NKG2A415	TCTCCCTGCAGATTTACCATC	21	AsCpf1	607
NKG2A437	AAATGCTTTACCTTTGCAGTG	21	AsCpf1	608
NKG2A438	AATGCTTTACCTTTGCAGTGA	21	AsCpf1	609
NKG2A439	CCTTTGCAGTGATAGGTTTTG	21	AsCpf1	610

【０２２３】

【表３３】

NKG2A440	CAGTGATAGGTTTTGTCATTC	21	AsCpf1	611
NKG2A441	AAGGGAATGACAAAACCTATC	21	AsCpf1	612
NKG2A442	CAAGGGAATGACAAAACCTAT	21	AsCpf1	613
NKG2A443	GTCATTCCCTTGAAAATCCTG	21	AsCpf1	614
NKG2A444	TCATTCCCTTGAAAATCCTGA	21	AsCpf1	615
NKG2A445	TGAAGGTTTAATTCCGCATAG	21	AsCpf1	616
NKG2A446	GAAGGTTTAATTCCGCATAGG	21	AsCpf1	617
NKG2A447	AAGGTTTAATTCCGCATAGGT	21	AsCpf1	618
NKG2A448	ATTCCGCATAGGTTATTTCCT	21	AsCpf1	619
NKG2A449	GCAACTGAACAGGAAATAACC	21	AsCpf1	620
NKG2A450	AGCAACTGAACAGGAAATAAC	21	AsCpf1	621
NKG2A451	CTGTTCAGTTGCTAAAATGGA	21	AsCpf1	622
NKG2A452	TATTGCCTTTAGGTTTTCGTT	21	AsCpf1	623
NKG2A453	ATTGCCTTTAGGTTTTCGTTG	21	AsCpf1	624
NKG2A454	TTGCCTTTAGGTTTTCGTTGC	21	AsCpf1	625
NKG2A455	GGTTTTCGTTGCTGCCTCTTT	21	AsCpf1	626
NKG2A456	CGTTGCTGCCTCTTTGGGTTT	21	AsCpf1	627
NKG2A457	GTTGCTGCCTCTTTGGGTTTG	21	AsCpf1	628
NKG2A458	GGTTTGGGGGCAGATTCAGGT	21	AsCpf1	629
NKG2A459	GGGGCAGATTCAGGTCTGAGT	21	AsCpf1	630
NKG2A460	GCAACTGAACAGGAAATAACC	21	Cas12a	1176

【０２２４】

いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的化するｇＲＮＡ（ＴＩＧＩＴ　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴを標的化するｇＲＮＡは、表８に記載されているｇＲＮＡの１つ又は複数である。

【０２２５】

【表３４】

表8. TIGIT gRNA

名称	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	長さ	酵素	配列番号
TIGIT4170	TCTGCAGAAATGTTCCCCGT	20	AsCpf1	631
TIGIT4171	TGCAGAGAAAGGTGGCTCTA	20	AsCpf1	632
TIGIT4172	TAATGCTGACTTGGGGTGGC	20	AsCpf1	633
TIGIT4173	TAGGACCTCCAGGAAGATTC	20	AsCpf1	634
TIGIT4174	TAGTCAACGCGACCACCACG	20	AsCpf1	635
TIGIT4175	TCCTGAGGTCACCTTCCACA	20	AsCpf1	636
TIGIT4176	TATTGTGCCTGTCATCATTC	20	AsCpf1	637
TIGIT4177	TGACAGGCACAATAGAAACAA	21	SauCas9	638
TIGIT4178	GACAGGCACAATAGAAACAAC	21	SauCas9	639
TIGIT4179	AAACAACGGGGAACATTTCTG	21	SauCas9	640
TIGIT4180	ACAACGGGGAACATTTCTGCA	21	SauCas9	641
TIGIT4181	TGATAGAGCCACCTTTCTCTG	21	SauCas9	642
TIGIT4182	GGGTCACTTGTGCCGTGGTGG	21	SauCas9	643
TIGIT4183	GGCACAAGTGACCCAGGTCAA	21	SauCas9	644
TIGIT4184	GTCCTGCTGCTCCCAGTTGAC	21	SauCas9	645
TIGIT4185	TGGCCATTTGTAATGCTGACT	21	SauCas9	646
TIGIT4186	TGGCACATCTCCCCATCCTTC	21	SauCas9	647
TIGIT4187	CATCTCCCCATCCTTCAAGGA	21	SauCas9	648
TIGIT4188	CCACTCGATCCTTGAAGGATG	21	SauCas9	649
TIGIT4189	GGCCACTCGATCCTTGAAGGA	21	SauCas9	650
TIGIT4190	CCTGGGGCCACTCGATCCTTG	21	SauCas9	651
TIGIT4191	GACTGGAGGGTGAGGCCCAGG	21	SauCas9	652
TIGIT4192	ATCGTTCACGGTCAGCGACTG	21	SauCas9	653

【０２２６】

【表３５】

TIGIT4193	GTCGCTGACCGTGAACGATAC	21	SauCas9	654
TIGIT4194	CGCTGACCGTGAACGATACAG	21	SauCas9	655
TIGIT4195	GCATCTATCACACCTACCCTG	21	SauCas9	656
TIGIT4196	CCTACCCTGATGGGACGTACA	21	SauCas9	657
TIGIT4197	TACCCTGATGGGACGTACACT	21	SauCas9	658
TIGIT4198	CCCTGATGGGACGTACACTGG	21	SauCas9	659
TIGIT4199	TTCTCCCAGTGTACGTCCCAT	21	SauCas9	660
TIGIT4200	GGAGAATCTTCCTGGAGGTCC	21	SauCas9	661
TIGIT4201	CATGGCTCCAAGCAATGGAAT	21	SauCas9	662
TIGIT4202	CGCGGCCATGGCTCCAAGCAA	21	SauCas9	663
TIGIT4203	TCGCGGCCATGGCTCCAAGCA	21	SauCas9	664
TIGIT4204	CATCGTGGTGGTCGCGTTGAC	21	SauCas9	665
TIGIT4205	AAAGCCCTCAGAATCCATTCT	21	SauCas9	666
TIGIT4206	CATTCTGTGGAAGGTGACCTC	21	SauCas9	667
TIGIT4207	TTCTGTGGAAGGTGACCTCAG	21	SauCas9	668
TIGIT4208	CCTGAGGTCACCTTCCACAGA	21	SauCas9	669
TIGIT4209	TTCTCCTGAGGTCACCTTCCA	21	SauCas9	670
TIGIT4210	AGGAGAAAATCAGCTGGACAG	21	SauCas9	671
TIGIT4211	GGAGAAAATCAGCTGGACAGG	21	SauCas9	672
TIGIT4212	GCCCCAGTGCTCCCTCACCCC	21	SauCas9	673
TIGIT4213	TGGACACAGCTTCCTGGGGGT	21	SauCas9	674
TIGIT4214	TCTGCCTGGACACAGCTTCCT	21	SauCas9	675
TIGIT4215	AGCTGCACCTGCTGGGCTCTG	21	SauCas9	676
TIGIT4216	GCTGGGCTCTGTGGAGAGCAG	21	SauCas9	677
TIGIT4217	TGGGCTCTGTGGAGAGCAGCG	21	SauCas9	678

【０２２７】

【表３６】

TIGIT4218	CTGCATGACTACTTCAATGTC	21	SauCas9	679
TIGIT4219	AATGTCCTGAGTTACAGAAGC	21	SauCas9	680
TIGIT4220	TGGGTAACTGCAGCTTCTTCA	21	SauCas9	681
TIGIT4221	GACAGGCACAATAGAAACAA	20	SpyCas9	682
TIGIT4222	ACAGGCACAATAGAAACAAC	20	SpyCas9	683
TIGIT4223	CAGGCACAATAGAAACAACG	20	SpyCas9	684
TIGIT4224	GGGAACATTTCTGCAGAGAA	20	SpyCas9	685
TIGIT4225	AACATTTCTGCAGAGAAAGG	20	SpyCas9	686
TIGIT4226	ATGTCACCTCTCCTCCACCA	20	SpyCas9	687
TIGIT4227	CTTGTGCCGTGGTGGAGGAG	20	SpyCas9	688
TIGIT4228	GGTCACTTGTGCCGTGGTGG	20	SpyCas9	689
TIGIT4229	CACCACGGCACAAGTGACCC	20	SpyCas9	690
TIGIT4230	CTGGGTCACTTGTGCCGTGG	20	SpyCas9	691
TIGIT4231	GACCTGGGTCACTTGTGCCG	20	SpyCas9	692
TIGIT4232	CACAAGTGACCCAGGTCAAC	20	SpyCas9	693
TIGIT4233	ACAAGTGACCCAGGTCAACT	20	SpyCas9	694
TIGIT4234	CCAGGTCAACTGGGAGCAGC	20	SpyCas9	695
TIGIT4235	CTGCTGCTCCCAGTTGACCT	20	SpyCas9	696
TIGIT4236	CCTGCTGCTCCCAGTTGACC	20	SpyCas9	697
TIGIT4237	GGAGCAGCAGGACCAGCTTC	20	SpyCas9	698
TIGIT4238	CATTACAAATGGCCAGAAGC	20	SpyCas9	699
TIGIT4239	GGCCATTTGTAATGCTGACT	20	SpyCas9	700
TIGIT4240	GCCATTTGTAATGCTGACTT	20	SpyCas9	701
TIGIT4241	CCATTTGTAATGCTGACTTG	20	SpyCas9	702
TIGIT4242	TTTGTAATGCTGACTTGGGG	20	SpyCas9	703

【０２２８】

【表３７】

TIGIT4243	CCCCAAGTCAGCATTACAAA	20	SpyCas9	704
TIGIT4244	GCACATCTCCCCATCCTTCA	20	SpyCas9	705
TIGIT4245	CCCATCCTTCAAGGATCGAG	20	SpyCas9	706
TIGIT4246	CACTCGATCCTTGAAGGATG	20	SpyCas9	707
TIGIT4247	CCACTCGATCCTTGAAGGAT	20	SpyCas9	708
TIGIT4248	GCCACTCGATCCTTGAAGGA	20	SpyCas9	709
TIGIT4249	TTCAAGGATCGAGTGGCCCC	20	SpyCas9	710
TIGIT4250	TGGGGCCACTCGATCCTTGA	20	SpyCas9	711
TIGIT4251	GATCGAGTGGCCCCAGGTCC	20	SpyCas9	712
TIGIT4252	AGTGGCCCCAGGTCCCGGCC	20	SpyCas9	713
TIGIT4253	GTGGCCCCAGGTCCCGGCCT	20	SpyCas9	714
TIGIT4254	GAGGCCCAGGCCGGGACCTG	20	SpyCas9	715
TIGIT4255	TGAGGCCCAGGCCGGGACCT	20	SpyCas9	716
TIGIT4256	GTGAGGCCCAGGCCGGGACC	20	SpyCas9	717
TIGIT4257	TGGAGGGTGAGGCCCAGGCC	20	SpyCas9	718
TIGIT4258	CTGGAGGGTGAGGCCCAGGC	20	SpyCas9	719
TIGIT4259	GCGACTGGAGGGTGAGGCCC	20	SpyCas9	720
TIGIT4260	CGGTCAGCGACTGGAGGGTG	20	SpyCas9	721
TIGIT4261	GTTCACGGTCAGCGACTGGA	20	SpyCas9	722
TIGIT4262	CGTTCACGGTCAGCGACTGG	20	SpyCas9	723
TIGIT4263	TATCGTTCACGGTCAGCGAC	20	SpyCas9	724
TIGIT4264	TCGCTGACCGTGAACGATAC	20	SpyCas9	725
TIGIT4265	CGCTGACCGTGAACGATACA	20	SpyCas9	726
TIGIT4266	GCTGACCGTGAACGATACAG	20	SpyCas9	727
TIGIT4267	GTACTCCCCTGTATCGTTCA	20	SpyCas9	728

【０２２９】

【表３８】

TIGIT4268	ATCTATCACACCTACCCTGA	20	SpyCas9	729
TIGIT4269	TCTATCACACCTACCCTGAT	20	SpyCas9	730
TIGIT4270	TACCCTGATGGGACGTACAC	20	SpyCas9	731
TIGIT4271	ACCCTGATGGGACGTACACT	20	SpyCas9	732
TIGIT4272	AGTGTACGTCCCATCAGGGT	20	SpyCas9	733
TIGIT4273	TCCCAGTGTACGTCCCATCA	20	SpyCas9	734
TIGIT4274	CTCCCAGTGTACGTCCCATC	20	SpyCas9	735
TIGIT4275	GTACACTGGGAGAATCTTCC	20	SpyCas9	736
TIGIT4276	CACTGGGAGAATCTTCCTGG	20	SpyCas9	737
TIGIT4277	CTGAGCTTTCTAGGACCTCC	20	SpyCas9	738
TIGIT4278	AGGTTCCAGATTCCATTGCT	20	SpyCas9	739
TIGIT4279	AAGCAATGGAATCTGGAACC	20	SpyCas9	740
TIGIT4280	GATTCCATTGCTTGGAGCCA	20	SpyCas9	741
TIGIT4281	TGGCTCCAAGCAATGGAATC	20	SpyCas9	742
TIGIT4282	GCGGCCATGGCTCCAAGCAA	20	SpyCas9	743
TIGIT4283	TGGAGCCATGGCCGCGACGC	20	SpyCas9	744
TIGIT4284	AGCCATGGCCGCGACGCTGG	20	SpyCas9	745
TIGIT4285	GACCACCAGCGTCGCGGCCA	20	SpyCas9	746
TIGIT4286	GCAGATGACCACCAGCGTCG	20	SpyCas9	747
TIGIT4287	CATCTGCACAGCAGTCATCG	20	SpyCas9	748
TIGIT4288	CTGCACAGCAGTCATCGTGG	20	SpyCas9	749
TIGIT4289	AGCCCTCAGAATCCATTCTG	20	SpyCas9	750
TIGIT4290	CTCAGAATCCATTCTGTGGA	20	SpyCas9	751
TIGIT4291	TTCCACAGAATGGATTCTGA	20	SpyCas9	752
TIGIT4292	CTTCCACAGAATGGATTCTG	20	SpyCas9	753

【０２３０】

【表３９】

TIGIT4293	ATTCTGTGGAAGGTGACCTC	20	SpyCas9	754
TIGIT4294	TGAGGTCACCTTCCACAGAA	20	SpyCas9	755
TIGIT4295	GACCTCAGGAGAAAATCAGC	20	SpyCas9	756
TIGIT4296	CAGGAGAAAATCAGCTGGAC	20	SpyCas9	757
TIGIT4297	GTCCAGCTGATTTTCTCCTG	20	SpyCas9	758
TIGIT4298	GAGAAAATCAGCTGGACAGG	20	SpyCas9	759
TIGIT4299	AATCAGCTGGACAGGAGGAA	20	SpyCas9	760
TIGIT4300	CCCAGTGCTCCCTCACCCCC	20	SpyCas9	761
TIGIT4301	CTGGGGGTGAGGGAGCACTG	20	SpyCas9	762
TIGIT4302	CCTGGGGGTGAGGGAGCACT	20	SpyCas9	763
TIGIT4303	TCCTGGGGGTGAGGGAGCAC	20	SpyCas9	764
TIGIT4304	ACACAGCTTCCTGGGGGTGA	20	SpyCas9	765
TIGIT4305	GACACAGCTTCCTGGGGGTG	20	SpyCas9	766
TIGIT4306	ACCCCCAGGAAGCTGTGTCC	20	SpyCas9	767
TIGIT4307	GCCTGGACACAGCTTCCTGG	20	SpyCas9	768
TIGIT4308	TGCCTGGACACAGCTTCCTG	20	SpyCas9	769
TIGIT4309	CTGCCTGGACACAGCTTCCT	20	SpyCas9	770
TIGIT4310	TCTGCCTGGACACAGCTTCC	20	SpyCas9	771
TIGIT4311	CAGGCAGAAGCTGCACCTGC	20	SpyCas9	772
TIGIT4312	AGGCAGAAGCTGCACCTGCT	20	SpyCas9	773
TIGIT4313	CAGCAGGTGCAGCTTCTGCC	20	SpyCas9	774
TIGIT4314	GCTGCACCTGCTGGGCTCTG	20	SpyCas9	775
TIGIT4315	TGCTCTCCACAGAGCCCAGC	20	SpyCas9	776
TIGIT4316	CTGGGCTCTGTGGAGAGCAG	20	SpyCas9	777
TIGIT4317	TGGGCTCTGTGGAGAGCAGC	20	SpyCas9	778

【０２３１】

【表４０】

TIGIT4318	GGGCTCTGTGGAGAGCAGCG	20	SpyCas9	779
TIGIT4319	CTGTGGAGAGCAGCGGGGAG	20	SpyCas9	780
TIGIT4320	ATTGAAGTAGTCATGCAGCT	20	SpyCas9	781
TIGIT4321	TGTCCTGAGTTACAGAAGCC	20	SpyCas9	782
TIGIT4322	GTCCTGAGTTACAGAAGCCT	20	SpyCas9	783
TIGIT4323	TACCCAGGCTTCTGTAACTC	20	SpyCas9	784
TIGIT4324	TGAAGAAGCTGCAGTTACCC	20	SpyCas9	785
TIGIT4325	TGCAGCTTCTTCACAGAGAC	20	SpyCas9	786
TIGIT5053	GTTGTTTCTATTGTGCCTGT	20	AsCpf1 RR	787
TIGIT5054	CGTTGTTTCTATTGTGCCTG	20	AsCpf1 RR	788
TIGIT5055	CCGTTGTTTCTATTGTGCCT	20	AsCpf1 RR	789
TIGIT5056	CCACGGCACAAGTGACCCAG	20	AsCpf1 RR	790
TIGIT5057	AGTTGACCTGGGTCACTTGT	20	AsCpf1 RR	791
TIGIT5058	AAGTCAGCATTACAAATGGC	20	AsCpf1 RR	792
TIGIT5059	CATCCTTCAAGGATCGAGTG	20	AsCpf1 RR	793
TIGIT5060	ATCCTTCAAGGATCGAGTGG	20	AsCpf1 RR	794
TIGIT5061	AGGATCGAGTGGCCCCAGGT	20	AsCpf1 RR	795
TIGIT5062	AGGTCCCGGCCTGGGCCTCA	20	AsCpf1 RR	796
TIGIT5063	GGCCTGGGCCTCACCCTCCA	20	AsCpf1 RR	797
TIGIT5064	CGGTCAGCGACTGGAGGGTG	20	AsCpf1 RR	798
TIGIT5065	GTCGCTGACCGTGAACGATA	20	AsCpf1 RR	799
TIGIT5066	TGTATCGTTCACGGTCAGCG	20	AsCpf1 RR	800
TIGIT5067	CTGTATCGTTCACGGTCAGC	20	AsCpf1 RR	801
TIGIT5068	ATCAGGGTAGGTGTGATAGA	20	AsCpf1 RR	802
TIGIT5069	AGTGTACGTCCCATCAGGGT	20	AsCpf1 RR	803

【０２３２】

【表４１】

TIGIT5070	GGAAGATTCTCCCAGTGTAC	20	AsCpf1 RR	804
TIGIT5071	TGGAGGTCCTAGAAAGCTCA	20	AsCpf1 RR	805
TIGIT5072	AGCAATGGAATCTGGAACCT	20	AsCpf1 RR	806
TIGIT5073	AGATTCCATTGCTTGGAGCC	20	AsCpf1 RR	807
TIGIT5074	GATTCCATTGCTTGGAGCCA	20	AsCpf1 RR	808
TIGIT5075	ATTGCTTGGAGCCATGGCCG	20	AsCpf1 RR	809
TIGIT5076	TTGCTTGGAGCCATGGCCGC	20	AsCpf1 RR	810
TIGIT5077	CAGAATGGATTCTGAGGGCT	20	AsCpf1 RR	811
TIGIT5078	ACAGAATGGATTCTGAGGGC	20	AsCpf1 RR	812
TIGIT5079	TTCTGTGGAAGGTGACCTCA	20	AsCpf1 RR	813
TIGIT5080	GCTGATTTTCTCCTGAGGTC	20	AsCpf1 RR	814
TIGIT5081	TCCTGTCCAGCTGATTTTCT	20	AsCpf1 RR	815
TIGIT5082	TTCCTCCTGTCCAGCTGATT	20	AsCpf1 RR	816
TIGIT5083	TGGGGGTGAGGGAGCACTGG	20	AsCpf1 RR	817
TIGIT5084	AGTGCTCCCTCACCCCCAGG	20	AsCpf1 RR	818
TIGIT5085	TCACCCCCAGGAAGCTGTGT	20	AsCpf1 RR	819
TIGIT5086	CAGGAAGCTGTGTCCAGGCA	20	AsCpf1 RR	820
TIGIT5087	AGGAAGCTGTGTCCAGGCAG	20	AsCpf1 RR	821
TIGIT5088	GGCAGAAGCTGCACCTGCTG	20	AsCpf1 RR	822
TIGIT5089	CAGAGCCCAGCAGGTGCAGC	20	AsCpf1 RR	823
TIGIT5090	GCTGCTCTCCACAGAGCCCA	20	AsCpf1 RR	824
TIGIT5091	CGCTGCTCTCCACAGAGCCC	20	AsCpf1 RR	825
TIGIT5092	ATGTCCTGAGTTACAGAAGC	20	AsCpf1 RR	826
TIGIT5093	TGCAGAGAAAGGTGGCTCTAT	21	Cas12a	1175

【０２３３】

いくつかの実施形態では、本開示で使用するためのｇＲＮＡは、ＡＤＯＲＡ２ａを標的化するｇＲＮＡ（ＡＤＯＲＡ２ａ　ｇＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、ＡＤＯＲＡ２ａを標的化するｇＲＮＡは、表９に記載されているｇＲＮＡの１つ又は複数である。

【０２３４】

【表４２】

表9. ADORA2a gRNA

名称	gRNA標的化ドメイン配列 (DNA)	長さ	酵素	配列番号
ADORA2A337	GAGCACACCCACTGCGATGT	20	SpyCas9	827
ADORA2A338	GATGGCCAGGAGACTGAAGA	20	SpyCas9	828
ADORA2A339	CTGCTCACCGGAGCGGGATG	20	SpyCas9	829
ADORA2A340	GTCTGTGGCCATGCCCATCA	20	SpyCas9	830
ADORA2A341	TCACCGGAGCGGGATGCGGA	20	SpyCas9	831
ADORA2A342	GTGGCAGGCAGCGCAGAACC	20	SpyCas9	832
ADORA2A343	AGCACACCAGCACATTGCCC	20	SpyCas9	833
ADORA2A344	CAGGTTGCTGTTGAGCCACA	20	SpyCas9	834
ADORA2A345	CTTCATTGCCTGCTTCGTCC	20	SpyCas9	835
ADORA2A346	GTACACCGAGGAGCCCATGA	20	SpyCas9	836
ADORA2A347	GATGGCAATGTAGCGGTCAA	20	SpyCas9	837
ADORA2A348	CTCCTCGGTGTACATCACGG	20	SpyCas9	838
ADORA2A349	CGAGGAGCCCATGATGGGCA	20	SpyCas9	839
ADORA2A350	GGGCTCCTCGGTGTACATCA	20	SpyCas9	840
ADORA2A351	CTTTGTGGTGTCACTGGCGG	20	SpyCas9	841
ADORA2A352	CCGCTCCGGTGAGCAGGGCC	20	SpyCas9	842
ADORA2A353	GGGTTCTGCGCTGCCTGCCA	20	SpyCas9	843
ADORA2A354	GGACGAAGCAGGCAATGAAG	20	SpyCas9	844
ADORA2A355	GTGCTGATGGTGATGGCAAA	20	SpyCas9	845
ADORA2A356	AGCGCAGAACCCGGTGCTGA	20	SpyCas9	846

【０２３５】

【表４３】

ADORA2A357	GAGCTCCATCTTCAGTCTCC	20	SpyCas9	847
ADORA2A358	TGCTGATGGTGATGGCAAAG	20	SpyCas9	848
ADORA2A359	GGCGGCGGCCGACATCGCAG	20	SpyCas9	849
ADORA2A360	AATGAAGAGGCAGCCGTGGC	20	SpyCas9	850
ADORA2A361	GGGCAATGTGCTGGTGTGCT	20	SpyCas9	851
ADORA2A362	CATGCCCATCATGGGCTCCT	20	SpyCas9	852
ADORA2A363	AATGTAGCGGTCAATGGCGA	20	SpyCas9	853
ADORA2A364	AGTAGTTGGTGACGTTCTGC	20	SpyCas9	854
ADORA2A365	AGCGGTCAATGGCGATGGCC	20	SpyCas9	855
ADORA2A366	CGCATCCCGCTCCGGTGAGC	20	SpyCas9	856
ADORA2A367	GCATCCCGCTCCGGTGAGCA	20	SpyCas9	857
ADORA2A368	TGGGCAATGTGCTGGTGTGC	20	SpyCas9	858
ADORA2A369	CAACTACTTTGTGGTGTCAC	20	SpyCas9	859
ADORA2A370	CGCTCCGGTGAGCAGGGCCG	20	SpyCas9	860
ADORA2A371	GATGGTGATGGCAAAGGGGA	20	SpyCas9	861
ADORA2A372	GGTGTACATCACGGTGGAGC	20	SpyCas9	862
ADORA2A373	GAACGTCACCAACTACTTTG	20	SpyCas9	863
ADORA2A374	CAGTGACACCACAAAGTAGT	20	SpyCas9	864
ADORA2A375	GGCCATCCTGGGCAATGTGC	20	SpyCas9	865
ADORA2A376	CCCGGCCCTGCTCACCGGAG	20	SpyCas9	866
ADORA2A377	CACCAGCACATTGCCCAGGA	20	SpyCas9	867
ADORA2A378	TTTGCCATCACCATCAGCAC	20	SpyCas9	868
ADORA2A379	CTCCACCGTGATGTACACCG	20	SpyCas9	869
ADORA2A380	GGAGCTGGCCATTGCTGTGC	20	SpyCas9	870
ADORA2A381	CAGGATGGCCAGCACAGCAA	20	SpyCas9	871

【０２３６】

【表４４】

ADORA2A382	GAACCCGGTGCTGATGGTGA	20	SpyCas9	872
ADORA2A383	TGGAGCTCTGCGTGAGGACC	20	SpyCas9	873
ADORA2A384	CCCGCTCCGGTGAGCAGGGC	20	SpyCas9	874
ADORA2A385	AGGCAATGAAGAGGCAGCCG	20	SpyCas9	875
ADORA2A386	CCGGCCCTGCTCACCGGAGC	20	SpyCas9	876
ADORA2A387	GCGGCGGCCGACATCGCAGT	20	SpyCas9	877
ADORA2A388	GGTGCTGATGGTGATGGCAA	20	SpyCas9	878
ADORA2A389	CTACTTTGTGGTGTCACTGG	20	SpyCas9	879
ADORA2A390	TACACCGAGGAGCCCATGAT	20	SpyCas9	880
ADORA2A391	TCTGTGGCCATGCCCATCAT	20	SpyCas9	881
ADORA2A392	ATTGCTGTGCTGGCCATCCT	20	SpyCas9	882
ADORA2A393	CGTGAGGACCAGGACGAAGC	20	SpyCas9	883
ADORA2A394	TTGCCATCACCATCAGCACC	20	SpyCas9	884
ADORA2A395	GGATGCGGATGGCAATGTAG	20	SpyCas9	885
ADORA2A396	TTGCCATCCGCATCCCGCTC	20	SpyCas9	886
ADORA2A397	TGAAGATGGAGCTCTGCGTG	20	SpyCas9	887
ADORA2A398	CATTGCTGTGCTGGCCATCC	20	SpyCas9	888
ADORA2A399	TGCTGGTGTGCTGGGCCGTG	20	SpyCas9	889
ADORA2A820	GGCTCCTCGGTGTACATCACG	21	SauCas9	890
ADORA2A821	GAGCTCTGCGTGAGGACCAGG	21	SauCas9	891
ADORA2A822	GATGGAGCTCTGCGTGAGGAC	21	SauCas9	892
ADORA2A823	CCAGCACACCAGCACATTGCC	21	SauCas9	893
ADORA2A824	AGGACCAGGACGAAGCAGGCA	21	SauCas9	894
ADORA2A825	TGCCATCCGCATCCCGCTCCG	21	SauCas9	895
ADORA2A826	GTGTGGCTCAACAGCAACCTG	21	SauCas9	896

【０２３７】

【表４５】

ADORA2A827	AGCTCCACCGTGATGTACACC	21	SauCas9	897
ADORA2A828	GTAGCGGTCAATGGCGATGGC	21	SauCas9	898
ADORA2A829	CGGTGCTGATGGTGATGGCAA	21	SauCas9	899
ADORA2A830	CCCTGCTCACCGGAGCGGGAT	21	SauCas9	900
ADORA2A831	GTGACGTTCTGCAGGTTGCTG	21	SauCas9	901
ADORA2A832	GCTCCACCGTGATGTACACCG	21	SauCas9	902
ADORA2A833	ACTGAAGATGGAGCTCTGCGT	21	SauCas9	903
ADORA2A834	CCAGCTCCACCGTGATGTACA	21	SauCas9	904
ADORA2A835	CCTTTGCCATCACCATCAGCA	21	SauCas9	905
ADORA2A836	CCGGTGCTGATGGTGATGGCA	21	SauCas9	906
ADORA2A837	CCTGGGCAATGTGCTGGTGTG	21	SauCas9	907
ADORA2A838	AGGCAGCCGTGGCAGGCAGCG	21	SauCas9	908
ADORA2A839	GCGATGGCCAGGAGACTGAAG	21	SauCas9	909
ADORA2A840	CGATGGCCAGGAGACTGAAGA	21	SauCas9	910
ADORA2A841	TCCCGCTCCGGTGAGCAGGGC	21	SauCas9	911
ADORA2A842	TGCTTCGTCCTGGTCCTCACG	21	SauCas9	912
ADORA2A843	ACCAGGACGAAGCAGGCAATG	21	SauCas9	913
ADORA2A844	ATGTACACCGAGGAGCCCATG	21	SauCas9	914
ADORA2A845	TCGTCTGTGGCCATGCCCATC	21	SauCas9	915
ADORA2A846	TCAATGGCGATGGCCAGGAGA	21	SauCas9	916
ADORA2A847	GGTGCTGATGGTGATGGCAAA	21	SauCas9	917
ADORA2A848	TAGCGGTCAATGGCGATGGCC	21	SauCas9	918
ADORA2A849	TCCGCATCCCGCTCCGGTGAG	21	SauCas9	919
ADORA2A850	CTGGCGGCGGCCGACATCGCA	21	SauCas9	920
ADORA2A851	GCCATTGCTGTGCTGGCCATC	21	SauCas9	921

【０２３８】

【表４６】

ADORA2A852	ATCCCGCTCCGGTGAGCAGGG	21	SauCas9	922
ADORA2A853	AGACTGAAGATGGAGCTCTGC	21	SauCas9	923
ADORA2A854	CCCCGGCCCTGCTCACCGGAG	21	SauCas9	924
ADORA2A855	ATGGTGATGGCAAAGGGGATG	21	SauCas9	925
ADORA2A856	GCTCCTCGGTGTACATCACGG	21	SauCas9	926
ADORA2A248	TGTCGATGGCAATAGCCAAG	20	SpyCas9	927
ADORA2A249	AGAAGTTGGTGACGTTCTGC	20	SpyCas9	928
ADORA2A250	TTCGCCATCACCATCAGCAC	20	SpyCas9	929
ADORA2A251	GAAGAAGAGGCAGCCATGGC	20	SpyCas9	930
ADORA2A252	CACAAGCACGTTACCCAGGA	20	SpyCas9	931
ADORA2A253	CAACTTCTTCGTGGTATCTC	20	SpyCas9	932
ADORA2A254	CAGGATGGCCAGCACAGCAA	20	SpyCas9	933
ADORA2A255	AATTCCACTCCGGTGAGCCA	20	SpyCas9	934
ADORA2A256	AGCGCAGAAGCCAGTGCTGA	20	SpyCas9	935
ADORA2A257	GTGCTGATGGTGATGGCGAA	20	SpyCas9	936
ADORA2A258	GGAGCTGGCCATTGCTGTGC	20	SpyCas9	937
ADORA2A259	AATAGCCAAGAGGCTGAAGA	20	SpyCas9	938
ADORA2A260	CTCCTCGGTGTACATCATGG	20	SpyCas9	939
ADORA2A261	GGACAAAGCAGGCGAAGAAG	20	SpyCas9	940
ADORA2A262	TCTGGCGGCGGCTGACATCG	20	SpyCas9	941
ADORA2A263	TGGGTAACGTGCTTGTGTGC	20	SpyCas9	942
ADORA2A264	GATGTACACCGAGGAGCCCA	20	SpyCas9	943
ADORA2A265	TAACCCCTGGCTCACCGGAG	20	SpyCas9	944
ADORA2A266	TCACCGGAGTGGAATTCGGA	20	SpyCas9	945
ADORA2A267	GCGGCGGCTGACATCGCGGT	20	SpyCas9	946

【０２３９】

【表４７】

ADORA2A268	GATGGTGATGGCGAATGGGA	20	SpyCas9	947
ADORA2A269	GGCTTCTGCGCTGCCTGCCA	20	SpyCas9	948
ADORA2A270	ATTCCACTCCGGTGAGCCAG	20	SpyCas9	949
ADORA2A271	GGTGTACATCATGGTGGAGC	20	SpyCas9	950
ADORA2A272	ATTGCTGTGCTGGCCATCCT	20	SpyCas9	951
ADORA2A273	CTCCACCATGATGTACACCG	20	SpyCas9	952
ADORA2A274	GGCGGCGGCTGACATCGCGG	20	SpyCas9	953
ADORA2A275	TACACCGAGGAGCCCATGGC	20	SpyCas9	954
ADORA2A276	GGGTAACGTGCTTGTGTGCT	20	SpyCas9	955
ADORA2A277	CAGGTTGCTGTTGATCCACA	20	SpyCas9	956
ADORA2A278	TGAAGATGGAACTCTGCGTG	20	SpyCas9	957
ADORA2A279	GATGGCGATGTATCTGTCGA	20	SpyCas9	958
ADORA2A280	CTTCTTCGCCTGCTTTGTCC	20	SpyCas9	959
ADORA2A281	AGGCGAAGAAGAGGCAGCCA	20	SpyCas9	960
ADORA2A282	TGCTTGTGTGCTGGGCCGTG	20	SpyCas9	961
ADORA2A283	GAAGCCAGTGCTGATGGTGA	20	SpyCas9	962
ADORA2A284	CGTGAGGACCAGGACAAAGC	20	SpyCas9	963
ADORA2A285	TGGAACTCTGCGTGAGGACC	20	SpyCas9	964
ADORA2A286	CATTGCTGTGCTGGCCATCC	20	SpyCas9	965
ADORA2A287	TTCTCCCGCCATGGGCTCCT	20	SpyCas9	966
ADORA2A288	TGGCTCACCGGAGTGGAATT	20	SpyCas9	967
ADORA2A289	TGCTGATGGTGATGGCGAAT	20	SpyCas9	968
ADORA2A290	CTTCGTGGTATCTCTGGCGG	20	SpyCas9	969
ADORA2A291	AGCACACAAGCACGTTACCC	20	SpyCas9	970
ADORA2A292	GGGCTCCTCGGTGTACATCA	20	SpyCas9	971

【０２４０】

【表４８】

ADORA2A293	GTACACCGAGGAGCCCATGG	20	SpyCas9	972
ADORA2A294	GAACGTCACCAACTTCTTCG	20	SpyCas9	973
ADORA2A295	TCGCCATCCGAATTCCACTC	20	SpyCas9	974
ADORA2A296	GAGTTCCATCTTCAGCCTCT	20	SpyCas9	975
ADORA2A297	GAATTCCACTCCGGTGAGCC	20	SpyCas9	976
ADORA2A298	CAGAGATACCACGAAGAAGT	20	SpyCas9	977
ADORA2A299	CTTCTTCGTGGTATCTCTGG	20	SpyCas9	978
ADORA2A695	CAGTGCTGATGGTGATGGCGA	21	SauCas9	979
ADORA2A696	CGAATTCCACTCCGGTGAGCC	21	SauCas9	980
ADORA2A697	CCGAATTCCACTCCGGTGAGC	21	SauCas9	981
ADORA2A698	GCTGAAGATGGAACTCTGCGT	21	SauCas9	982
ADORA2A699	CGTGCTTGTGTGCTGGGCCGT	21	SauCas9	983
ADORA2A700	GTGAGGACCAGGACAAAGCAG	21	SauCas9	984
ADORA2A701	TCGATGGCAATAGCCAAGAGG	21	SauCas9	985
ADORA2A702	CATCGACAGATACATCGCCAT	21	SauCas9	986
ADORA2A703	GTACACCGAGGAGCCCATGGC	21	SauCas9	987
ADORA2A704	GCTCCACCATGATGTACACCG	21	SauCas9	988
ADORA2A705	AAGCCAGTGCTGATGGTGATG	21	SauCas9	989
ADORA2A706	CACCGCGATGTCAGCCGCCGC	21	SauCas9	990
ADORA2A707	AGGCTGAAGATGGAACTCTGC	21	SauCas9	991
ADORA2A708	GCCGCCGCCAGAGATACCACG	21	SauCas9	992
ADORA2A709	AGCTCCACCATGATGTACACC	21	SauCas9	993
ADORA2A710	AGGCAGCCATGGCAGGCAGCG	21	SauCas9	994
ADORA2A711	CCTGGCTCACCGGAGTGGAAT	21	SauCas9	995
ADORA2A712	CCAGCTCCACCATGATGTACA	21	SauCas9	996

【０２４１】

【表４９】

ADORA2A713	ACCAGGACAAAGCAGGCGAAG	21	SauCas9	997
ADORA2A714	CCTGGGTAACGTGCTTGTGTG	21	SauCas9	998
ADORA2A715	AGGACCAGGACAAAGCAGGCG	21	SauCas9	999
ADORA2A716	TCAGCCGCCGCCAGAGATACC	21	SauCas9	1000
ADORA2A717	GGCTCCTCGGTGTACATCATG	21	SauCas9	1001
ADORA2A718	CTGGCGGCGGCTGACATCGCG	21	SauCas9	1002
ADORA2A719	GATGGAACTCTGCGTGAGGAC	21	SauCas9	1003
ADORA2A720	GCTCCTCGGTGTACATCATGG	21	SauCas9	1004
ADORA2A721	TGTACACCGAGGAGCCCATGG	21	SauCas9	1005
ADORA2A722	GCCATTGCTGTGCTGGCCATC	21	SauCas9	1006
ADORA2A723	CAATAGCCAAGAGGCTGAAGA	21	SauCas9	1007
ADORA2A724	ATGGTGATGGCGAATGGGATG	21	SauCas9	1008
ADORA2A725	ATGTACACCGAGGAGCCCATG	21	SauCas9	1009
ADORA2A726	GTGTGGATCAACAGCAACCTG	21	SauCas9	1010
ADORA2A727	TGCTTTGTCCTGGTCCTCACG	21	SauCas9	1011
ADORA2A728	GTAACCCCTGGCTCACCGGAG	21	SauCas9	1012
ADORA2A729	CCAGCACACAAGCACGTTACC	21	SauCas9	1013
ADORA2A730	TATCTGTCGATGGCAATAGCC	21	SauCas9	1014
ADORA2A731	GCAATAGCCAAGAGGCTGAAG	21	SauCas9	1015
ADORA2A732	AGTGCTGATGGTGATGGCGAA	21	SauCas9	1016
ADORA2A733	ACACCGAGGAGCCCATGGCGG	21	SauCas9	1017
ADORA2A734	CGCCATCCGAATTCCACTCCG	21	SauCas9	1018
ADORA2A4111	TGGTGTCACTGGCGGCGGCC	20	AsCpf1	1019
ADORA2A4112	CCATCACCATCAGCACCGGG	20	AsCpf1	1020
ADORA2A4113	CCATCGGCCTGACTCCCATG	20	AsCpf1	1021

【０２４２】

【表５０】

ADORA2A4114	GCTGACCGCAGTTGTTCCAA	20	AsCpf1	1022
ADORA2A4115	AGGATGTGGTCCCCATGAAC	20	AsCpf1	1023
ADORA2A4116	CCTGTGTGCTGGTGCCCCTG	20	AsCpf1	1024
ADORA2A4117	CGGATCTTCCTGGCGGCGCG	20	AsCpf1	1025
ADORA2A4118	CCCTCTGCTGGCTGCCCCTA	20	AsCpf1	1026
ADORA2A4119	TTCTGCCCCGACTGCAGCCA	20	AsCpf1	1027
ADORA2A4120	AAGGCAGCTGGCACCAGTGC	20	AsCpf1	1028
ADORA2A4121	TAAGGGCATCATTGCCATCTG	21	SauCas9	1029
ADORA2A4122	CGGCCTGACTCCCATGCTAGG	21	SauCas9	1030
ADORA2A4123	GCAGTTGTTCCAACCTAGCAT	21	SauCas9	1031
ADORA2A4124	CCGCAGTTGTTCCAACCTAGC	21	SauCas9	1032
ADORA2A4125	CAAGAACCACTCCCAGGGCTG	21	SauCas9	1033
ADORA2A4126	CTTGGCCCTCCCCGCAGCCCT	21	SauCas9	1034
ADORA2A4127	CACTTGGCCCTCCCCGCAGCC	21	SauCas9	1035
ADORA2A4128	GGCCAAGTGGCCTGTCTCTTT	21	SauCas9	1036
ADORA2A4129	TTCATGGGGACCACATCCTCA	21	SauCas9	1037
ADORA2A4130	TGAAGTACACCATGTAGTTCA	21	SauCas9	1038
ADORA2A4131	CTGGTGCCCCTGCTGCTCATG	21	SauCas9	1039
ADORA2A4132	GCTCATGCTGGGTGTCTATTT	21	SauCas9	1040
ADORA2A4133	CTTCAGCTGTCGTCGCGCCGC	21	SauCas9	1041
ADORA2A4134	CGCGACGACAGCTGAAGCAGA	21	SauCas9	1042
ADORA2A4135	GATGGAGAGCCAGCCTCTGCC	21	SauCas9	1043
ADORA2A4136	GCGTGGCTGCAGTCGGGGCAG	21	SauCas9	1044
ADORA2A4137	ACGATGGCCAGGTACATGAGC	21	SauCas9	1045
ADORA2A4138	CTCTCCCACACCAATTCGGTT	21	SauCas9	1046

【０２４３】

【表５１】

ADORA2A4139	GATTCACAACCGAATTGGTGT	21	SauCas9	1047
ADORA2A4140	GGGATTCACAACCGAATTGGT	21	SauCas9	1048
ADORA2A4141	CGTAGATGAAGGGATTCACAA	21	SauCas9	1049
ADORA2A4142	GGATACGGTAGGCGTAGATGA	21	SauCas9	1050
ADORA2A4143	TCATCTACGCCTACCGTATCC	21	SauCas9	1051
ADORA2A4144	CGGATACGGTAGGCGTAGATG	21	SauCas9	1052
ADORA2A4145	GCGGAAGGTCTGGCGGAACTC	21	SauCas9	1053
ADORA2A4146	AATGATCTTGCGGAAGGTCTG	21	SauCas9	1054
ADORA2A4147	GACGTGGCTGCGAATGATCTT	21	SauCas9	1055
ADORA2A4148	TTGCTGCCTCAGGACGTGGCT	21	SauCas9	1056
ADORA2A4149	CAAGGCAGCTGGCACCAGTGC	21	SauCas9	1057
ADORA2A4150	CGGGCACTGGTGCCAGCTGCC	21	SauCas9	1058
ADORA2A4151	CTTGGCAGCTCATGGCAGTGA	21	SauCas9	1059
ADORA2A4152	CCGTCTCAACGGCCACCCGCC	21	SauCas9	1060
ADORA2A4153	CACACTCCTGGCGGGTGGCCG	21	SauCas9	1061
ADORA2A4154	TGCCGTTGGCCCACACTCCTG	21	SauCas9	1062
ADORA2A4155	CCATTGGGCCTCCGCTCAGGG	21	SauCas9	1063
ADORA2A4156	CATAGCCATTGGGCCTCCGCT	21	SauCas9	1064
ADORA2A4157	AATGGCTATGCCCTGGGGCTG	21	SauCas9	1065
ADORA2A4158	ATGCCCTGGGGCTGGTGAGTG	21	SauCas9	1066
ADORA2A4159	GCCCTGGGGCTGGTGAGTGGA	21	SauCas9	1067
ADORA2A4160	TGGTGAGTGGAGGGAGTGCCC	21	SauCas9	1068
ADORA2A4161	GAGGGAGTGCCCAAGAGTCCC	21	SauCas9	1069
ADORA2A4162	AGGGAGTGCCCAAGAGTCCCA	21	SauCas9	1070
ADORA2A4163	GTCTGGGAGGCCCGTGTTCCC	21	SauCas9	1071

【０２４４】

【表５２】

ADORA2A4164	CATGGCTAAGGAGCTCCACGT	21	SauCas9	1072
ADORA2A4165	GAGCTCCTTAGCCATGAGCTC	21	SauCas9	1073
ADORA2A4166	GCTCCTTAGCCATGAGCTCAA	21	SauCas9	1074
ADORA2A4167	GGCCTAGATGACCCCCTGGCC	21	SauCas9	1075
ADORA2A4168	CCCCCTGGCCCAGGATGGAGC	21	SauCas9	1076
ADORA2A4169	CTCCTGCTCCATCCTGGGCCA	21	SauCas9	1077
ADORA2A4416	CCGTGATGTACACCGAGGAG	20	AsCpf1 RR	1078
ADORA2A4417	CTTTGCCATCACCATCAGCA	20	AsCpf1 RR	1079
ADORA2A4418	TTTGCCATCACCATCAGCAC	20	AsCpf1 RR	1080
ADORA2A4419	TTGCCTGCTTCGTCCTGGTC	20	AsCpf1 RR	1081
ADORA2A4420	TCCTGGTCCTCACGCAGAGC	20	AsCpf1 RR	1082
ADORA2A4421	TCTTCAGTCTCCTGGCCATC	20	AsCpf1 RR	1083
ADORA2A4422	GTCTCCTGGCCATCGCCATT	20	AsCpf1 RR	1084
ADORA2A4423	ACCTAGCATGGGAGTCAGGC	20	AsCpf1 RR	1085
ADORA2A4424	AACCTAGCATGGGAGTCAGG	20	AsCpf1 RR	1086
ADORA2A4425	ATGCTAGGTTGGAACAACTG	20	AsCpf1 RR	1087
ADORA2A4426	GCAGCCCTGGGAGTGGTTCT	20	AsCpf1 RR	1088
ADORA2A4427	CGCAGCCCTGGGAGTGGTTC	20	AsCpf1 RR	1089
ADORA2A4428	AGGGCTGCGGGGAGGGCCAA	20	AsCpf1 RR	1090
ADORA2A4429	TGGGGACCACATCCTCAAAG	20	AsCpf1 RR	1091
ADORA2A4430	CATGAACTACATGGTGTACT	20	AsCpf1 RR	1092
ADORA2A4431	ATGAACTACATGGTGTACTT	20	AsCpf1 RR	1093
ADORA2A4432	ACTTCTTTGCCTGTGTGCTG	20	AsCpf1 RR	1094
ADORA2A4433	TGCTGCTCATGCTGGGTGTC	20	AsCpf1 RR	1095
ADORA2A4434	CAAATAGACACCCAGCATGA	20	AsCpf1 RR	1096

【０２４５】

【表５３】

ADORA2A4435	GCTGTCGTCGCGCCGCCAGG	20	AsCpf1 RR	1097
ADORA2A4436	TGGCGGCGCGACGACAGCTG	20	AsCpf1 RR	1098
ADORA2A4437	TCTGCTTCAGCTGTCGTCGC	20	AsCpf1 RR	1099
ADORA2A4438	GGCAGAGGCTGGCTCTCCAT	20	AsCpf1 RR	1100
ADORA2A4439	CGGCAGAGGCTGGCTCTCCA	20	AsCpf1 RR	1101
ADORA2A4440	CCGGCAGAGGCTGGCTCTCC	20	AsCpf1 RR	1102
ADORA2A4441	CACTGCAGAAGGAGGTCCAT	20	AsCpf1 RR	1103
ADORA2A4442	TGCTGCCAAGTCACTGGCCA	20	AsCpf1 RR	1104
ADORA2A4443	ACAATGATGGCCAGTGACTT	20	AsCpf1 RR	1105
ADORA2A4444	TACACATCATCAACTGCTTC	20	AsCpf1 RR	1106
ADORA2A4445	CTTTCTTCTGCCCCGACTGC	20	AsCpf1 RR	1107
ADORA2A4446	GACTGCAGCCACGCCCCTCT	20	AsCpf1 RR	1108
ADORA2A4447	TCTCTGGCTCATGTACCTGG	20	AsCpf1 RR	1109
ADORA2A4448	CAACCGAATTGGTGTGGGAG	20	AsCpf1 RR	1110
ADORA2A4449	ACACCAATTCGGTTGTGAAT	20	AsCpf1 RR	1111
ADORA2A4450	GTTGTGAATCCCTTCATCTA	20	AsCpf1 RR	1112
ADORA2A4451	TTCATCTACGCCTACCGTAT	20	AsCpf1 RR	1113
ADORA2A4452	TCTACGCCTACCGTATCCGC	20	AsCpf1 RR	1114
ADORA2A4453	CGAGTTCCGCCAGACCTTCC	20	AsCpf1 RR	1115
ADORA2A4454	GCCAGACCTTCCGCAAGATC	20	AsCpf1 RR	1116
ADORA2A4455	CCAGACCTTCCGCAAGATCA	20	AsCpf1 RR	1117
ADORA2A4456	GCAAGATCATTCGCAGCCAC	20	AsCpf1 RR	1118
ADORA2A4457	CAAGATCATTCGCAGCCACG	20	AsCpf1 RR	1119
ADORA2A4458	CAGCCACGTCCTGAGGCAGC	20	AsCpf1 RR	1120
ADORA2A4459	AGGCAGCTGGCACCAGTGCC	20	AsCpf1 RR	1121

【０２４６】

【表５４】

ADORA2A4460	TCACTGCCATGAGCTGCCAA	20	AsCpf1 RR	1122
ADORA2A4461	TCTCAACGGCCACCCGCCAG	20	AsCpf1 RR	1123
ADORA2A4462	CTCAGGGTGGGGAGCACTGC	20	AsCpf1 RR	1124
ADORA2A4463	CACCCTGAGCGGAGGCCCAA	20	AsCpf1 RR	1125
ADORA2A4464	ACCCTGAGCGGAGGCCCAAT	20	AsCpf1 RR	1126
ADORA2A4465	AGGGCATAGCCATTGGGCCT	20	AsCpf1 RR	1127
ADORA2A4466	CTCACCAGCCCCAGGGCATA	20	AsCpf1 RR	1128
ADORA2A4467	TCCACTCACCAGCCCCAGGG	20	AsCpf1 RR	1129
ADORA2A4468	TGGGACTCTTGGGCACTCCC	20	AsCpf1 RR	1130
ADORA2A4469	CTGGGACTCTTGGGCACTCC	20	AsCpf1 RR	1131
ADORA2A4470	CCTGGGACTCTTGGGCACTC	20	AsCpf1 RR	1132
ADORA2A4471	AGGGGAACACGGGCCTCCCA	20	AsCpf1 RR	1133
ADORA2A4472	CGTCTGGGAGGCCCGTGTTC	20	AsCpf1 RR	1134
ADORA2A4473	AGACGTGGAGCTCCTTAGCC	20	AsCpf1 RR	1135
ADORA2A4474	TTGAGCTCATGGCTAAGGAG	20	AsCpf1 RR	1136
ADORA2A4475	CTGGCCTAGATGACCCCCTG	20	AsCpf1 RR	1137
ADORA2A4476	TGGCCTAGATGACCCCCTGG	20	AsCpf1 RR	1138
ADORA2A4477	TCCTGGGCCAGGGGGTCATC	20	AsCpf1 RR	1139
ADORA2A4478	CTGGCCCAGGATGGAGCAGG	20	AsCpf1 RR	1140
ADORA2A4479	TGGCCCAGGATGGAGCAGGA	20	AsCpf1 RR	1141
ADORA2A4480	CGCGAGTTCCGCCAGACCTT	20	AsCpf1 RVR	1142
ADORA2A4481	CCCTGGGGCTGGTGAGTGGA	20	AsCpf1RVR	1143
ADORA2A4482	CCATCGGCCTGACTCCCATGC	21	Cas12a	1174

【０２４７】

本明細書に開示される例示的なｇＲＮＡは、本開示に包含される非限定的な実施形態を説明するために提供されることが理解されるであろう。追加的な適切なｇＲＮＡ配列は、本開示に基づいて当業者に明らかであり、本開示は、この点において限定されない。

【０２４８】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ

本開示に従ったＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとしては、Ｃａｓ９及びＣｐｆ１などの自然発生のクラス２　ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼ並びにそれらから誘導される又は得られる他のヌクレアーゼが挙げられるが、これらに限定されない。機能的には、ＲＮＡ誘導ヌクレア

ーゼは、（ａ）ｇＲＮＡと相互作用し（例えば、複合体形成し）；及び（ｂ）ｇＲＮＡと一緒に、（ｉ）ｇＲＮＡの標的化ドメインに相補的な配列、及び任意選択的に（ｉｉ）下でより詳細に記載される、「プロトスペーサー隣接モチーフ」又は「ＰＡＭ」と称される追加的な配列を含むＤＮＡの標的領域と結合し、任意選択的に切断又は修飾するヌクレアーゼとして定義される。以下の実施例が例証するように、同一ＰＡＭ特異性又は切断活性を共有する個々のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ間に変動が存在し得るとしても、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、広い意味でそれらのＰＡＭ特異性及び切断活性によって定義され得る。当業者は、本開示のいくつかの態様が、特定のＰＡＭ特異性及び／又は切断活性を有する任意の適切なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを使用して実装され得るシステム、方法及び組成物に関することを理解するであろう。この理由から、別段の指定がない限り、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼという用語は、総称として理解されるべきであり、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼのいかなる特定の型（例えば、Ｃａｓ９と対比したＣｐｆ１）、種（例えば、Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）と対比したＳ．アウレウス（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ））又はバリエーション（例えば、完全長と対比した短縮型又は分割；天然ＰＡＭ特異性と対比した操作されたＰＡＭ特異性など）にも限定されない。

【０２４９】

ＰＡＭ配列は、ｇＲＮＡ標的化ドメイン（又は「スペーサー」）に相補的な「プロトスペーサー」配列とのその配列関係からその名前が付けられている。プロトスペーサー配列と共に、ＰＡＭ配列は、特定のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼ／ｇＲＮＡの組み合わせのための標的領域又は配列を規定する。

【０２５０】

様々なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、ＰＡＭとプロトスペーサーとの間の異なる配列関係を必要とし得る。一般に、Ｃａｓ９は、プロトスペーサーの３’であるＰＡＭ配列を認識する。他方、Ｃｐｆ１は、一般にプロトスペーサーの５’であるＰＡＭ配列を認識する。

【０２５１】

ＰＡＭ及びプロトスペーサーの特定の配列の向きを認識することに加えて、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、特定のＰＡＭ配列も認識し得る。例えば、Ｓ．アウレウス（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９は、ＮＮＧＲＲＴ又はＮＮＧＲＲＶのＰＡＭ配列を認識し、ここで、Ｎ残基は、ｇＲＮＡ標的化ドメインによって認識される領域の３’に隣接する。Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９は、ＮＧＧ　ＰＡＭ配列を認識する。Ｆ．ノビシダ（Ｆ．ｎｏｖｉｃｉｄａ）Ｃｐｆ１は、ＴＴＮ　ＰＡＭ配列を認識する。ＰＡＭ配列は、様々なＲＮＡ誘導ヌクレアーゼについて同定されており、新規ＰＡＭ配列を同定するためのストラテジーは、Ｓｈｍａｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ　６０，３８５－３９７，Ｎｏｖｅｍｂｅｒ　５，２０１５によって記載されている。操作されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、参照分子のＰＡＭ特異性と異なるＰＡＭ特異性を有し得ることにも留意すべきである（例えば、操作されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼの場合、参照分子は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼがそれに由来する天然に存在する変異型であり得るか、又は操作されたＲＮＡ誘導ヌクレアーゼとの最大アミノ酸配列相同性を有する天然に存在する変異型であり得る）。

【０２５２】

それらのＰＡＭ特異性に加えて、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、それらのＤＮＡ切断活性によって特徴付けられ得、天然ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、典型的には標的核酸中でＤＳＢを形成するが、ＳＳＢのみを生じるか又は全く切断しない、操作された変異型が生成されている（上記）、Ｒａｎ＆Ｈｓｕ，ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１５４（６），１３８０－１３８９，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ　１２，２０１３（「Ｒａｎ」））。

【０２５３】

Ｃａｓ９

Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９（Ｊｉｎｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　３４３（６１７６），１２４７９９７，２０１４（「Ｊｉｎｅｋ　２０１４」））について及び単分子ガイドＲＮＡ及び標的ＤＮＡと複合体形成したＳ．アウレウス（

Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）Ｃａｓ９（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　２０１４；Ａｎｄｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．２０１４　Ｓｅｐ　２５；５１３（７５１９）：５６９－７３（「Ａｎｄｅｒｓ　２０１４」）；及びＮｉｓｈｉｍａｓｕ　２０１５）について、結晶構造が判定された。

【０２５４】

自然発生のＣａｓ９タンパク質は、認識（ＲＥＣ）ローブ及びヌクレアーゼ（ＮＵＣ）ローブの２つのローブを含み、そのそれぞれは、特定の構造ドメイン及び／又は機能ドメインを含む。ＲＥＣローブは、アルギニンに富む架橋らせん（ＢＨ）ドメイン及び少なくとも１つのＲＥＣドメイン（例えば、ＲＥＣ１ドメイン、任意選択的にＲＥＣ２ドメイン）を含む。ＲＥＣローブは、他の既知のタンパク質と構造的類似性を共有せず、独特の機能ドメインであることが示唆される。いかなる理論による拘束も望まないが、変異解析は、ＢＨ及びＲＥＣドメインの特定の機能的役割を示唆する。ＢＨドメインは、ｇＲＮＡ：ＤＮＡ認識において役割を果たすようようである一方、ＲＥＣドメインは、ｇＲＮＡのリピート：アンチリピート二重鎖と相互作用し、Ｃａｓ９／ｇＲＮＡ複合体の形成を媒介すると考えられている。

【０２５５】

ＮＵＣローブは、ＲｕｖＣドメイン、ＨＮＨドメイン及び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の構造的類似性を共有し、標的核酸の非相補的（すなわち下部）鎖を切断する。それは、２つ以上の分割ＲｕｖＣモチーフ（Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）及びＳ．アウレウス（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）中のＲｕｖＣＩ、ＲｕｖＣＩＩ及びＲｕｖＣＩＩＩなど）から形成され得る。一方、ＨＮＨドメインは、ＨＮＮエンドヌクレアーゼモチーフと構造的に類似しており、標的核酸の相補的（すなわち上部）鎖を切断する。その名前が示唆するように、ＰＩドメインは、ＰＡＭ特異性に寄与する。

【０２５６】

Ｃａｓ９の特定の機能は、（それによって必ずしも完全に決定されるわけではないが）上記の特定のドメインに関連づけられている一方、これらの及び他の機能は、他のＣａｓ９ドメイン又はいずれかのローブ上の複数のドメインによって媒介又は影響され得る。例えば、Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　２０１４に記載されるように、Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９では、ｇＲＮＡのリピート：アンチリピート二重鎖がＲＥＣとＮＵＣローブとの間の溝に入り、二重鎖中のヌクレオチドがＢＨ、ＰＩ及びＲＥＣドメイン中のアミノ酸と相互作用する。第２の及び第３のステムループ内のいくつかのヌクレオチド（ＲｕｖＣ及びＰＩドメイン）がそうであるように、第１のステムループ構造内のいくつかのヌクレオチドは、複数のドメイン（ＰＩ、ＢＨ及びＲＥＣ１）内のアミノ酸とも相互作用する。

【０２５７】

Ｃｐｆ１

ｃｒＲＮＡと、ＴＴＴＮ　ＰＡＭ配列などのｄｓＤＮＡ標的と複合体形成したアシダミノコッカス属（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）種Ｃｐｆ１の結晶構造は、参照により本明細書に援用されるＹａｍａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．（Ｃｅｌｌ．２０１６　Ｍａｙ　５；１６５（４）：９４９－９６２（「Ｙａｍａｎｏ」）によって解析されている。Ｃａｓ９と同様に、Ｃｐｆ１には、ＲＥＣ（認識）ローブとＮＵＣ（ヌクレアーゼ）ローブの２つのローブがある。ＲＥＣローブは、ＲＥＣ１及びＲＥＣ２ドメインを含み、これらは、いかなる既知のタンパク質構造とも類似性がない。一方、ＮＵＣローブは、３つのＲｕｖＣドメイン（ＲｕｖＣ－Ｉ、－ＩＩ及び－ＩＩＩ）と１つのＢＨドメインとを含む。しかし、Ｃａｓ９とは対照的に、Ｃｐｆ１　ＲＥＣローブは、ＨＮＨドメインを欠いており、既知のタンパク質構造との類似性を欠く他のドメイである、構造的にユニークなＰＩドメインと、３つのウェッジ（ＷＥＤ）ドメイン（ＷＥＤ－Ｉ、－ＩＩ及び－ＩＩＩ）と、ヌクレアーゼ（Ｎｕｃ）ドメインとを含む。

【０２５８】

Ｃａｓ９及びＣｐｆ１は、構造及び機能において類似性を共有する一方、特定のＣｐｆ１活性は、いずれのＣａｓ９ドメインにも類似していない構造ドメインによって媒介されることを理解すべきである。例えば、標的ＤＮＡの相補鎖の切断は、Ｃａｓ９のＨＮＨドメインと配列的及び空間的に異なるＮｕｃドメインによって媒介されるようである。さらに、Ｃｐｆ１　ｇＲＮＡの非標的化部分（ハンドル）は、Ｃａｓ９　ｇＲＮＡ中のリピート：アンチリピート二重鎖によって形成されるステムループ構造ではなく、むしろ偽結び目構造を取る。

【０２５９】

ヌクレアーゼ変異型

本明細書に記載されるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、様々な用途に有用であり得る活性及び特性を有するが、当業者は、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼも、場合により修飾されて、切断活性、ＰＡＭ特異性又は他の構造的若しくは機能的特徴が改変され得ることを認識するであろう。

【０２６０】

まず、切断活性を改変する修飾に注目すると、ＮＵＣローブ内のドメインの活性を低減又は排除する変異が上に記載されている。ＲｕｖＣドメイン、Ｃａｓ９ＨＮＨドメイン又はＣｐｆ１Ｎｕｃドメインで生じ得る例示的な変異については、そのそれぞれの内容全体が参照により本明細書に援用されるＲａｎ＆Ｈｓｕ，ｅｔ　ａｌ．，（Ｃｅｌｌ　１５４（６），１３８０－１３８９，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ　１２，２０１３）及びＹａｍａｎｏ，ｅｔ　ａｌ．（Ｃｅｌｌ．２０１６　Ｍａｙ　５；１６５（４）：９４９－９６２）；並びにＣｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏによる国際公開第２０１６／０７３９９０号パンフレットに記載されている。一般に、２つのヌクレアーゼドメインの１つの活性を低減又は排除する変異は、ニッカーゼ活性を有するＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをもたらすが、ニッカーゼ活性の種類は、いずれのドメインが不活性化されるかによって変化することに留意すべきである。一例として、ＲｕｖＣドメイン又はＣａｓ９ＨＮＨドメインの不活性化は、ニッカーゼをもたらす。

【０２６１】

天然に存在するＣａｓ９参照分子と比較したＰＡＭ特異性の改変は、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．により、Ｓ．ピオゲネス（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．２０１５　Ｊｕｌ　２３；５２３（７５６１）：４８１－５）；及びＳ．アウレウス（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１５　Ｄｅｃ；３３（１２）：１２９３－１２９８）の両方について記載されている。Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．は、Ｃａｓ９の標的化忠実度を改善する改変についても記載している（Ｎａｔｕｒｅ，２０１６　Ｊａｎｕａｒｙ　２８；５２９，４９０－４９５）。これらの参考文献のそれぞれは、参照により本明細書に援用される。

【０２６２】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１５　Ｆｅｂ；３３（２）：１３９－４２、参照により援用される）及びＦｉｎｅ　ｅｔ　ａｌ．（Ｓｃｉ　Ｒｅｐ．２０１５　Ｊｕｌ　１；５：１０７７７、参照により援用される）によって記載されているように、２つ以上の部分に分割される。

【０２６３】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、特定の実施形態では、例えばｇＲＮＡ結合、標的及びＰＡＭ認識並びに切断活性をなおも維持しながら、ヌクレアーゼのサイズを低下させる１つ又は複数の欠失を通じてサイズ最適化又は短縮され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、任意選択でリンカーにより、別のポリペプチド、ヌクレオチド又は他の構造に共有結合的に又は非共有結合的に結合する。例示的な結合ヌクレアーゼ及びリンカーは、参照により本明細書に援用されるＧｕｉｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３２，５７７－５８２（２０１４）によって記載される。

【０２６４】
ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、任意選択的に、核局在化シグナルをはじめとするが、これに限定されない標識を含んで、核内へのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼタンパク質の移動も容易にする。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、Ｃ末端及び／又はＮ末端の核局在化シグナルを組み込み得る。核局在化配列は、当技術分野で公知であり、Ｍａｅｄｅｒ及び他の箇所に記載される。
【０２６５】
前述の修飾の一覧は、本質的に例示的であることを意図しており、当業者は、本開示に鑑みて、他の修正形態が特定の用途において可能であるか、又は望ましいことがあり得ることを理解するであろう。したがって、簡潔さのために、本開示の例示的なシステム、方法及び組成物は、特定のＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを参照して提示されるが、使用されるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼは、それらの動作原理を変えない様式で改変され得るものと理解されるべきである。このような改変形態は、本開示の範囲内である。
【０２６６】
例示的な適切なヌクレアーゼ変異型としては、Ｍ５３７Ｒ置換、Ｈ８００Ａ置換及び／又はＦ８７０Ｌ置換又はそれらの任意の組み合わせを含む、ＡｓＣｐｆ１変異型が挙げられるが、これらに限定されない（番号付けスキームはＡｓＣｐｆ１野生型配列に準拠する）。いくつかの実施形態では、ＡＳＣｐｆ１現鋳型は、Ｍ５３７Ｒ置換、Ｈ８００Ａ置換及びＦ８７０Ｌ置換を含む。ＡｓＣｐｆ１アミノ酸配列の他の適切な改変は、当業者に知られている。野生型ＡｓＣｐｆ１及びＡｓＣｐｆ１変異型のいくつかの例示的な配列を以下に提供する。
【０２６７】
Ｈｉｓ－ＡｓＣｐｆ１－ｓＮＬＳ－ｓＮＬＳＨ８００Ａアミノ酸配列（配列番号１１４４）：
【化４】

MGHHHHHHGSTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYK
ELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAI
HDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFD
KFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFE
NVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNL
AIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNEN
VLETAEALFNELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKS
AKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQE
EKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNY
ATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRY
KALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFI
EPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKT
TSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKD
FAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAARLGEK
MLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRR
FTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDST
GKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIV
DLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKV
GGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHES
RKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDA
KGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDD
SHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADA
NGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRNGSPKKKRKVGSPK
KKRKV

【０２６８】
Ｃｐｆ１変異型１アミノ酸配列（配列番号１１４５）：

【化５】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYK
TYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDN
LTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYE
NRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVS
TSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAH
IIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFN
ELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLK
HEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDS
LLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEK
FKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKT
SEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDL
NNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSS
QYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPN
LHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQ
KTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFHV
PITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLN
TIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAV
VVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQL
TDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDF
LHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRI
VPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALI
RSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKG
QLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRK
VGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLEHHHHHH

【０２６９】

Ｃｐｆ１変異型２アミノ酸配列（配列番号１１４６）：

【化６】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYK
TYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDN
LTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYE
NRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVS
TSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAH
IIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFN
ELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLK
HEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDS
LLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEK
FKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKT
SEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDL
NNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSS
QYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPN
LHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQ
KTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHV
PITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLN
TIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAV
VVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQL
TDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDF
LHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRI
VPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALI
RSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKG
QLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRK
VGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLEHHHHHH

【０２７０】
Ｃｐｆ１変異型３アミノ酸配列（配列番号１１４７）：
【化７】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYK
TYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDN
LTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYE
NRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVS
TSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAH
IIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFN
ELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLK
HEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDS
LLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEK
FKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKT
SEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDL
NNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSS
QYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPN
LHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAARLGEKMLNKKLKDQ
KTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFHV
PITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLN
TIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAV
VVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQL
TDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDF
LHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRI
VPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALI
RSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKG
QLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRK
VGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLEHHHHHH

【０２７１】
Ｃｐｆ１変異型４アミノ酸配列（配列番号１１４８）：

【化８】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYK
TYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDN
LTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYE
NRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVS
TSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAH
IIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFN
ELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLK
HEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDS
LLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEK
FKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKT
SEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDL
NNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSS
QYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPN
LHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAARLGEKMLNKKLKDQ
KTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFHV
PITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLN
TIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAV
VVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQL
TDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDF
LHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRI
VPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALI
RSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKG
QLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRK
V

【０２７２】

Ｃｐｆ１変異型５アミノ酸配列（配列番号１１４９）：

【化９】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYK
TYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDN
LTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYE
NRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVS
TSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAH
IIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFN
ELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLK
HEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDS
LLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEK
FKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKT
SEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDL
NNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSS
QYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPN
LHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQ
KTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFHV
PITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLN
TIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAV
VVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQL
TDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDF
LHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRI
VPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALI
RSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKG
QLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRK
V

【０２７３】
Ｃｐｆ１変異型６アミノ酸配列（配列番号１１５０）：
【化１０】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYK
TYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDN
LTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYE
NRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVS
TSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAH
IIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFN
ELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLK
HEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDS
LLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEK
FKLNFQRPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKT
SEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDL
NNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSS
QYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPN
LHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQ
KTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFLFHV
PITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLN
TIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAV
VVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQL
TDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDF
LHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRI
VPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALI
RSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKG
QLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRNGRSSDDEATADSQHAAPPKKKRK
VGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSLEHHHHHH

【０２７４】
Ｃｐｆ１変異型７アミノ酸配列（配列番号１１５１）：

【化１１】

MGRDPGKPIPNPLLGLDSTAPKKKRKVGIHGVPAATQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQ
GKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDS
YRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNG
KVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFP
KFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYN
QLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFIL
EEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCD
HWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKELSEAFKQK
TSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEF
SARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQMPTLASGWDVNKEKNN
GAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTSEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCS
TQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQK
GYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRI
AEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNG
QAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDL
SDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLK
EHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQA
WSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQ
FEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTS
KIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRG
LPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALL
EEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIRSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDL
NGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWL
AYIQELRNPKKKRKVKLAAALEHHHHHH

【０２７５】

例示的なＡｓＣｐｆ１野生型アミノ酸配列（配列番号１１５２）：

【化１２】

MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPIIDRIYK
TYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAIHDYFIGRTDN
LTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENALLRSFDKFTTYFSGFYE
NRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLITAVPSLREHFENVKKAIGIFVS
TSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISREAGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAH
IIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEFKSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFN
ELNSIDLTHIFISHKKLETISSALCDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLK
HEDINLQEIISAAGKELSEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDS
LLGLYHLLDWFAVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEK
FKLNFQMPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKT
SEGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITKEIYDL
NNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTSIDLSSLRPSS
QYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIYNKDFAKGHHGKPN
LHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKRMAHRLGEKMLNKKLKDQ
KTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPNVITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHV
PITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPETPIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLN
TIQQFDYQKKLDNREKERVAARQAWSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAV
VVLENLNFGFKSKRTGIAEKAVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQL
TDQFTSFAKMGTQSGFLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDF
LHYDVKTGDFILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRI
VPVIENHRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALI
RSVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIALKG
QLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN

【０２７６】

追加的な適切なヌクレアーゼ及びヌクレアーゼ変異型は、当技術分野の知識に鑑みて、本開示に基づいて当業者に明らかであろう。例示的な適切なヌクレアーゼは、本明細書の表２に示されるものを含み得るが、これらに限定されない。

【０２７７】

ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする核酸

例えば、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１又はその機能性断片などのＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコード化する核酸が本明細書で提供される。ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコード化する例示的な核酸は、以前記載されている（例えば、Ｃｏｎｇ　２０１３；Ｗａｎｇ　２０１３；Ｍａｌｉ　２０１３；Ｊｉｎｅｋ　２０１２を参照されたい）。

【０２７８】

場合により、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする核酸は、合成核酸配列であり得る。例えば、合成核酸分子は、化学修飾され得る。特定の実施形態では、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡは、以下の特性の１つ又は複数の（例えば、全て）を有するであろう：それは、キャップされ得；ポリアデニル化され得；５－メチルシチジン及び／又はプソイドウリジンで置換され得る。

【０２７９】

合成核酸配列もコドン最適化され得、例えば少なくとも１つの一般的でないコドン又はそれほど一般的でないコドンが一般的なコドンによって置き換えられる。例えば、合成核酸は、例えば、本明細書に記載される哺乳類発現系内での発現のために最適化された最適化メッセンジャーｍＲＮＡの合成を誘導し得る。コドン最適化されたＣａｓ９コード配列の例は、Ｃｏｔｔａ－Ｒａｍｕｓｉｎｏに提示されている。

【０２８０】

さらに又は代わりに、ＲＮＡ誘導ヌクレアーゼをコードする核酸は、核局在化配列（ＮＬＳ）を含み得る。核局在化配列は、当技術分野で公知である。

【０２８１】

一例として、Ｃｐｆ１変異型４の核酸配列を配列番号１１７７として以下に示す。

【化１３】

ATGACCCAGTTTGAAGGTTTCACCAATCTGTATCAGGTTAGCAAAACCCTGCGTTTTGAACT
GATTCCGCAGGGTAAAACCCTGAAACATATTCAAGAACAGGGCTTCATCGAAGAGGATAAAG
CACGTAACGATCACTACAAAGAACTGAAACCGATTATCGACCGCATCTATAAAACCTATGCA
GATCAGTGTCTGCAGCTGGTTCAGCTGGATTGGGAAAATCTGAGCGCAGCAATTGATAGTTA
TCGCAAAGAAAAAACCGAAGAAACCCGTAATGCACTGATTGAAGAACAGGCAACCTATCGTA
ATGCCATCCATGATTATTTCATTGGTCGTACCGATAATCTGACCGATGCAATTAACAAACGT
CACGCCGAAATCTATAAAGGCCTGTTTAAAGCCGAACTGTTTAATGGCAAAGTTCTGAAACA
GCTGGGCACCGTTACCACCACCGAACATGAAAATGCACTGCTGCGTAGCTTTGATAAATTCA
CCACCTATTTCAGCGGCTTTTATGAGAATCGCAAAAACGTGTTTAGCGCAGAAGATATTAGC
ACCGCAATTCCGCATCGTATTGTGCAGGATAATTTCCCGAAATTCAAAGAGAACTGCCACAT
TTTTACCCGTCTGATTACCGCAGTTCCGAGCCTGCGTGAACATTTTGAAAACGTTAAAAAAG
CCATCGGCATCTTTGTTAGCACCAGCATTGAAGAAGTTTTTAGCTTCCCGTTTTACAATCAG
CTGCTGACCCAGACCCAGATTGATCTGTATAACCAACTGCTGGGTGGTATTAGCCGTGAAGC
AGGCACCGAAAAAATCAAAGGTCTGAATGAAGTGCTGAATCTGGCCATTCAGAAAAATGATG
AAACCGCACATATTATTGCAAGCCTGCCGCATCGTTTTATTCCGCTGTTCAAACAAATTCTG
AGCGATCGTAATACCCTGAGCTTTATTCTGGAAGAATTCAAATCCGATGAAGAGGTGATTCA
GAGCTTTTGCAAATACAAAACGCTGCTGCGCAATGAAAATGTTCTGGAAACTGCCGAAGCAC
TGTTTAACGAACTGAATAGCATTGATCTGACCCACATCTTTATCAGCCACAAAAAACTGGAA
ACCATTTCAAGCGCACTGTGTGATCATTGGGATACCCTGCGTAATGCCCTGTATGAACGTCG
TATTAGCGAACTGACCGGTAAAATTACCAAAAGCGCGAAAGAAAAAGTTCAGCGCAGTCTGA
AACATGAGGATATTAATCTGCAAGAGATTATTAGCGCAGCCGGTAAAGAACTGTCAGAAGCA
TTTAAACAGAAAACCAGCGAAATTCTGTCACATGCACATGCAGCACTGGATCAGCCGCTGCC
GACCACCCTGAAAAAACAAGAAGAAAAAGAAATCCTGAAAAGCCAGCTGGATAGCCTGCTGG
GTCTGTATCATCTGCTGGACTGGTTTGCAGTTGATGAAAGCAATGAAGTTGATCCGGAATTT
AGCGCACGTCTGACCGGCATTAAACTGGAAATGGAACCGAGCCTGAGCTTTTATAACAAAGC
CCGTAATTATGCCACCAAAAAACCGTATAGCGTCGAAAAATTCAAACTGAACTTTCAGCGTC
CGACCCTGGCAAGCGGTTGGGATGTTAATAAAGAAAAAAACAACGGTGCCATCCTGTTCGTG

【化１４】

AAAAATGGCCTGTATTATCTGGGTATTATGCCGAAACAGAAAGGTCGTTATAAAGCGCTGAG
CTTTGAACCGACGGAAAAAACCAGTGAAGGTTTTGATAAAATGTACTACGACTATTTTCCGG
ATGCAGCCAAAATGATTCCGAAATGTAGCACCCAGCTGAAAGCAGTTACCGCACATTTTCAG
ACCCATACCACCCCGATTCTGCTGAGCAATAACTTTATTGAACCGCTGGAAATCACCAAAGA
GATCTACGATCTGAATAACCCGGAAAAAGAGCCGAAAAAATTCCAGACCGCATATGCAAAAA
AAACCGGTGATCAGAAAGGTTATCGTGAAGCGCTGTGTAAATGGATTGATTTCACCCGTGAT
TTTCTGAGCAAATACACCAAAACCACCAGTATCGATCTGAGCAGCCTGCGTCCGAGCAGCCA
GTATAAAGATCTGGGCGAATATTATGCAGAACTGAATCCGCTGCTGTATCATATTAGCTTTC
AGCGTATTGCCGAGAAAGAAATCATGGACGCAGTTGAAACCGGTAAACTGTACCTGTTCCAG
ATCTACAATAAAGATTTTGCCAAAGGCCATCATGGCAAACCGAATCTGCATACCCTGTATTG
GACCGGTCTGTTTAGCCCTGAAAATCTGGCAAAAACCTCGATTAAACTGAATGGTCAGGCGG
AACTGTTTTATCGTCCGAAAAGCCGTATGAAACGTATGGCAGCTCGTCTGGGTGAAAAAATG
CTGAACAAAAAACTGAAAGACCAGAAAACCCCGATCCCGGATACACTGTATCAAGAACTGTA
TGATTATGTGAACCATCGTCTGAGCCATGATCTGAGTGATGAAGCACGTGCCCTGCTGCCGA
ATGTTATTACCAAAGAAGTTAGCCACGAGATCATTAAAGATCGTCGTTTTACCAGCGACAAA
TTCCTGTTTCATGTGCCGATTACCCTGAATTATCAGGCAGCAAATAGCCCGAGCAAATTTAA
CCAGCGTGTTAATGCATATCTGAAAGAACATCCAGAAACGCCGATTATTGGTATTGATCGTG
GTGAACGTAACCTGATTTATATCACCGTTATTGATAGCACCGGCAAAATCCTGGAACAGCGT
AGCCTGAATACCATTCAGCAGTTTGATTACCAGAAAAAACTGGATAATCGCGAGAAAGAACG
TGTTGCAGCACGTCAGGCATGGTCAGTTGTTGGTACAATTAAAGACCTGAAACAGGGTTATC
TGAGCCAGGTTATTCATGAAATTGTGGATCTGATGATTCACTATCAGGCCGTTGTTGTGCTG
GAAAACCTGAATTTTGGCTTTAAAAGCAAACGTACCGGCATTGCAGAAAAAGCAGTTTATCA
GCAGTTCGAGAAAATGCTGATTGACAAACTGAATTGCCTGGTGCTGAAAGATTATCCGGCTG
AAAAAGTTGGTGGTGTTCTGAATCCGTATCAGCTGACCGATCAGTTTACCAGCTTTGCAAAA
ATGGGCACCCAGAGCGGATTTCTGTTTTATGTTCCGGCACCGTATACGAGCAAAATTGATCC
GCTGACCGGTTTTGTTGATCCGTTTGTTTGGAAAACCATCAAAAACCATGAAAGCCGCAAAC
ATTTTCTGGAAGGTTTCGATTTTCTGCATTACGACGTTAAAACGGGTGATTTCATCCTGCAC
TTTAAAATGAATCGCAATCTGAGTTTTCAGCGTGGCCTGCCTGGTTTTATGCCTGCATGGGA
TATTGTGTTTGAGAAAAACGAAACACAGTTCGATGCAAAAGGCACCCCGTTTATTGCAGGTA
AACGTATTGTTCCGGTGATTGAAAATCATCGTTTCACCGGTCGTTATCGCGATCTGTATCCG
GCAAATGAACTGATCGCACTGCTGGAAGAGAAAGGTATTGTTTTTCGTGATGGCTCAAACAT
TCTGCCGAAACTGCTGGAAAATGATGATAGCCATGCAATTGATACCATGGTTGCACTGATTC
GTAGCGTTCTGCAGATGCGTAATAGCAATGCAGCAACCGGTGAAGATTACATTAATAGTCCG

【化１５】

GTTCGTGATCTGAATGGTGTTTGTTTTGATAGCCGTTTTCAGAATCCGGAATGGCCGATGGA
TGCAGATGCAAATGGTGCATATCATATTGCACTGAAAGGACAGCTGCTGCTGAACCACCTGA
AAGAAAGCAAAGATCTGAAACTGCAAAACGGCATTAGCAATCAGGATTGGCTGGCATATATC
CAAGAACTGCGTAACGGTCGTAGCAGTGATGATGAAGCAACCGCAGATAGCCAGCATGCAGC
ACCGCCTAAAAAGAAACGTAAAGTT

【０２８２】
アクチビン
ＴＧＦ－βスーパーファミリーは、アクチビン、インヒビン、ミオスタチン、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）、成長及び分化因子（ＧＤＦ）及びノダールをはじめとする４５を超えるメンバーからなる（例えば、Ｍｏｒｉａｎｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｉｔｙ １０４：１０２３１４（２０１９）を参照されたい）。アクチビンは、ジスルフィド結合で結合したβＡ又は／及びβＢサブユニットのホモ二量体又はヘテロ二量体のいずれかとして見られる。アクチビンには、アクチビンＡ（βＡβＡ）、アクチビンＢ（βＢβＢ）及びアクチビンＡＢ（βＡβＢ）の３つの機能的イソ型がある（Ｘｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２０２：１－１２（２００９））。βＣ及びβＥサブユニットは哺乳類に見られ、βＢサブユニットはアフリカツメガエル（Ｘｅｎｏｐｕｓ ｌａｅｖｉｓ）に見られる。βＡ及びβＢサブユニットの転写物は、人体のほぼ全ての組織内で検出され、生殖器系での発現の増加を示す一方、βＣ及びβＥサブユニットは、主に肝臓で発現される（Ｗｏｏｄｒｕｆｆ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．５５：９５３－９６３（１９９８））。アクチビンＡは約２５ｋＤａのサイトカインであり、アクチビンファミリーの中で最も広く研究されているタンパク質である。アクチビンＡは最初、下垂体からの卵胞刺激ホルモンの生合成と分泌を誘導する性腺タンパク質として同定された（Ｈｅｄｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｖ．２４：２８５－２９５（２０１３））。これは脊椎動物間で高度に保存されており、種間で最大９５％の相同性に達する。アクチビンＡは、造血、胚発生、幹細胞の維持と万能性、組織修復及び線維症などの基本的な生物学的プロセスを調節する（Ｋａｒｉｙａｗａｓａｍ ｅｔ ａｌ，Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ａｌｌｅｒｇｙ ４１：１５０５－１５１４（２０１１））。
【０２８３】
例えば、アクチビンＡなどのアクチビンは良く知られており、市販されている（例えば、ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡから）。
【０２８４】
培養方法
一般に、ＥＳ細胞（例えば、１つ又は複数のＴＧＦβ受容体、例えばＴＧＦβＲＩＩを発現しないように遺伝的に操作されたＥＳ細胞）は、アクチビン、例えば特定の有効レベルのアクチビンを含有する培地中で（例えば、培養の１つ又は複数の段階中）、このようなＥＳ細胞を培養することにより、万能性が維持され得る。
【０２８５】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＥＳ細胞は、例えば、高レベルのアクチビンなどのアクチビンを含む培地中で培養され（例えば、培養の１つ又は複数の段階で）、細胞の万能性が維持される。いくつかの実施形態では、培養からの細胞サンプル中の１つ又は複数のＥＳマーカー（例えば、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＴＲＡ－２－４９／６Ｅ、ＡＬＰ、Ｓｏｘ２、Ｅ－カドヘリン、ＵＴＦ－１、Ｏｃｔ４、Ｒｅｘ１及び／又はＮａｎｏｇ）のレベルは、例えば、高レベルのアクチビンなどのアクチビンを含まない同じ培地を用いて培養された細胞サンプル中の対応するレベルに比べて上昇する。いくつかの実施形態では、１つ又は複数のＥＳマーカーのレベルの上昇は、対応するレベルの少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、３５０％、４００％、４５０％、５００％又はそれを超えて、対応するレベルよりも高い。
【０２８６】
本明細書の用法では、「高レベルのアクチビンレベル」は、標準培地、出発培地、培養の１つ又は複数の段階で使用される培地及び／又はその中でＥＳ細胞が培養される培地中に存在するよりも高濃度のアクチビンを意味する。いくつかの実施形態では、アクチビン

は、標準及び／又は開始培地中、培養の１つ又は複数の他の段階で使用される培地中及び／又はその中でＥＳ細胞が培養される培地中に存在せず、「高レベル」は、アクチビンの任意の量である。培地は、最初に（すなわち培養の開始時）、高レベルのアクチビンを含み得、且つ／又は培養中の特定の時点又は複数の時点（例えば、１つ又は複数の段階）で培地にアクチビンが補充され、高レベルのアクチビンが達成され得る。

【０２８７】

いくつかの実施形態では、高レベルのアクチビンは、標準培地、出発培地、培養の１つ又は複数の段階における培地及び／又はその中でＥＳ細胞が培養される培地中のアクチビンレベルに比べて、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、３５０％、４００％、４５０％、５００％、５５０％、６００％、６５０％、７００％、７５０％、８００％、８５０％、９００％、９５０％、１０００％又はそれを超える増加である。

【０２８８】

いくつかの実施形態では、高レベルのアクチビンは、約０．５ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ、２ｎｇ／ｍＬ、３ｎｇ／ｍＬ、４ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、１５ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ、２５ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ、３５ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ、４５ｎｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬ、６０ｎｇ／ｍＬ、７０ｎｇ／ｍＬ、８０ｎｇ／ｍＬ、９０ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬ又はそれを超えるアクチビンである。いくつかの実施形態では、高レベルのアクチビンは、約０．５ｎｇ／ｍＬ～約２０ｎｇ／ｍＬのアクチビン、約０．５ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬのアクチビン、約４ｎｇ／ｍＬ～約１０ｎｇ／ｍＬのアクチビンである。

【０２８９】

細胞は、本明細書に記載されているようにアクチビンを含むように本開示に従って改変された、当技術分野で公知の様々な細胞培養培地中で培養され得る。細胞培養培地は、その中で動物又は哺乳類細胞などの細胞が増殖される栄養溶液を指すと、当業者によって理解されている。細胞培養培地一般には、エネルギー源（例えば、グルコースなどの炭水化物）；アミノ酸；ビタミン；脂質又は遊離脂肪酸；及び例えば、マイクロモル濃度範囲内の無機化合物又は天然に存在する元素などの微量元素の構成成分の１つ又は複数を含む。細胞培養培地は、ホルモン及び他の成長因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、上皮成長因子、血清など）；シグナル伝達因子（例えば、インターロイキン１５（ＩＬ－１５）、形質転換成長因子β（ＴＧＦ－β）など）；塩類（例えば、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩）；緩衝剤（例えば、ＨＥＰＥＳ）；ヌクレオシド及び塩基（例えば、アデノシン、チミジン、ヒポキサンチン）；抗生物質（例えば、ゲンタマイシン）；及び細胞保護剤（例えば、プルロニックポリオール（プルロニックＦ６８））などの追加的な構成要素も含有し得る。

【０２９０】

調製された又は市販の培地は、本明細書に記載の方法における利用のために、本開示に従って変更され得る。このような培地の非限定的な例としては、基礎培地（ＭＥＭ、Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．）；ハムＦ１０培地（Ｓｉｇｍａ）；ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ、Ｓｉｇｍａ）；ＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｓｉｇｍａ）；ＨｙＣｌｏｎｅ細胞培養培地（ＨｙＣｌｏｎｅ，Ｌｏｇａｎ，Ｕｔａｈ）；Ｐｏｗｅｒ ＣＨＯ２（Ｌｏｎｚａ Ｉｎｃ．，Ａｌｌｅｎｄａｌｅ，ＮＪ）；及び特定の細胞型のために調合された化学的に定義された（ＣＤ）培地が挙げられる。いくつかの実施形態では、培養培地は、例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ８：４２４－４２９（２０１１））に記載されているＥ８培地である。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、アクチビンを含むがＴＧＦβを欠く。

【０２９１】

ＥＳ細胞に適する細胞培養条件（ｐＨ、O_2、CO_2、撹拌速度及び温度を含む）は、Ｓｃｈｗａｒｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．７６７：１０７－１２３（２０１１）及びＣｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ８：４２

４－４２９（２０１１）に記載されているような、当技術分野で公知のものである。

【０２９２】

いくつかの実施形態では、細胞は１つ又は複数の段階で培養され、細胞は、１つ又は複数の段階で高レベルのアクチビンを有する培地中で培養され得る。例えば、培養方法は、第１段階（例えば、低レベルのアクチビンを有するか又はアクチビンを含まない培地を使用する）及び第２段階（例えば、高レベルのアクチビンを有する培地を使用する）を含み得る。いくつかの実施形態では、培養方法は、第１の段階（例えば、高レベルのアクチビンを有する培地を使用する）及び第２の段階（例えば、低レベルのアクチビンを有する培地を使用する）を含み得る。いくつかの実施形態では、培養方法は、２つを超える段階、例えば３、４、５、６又はそれを超える段階を含み、任意の段階は、高レベルのアクチビン又は低レベルのアクチビンを有する培地を含み得る。培養の長さは制限されない。例えば、培養方法は、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０又はそれを超える日数であり得る。いくつかの実施形態では、培養方法は、少なくとも２つの段階を含む。例えば、第１段階は、低レベルのアクチビンを有する培地中で（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれを超える日数）細胞を培養することを含み得る。第２段階は、高レベルのアクチビンを有する培地中で（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれを超える日数）細胞を培養することを含み得る。いくつかの実施形態では、第１段階は、高レベルのアクチビンを有する培地中で（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれを超える日数）細胞を培養することを含み得、第２段階は、低レベルのアクチビンを有する培地中で（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれを超える日数）細胞を培養することを含み得る。

【０２９３】

特定の方法では、細胞培養からの細胞のサンプルで発現された、１つ又は複数のＥＳマーカー（例えば、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、ＴＲＡ－１－６０、ＴＲＡ－１－８１、ＴＲＡ－２－４９／６Ｅ、ＡＬＰ、Ｓｏｘ２、Ｅ－カドヘリン，ＵＴＦ－１、Ｏｃｔ４、Ｒｅｘ１及び／又はＮａｎｏｇ）のレベルは、細胞培養中に１回又は複数回（例えば、１つ又は複数の段階）モニターされ、それにより培養の調整（例えば、培養中のアクチビンの量の増減）、培養の停止及び／又は培養からの細胞の採取が可能になる。

【０２９４】

特性評価方法

細胞の表現型を特性評価することを含めた、細胞の特性評価方法は、当業者に知られている。いくつかの実施形態では、１つ又は複数のこのような方法は、例えば、形態学的分析及びフローサイトメトリーを含み得るが、これらに限定されない。細胞系統及び同一性マーカーは、当業者に知られている。１つ又は複数のこのようなマーカーが、１つ又は複数の特性評価方法と組み合わされて、細胞集団の組成又は１つ若しくは複数の細胞の表現型の同一性が判定され得る。例えば、いくつかの実施形態では、特定の集団の細胞は、フローサイトメトリーを使用して特性評価されるであろう。いくつかのこのような実施形態では、細胞集団のサンプルは、１つ又は複数の細胞表面マーカー及び／又は１つ又は複数の細胞内マーカーの存在及び割合について評価されるであろう。当業者によって理解されるように、このような細胞表面マーカーは、異なる系統を代表し得る。例えば、万能性細胞は、例えば、ＣＤ３４などの、このような細胞に関連することが知られている任意の数のマーカーの１つ又は複数によって同定され得る。さらに、いくつかの実施形態では、細胞は、ある程度の分化度を示すマーカーによって同定され得る。このようなマーカーは、当業者に知られているであろう。例えば、いくつかの実施形態では、分化細胞のマーカーは、例えば、ＣＤ４３、ＣＤ４５（分化造血細胞）などの分化造血細胞に関連するものを含み得る。いくつかの実施形態では、分化細胞のマーカーは、例えば、ＣＤ５６（神経細胞接着分子としても知られている）、ＮＫ細胞受容体免疫グロブリンγＦｃ領域受容体ＩＩＩ（ＦｃγＲＩＩＩ、分化抗原群１６（ＣＤ１６）、ナチュラルキラーグループ２メンバーＡ（ＮＫＧ２Ａ）、ナチュラルキラーグループ２メンバーＤ（ＮＫＧ２Ｄ）；ＣＤ６

９、天然細胞傷害性受容体（例えば、ＮＣＲ１、ＮＣＲ２、ＮＣＲ３、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６及び／又はＣＤ１５８ｂ）、キラー免疫グロブリン様受容体（ＫＩＲ）及びＣＤ９４（キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーＤ、メンバー１（ＫＬＲＤ１）としても知られている）などのＮＫ細胞表現型に関連し得る。いくつかの実施形態では、マーカーは、Ｔ細胞マーカー（例えば、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８など）であり得る。

【０２９５】

使用方法

様々な疾患、障害及び／又は状態が、本開示によって提供される技術の使用を通じて治療され得る。例えば、いくつかの実施形態では、疾患、障害及び／又は病状は、本明細書に記載されているような改変細胞（例えば、編集ｉＮＫ細胞）を対象に導入することによって治療され得る。治療され得る疾患の例としては、例えば、脳、前立腺、乳房、肺、結腸、子宮、皮膚、肝臓、骨、膵臓、卵巣、精巣、膀胱、腎臓、頭部、頸部、胃、子宮頸部、直腸、喉頭又は食道の固形腫瘍などのがん；及び例えば急性及び慢性の白血病などの悪性血液疾患、例えばホジキン及び非ホジキンリンパ腫をはじめとするＢ細胞リンパ腫などのリンパ腫、多発性骨髄腫及び骨髄異形成症候群が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２９６】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の細胞のいずれかを含む組成物を対象に投与することにより、それを必要とする対象を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、治療薬又は組成物は、疾患、障害又は病状（例えば、傷害を含む）の発症前、発症中又は発症後に投与され得る。

【０２９７】

特定の実施形態では、対象は、細胞療法によって治療され得る疾患、障害又は病状を有する。いくつかの実施形態では、細胞療法を必要とする対象は、疾患、障害及び／又は病状を有する対象であり、それにより、細胞療法、例えば本明細書に記載の細胞を含む組成物などの療法が対象に投与され、それにより、細胞療法は、疾患、障害及び／又は病状に関連する少なくとも１つの症状を治療する。いくつかの実施形態では、細胞療法を必要とする対象としては、骨髄又は幹細胞移植の候補；化学療法又は照射療法を受けた対象；例えば、造血系の増殖性障害又はがんなどの増殖性障害又はがんを有するか又は発症するリスクのある対象；例えば、固形腫瘍などの腫瘍を有するか又は発症するリスクのある対象；及び／又はウイルス感染又はウイルス感染に関連する疾患を有するか又は発症するリスクがある対象が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２９８】

医薬組成物

いくつかの実施形態では、本開示は、例えば、本明細書に記載されている編集ｉＮＫ細胞などの本明細書に記載されている１つ又は複数の遺伝子改変細胞を含む、医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％又は９９％の、例えば遺伝子改変（例えば、編集）Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣなどの、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを含む、単離万能性幹細胞由来の造血系細胞を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約９５％～約１００％の、例えば遺伝子改変（例えば、編集）Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣなどの、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを含む、単離万能性幹細胞由来の造血系細胞を含む。

【０２９９】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、万能性幹細胞誘導造血系細胞の単離集団を含み、ここで、単離集団は、約０．１％、０．５％、１％、２％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％又は３０％未満の、例えば遺伝子改変（例えば、編集）Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣなどの、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫ

Ｔ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを有する。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来の造血系細胞単離集団は、約０．１％、０．５％、１％、２％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％又は３０％を超える、例えば遺伝子改変（例えば、編集）Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣなどの、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを有する。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来の造血系細胞単離集団は、約０．１％～約１％、約１％～約３％、約３％～約５％、約１０％～約１５％、約１５％～２０％、約２０％～２５％、約２５％～３０％、約３０％～３５％、約３５％～４０％、約４０％～４５％、約４５％～５０％、約６０％～７０％、約７０％～８０％、約８０％～９０％、約９０％～９５％又は約９５％～約１００％の、例えば遺伝子改変（例えば、編集）Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣなどの、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを有する。

【０３００】

いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来の造血系細胞単離集団は、約０．１％、約１％、約３％、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、約９８％、約９９％又は約１００％の、例えば遺伝子改変（例えば、編集）Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣなどの、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、ＣＤ３４＋ＨＥ細胞又はＨＳＣを含む。

【０３０１】

当業者は理解するであろうように、自系細胞及び同種異系細胞の両方が養子細胞療法に使用され得る。自系細胞療法は、他の細胞療法と比較して、一般に、低減された感染、低いＧＶＨＤの可能性、迅速な免疫再構成を有する。同種異系細胞治療は、他の細胞治療と比較して、一般に、免疫介在性の移植片対悪性腫瘍（ＧＶＭ）効果を有し、低い再発率を有する。細胞療法を必要とする対象の特定の病状に基づいて、当業者は、どの特定タイプの療法を投与するかを決定できるであろう。

【０３０２】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、対象にとって同種異系の万能性幹細胞由来の造血系細胞を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、対象にとって自系の万能性幹細胞由来の造血系細胞を含む。自系移植では、万能性幹細胞由来の造血系細胞の単離集団は、患者対象と完全に又は部分的にＨＬＡ適合であり得る。いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来の造血系細胞は、対象にとってＨＬＡ適合でない。

【０３０３】

いくつかの実施形態では、万能性幹細胞由来の造血系細胞は、投与前に生体外又は試験管内で増殖させることなく対象に投与され得る。特定の実施形態では、誘導造血系細胞の単離集団は、１つ又は複数の薬剤を使用して生体外で調節及び処理されて、改善された治療可能性を有する免疫細胞が得られる。いくつかの実施形態では、誘導造血系細胞の調節された集団は洗浄され治療剤が除去され得、改善された集団は、生体外で集団をさらに増殖させることなく対照に投与され得る。いくつかの実施形態では、誘導造血系細胞の単離集団は、１つ又は複数の作用物質を用いて単離集団を調節する前に増殖される。

【０３０４】

いくつかの実施形態では、誘導造血系細胞の単離集団は、（例えば、組換え法によって）遺伝子改変され、ＴＣＲ、ＣＡＲ又は他のタンパク質を発現し得る。組換えＴＣＲ又はＣＡＲを発現する遺伝子操作された誘導造血系細胞の場合、細胞の遺伝子改変前又は後を問わず、例えば米国特許第６，３５２，６９４号明細書；米国特許第６，５３４，０５５号明細書；米国特許第６，９０５，６８０号明細書；米国特許第６，６９２，９６４号明細書；米国特許第５，８５８，３５８号明細書；米国特許第６，８８７，４６６号明細書；米国特許第６，９０５，６８１号明細書；米国特許第７，１４４，５７５号明細書；米国特許第７，０６７，３１８号明細書；米国特許第７，１７２，８６９号明細書；米国特許第７，２３２，５６６号明細書；米国特許第７，１７５，８４３号明細書；米国特許第

５，８８３，２２３号明細書；米国特許第６，９０５，８７４号明細書；米国特許第６，７９７，５１４号明細書；米国特許第６，８６７，０４１号明細書；及び米国特許出願公開第２００６０１２１００５号明細書に記載されている方法を使用して、細胞を活性化及び増殖させ得る。

【０３０５】

がん

本明細書に記載の組成物を使用して、任意のがんが治療され得る。本開示の例示的な治療標的としては、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、眼、胃腸、歯茎、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌又は子宮からのがん細胞が挙げられる。さらに、がんは、具体的には、以下の非限定的な組織型のものであり得る：悪性新生物；がん腫；未分化がん腫；巨大及び紡錘細胞がん；小細胞がん；乳頭がん；扁上皮がん；リンパ上皮がん；基底細胞がん；悪質毛母腫；移行細胞がん；乳頭状移行細胞がん；腺がん；悪性ガストリノーマ；胆管がん；肝細胞がん；肝細胞がんと胆管がんの複合型；小柱腺がん；腺様嚢胞がん；がん腺腫性ポリープにおける腺がん；腺がん、家族性大腸腺腫症；固形がん；カルチノイド腫瘍、悪性；分岐管肺胞腺がん；乳頭状腺がん；色素嫌性がん；好酸性がん；好酸性腺がん；塩基好性がん；明細胞腺がん；顆粒細胞がん；濾胞状腺がん；乳頭状及び濾胞状腺がん；非被包性硬化性がん；副腎皮質がん；類内膜がん；皮膚付属器がん；アポクリン腺がん；皮脂腺がん；耳垢腺がん；粘液性類表皮がん；嚢胞腺がん；乳頭状嚢胞腺がん；乳頭状漿液性嚢胞腺がん；粘液性嚢胞腺がん；粘液性腺がん；印環細胞がん；浸潤性導管がん；髄様がん；小葉がん；炎症性がん；乳房パジェット病；腺房細胞がん；腺扁平上皮がん；扁平上皮化生を伴う腺がん；悪性胸腺腫；悪性卵巣間質腫瘍；悪性莢膜腫；悪性顆粒膜細胞腫瘍；悪性アンドロブラストーマ；セルトリ細胞がん；悪性ライディッヒ細胞腫瘍；悪性脂質細胞腫瘍；悪性傍神経節腫；悪性乳房外傍神経節腫；褐色細胞腫；血管球血管肉腫；悪性黒色腫；無色素性黒色腫；表在性拡散性黒色腫；巨大色素性母斑中の悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；悪性青色母斑；肉腫；線維肉腫；悪性線維性組織球腫；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；肺胞横紋筋肉腫；間質肉腫；悪性混合腫瘍；ミュラー管混合腫瘍；腎芽細胞腫；肝芽細胞腫；がん肉腫；悪性間葉細胞腫；悪性ブレンナー腫瘍；悪性葉状腫瘍；滑膜肉腫；悪性中皮腫；未分化胚細胞腫；胚性がん；悪性奇形腫；悪性卵巣甲状腺腫；絨毛がん；悪性中腎腫；血管肉腫；悪性血管内皮腫；カポジ肉腫；悪性血管周皮腫；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；悪性軟骨芽細胞腫；間葉系軟骨肉腫；骨巨細胞腫；ユーイング肉腫；悪性歯原性腫瘍；エナメル芽細胞歯牙肉腫；悪性エナメル上皮腫；エナメル芽細胞線維肉腫；悪性松果体腫；脊索腫；悪性神経膠腫；上衣腫；星状細胞腫；原形質性星状細胞腫；線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；神経膠芽腫；乏突起膠腫；乏突起膠芽細胞腫；原始神経外胚葉性；小脳性肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽腫；網膜芽細胞腫；嗅神経腫瘍；悪性髄膜腫；神経線維肉腫；悪性神経鞘腫；悪性顆粒細胞腫；悪性リンパ腫；Ｂ細胞リンパ腫；ホジキン病；ホジキンリンパ腫；側肉芽腫；悪性リンパ腫、小リンパ球性；びまん性大細胞悪性リンパ腫；濾胞性悪性リンパ腫；菌状息肉腫；他の特定の非ホジキンリンパ腫；悪性組織球症；多発性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞白血病；骨髄性白血病；好塩基性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞白血病；巨核芽球性白血病；骨髄肉腫；及び有毛細胞白血病。

【０３０６】

いくつかの実施形態では、がんは乳がんである。いくつかの実施形態では、がんは結腸がんである。いくつかの実施形態では、がんは胃がんである。いくつかの実施形態では、がんはＲＣＣである。別の実施形態では、がんは非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）である。

【０３０７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるｉＮＫ細胞（例えば、遺伝子改変ｉＮＫ細胞、例えば編集ｉＮＫ細胞）を単独で又は１つ又は複数の追加的ながん治療法と組み合わせて用いて治療され得る固形がん適応症としては、膀胱がん、肝細胞がん、前立腺が

ん、卵巣／子宮がん、膵臓がん、中皮腫、黒色腫、神経膠芽腫、子宮頸及びＨＰＶ＋頭頸部がんなどのＨＰＶ関連及び／又はＨＰＶ陽性がん、口腔がん、咽頭がん、甲状腺がん、胆嚢がん及び軟部組織肉腫が挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるｉＮＫ細胞（例えば、遺伝子改変ｉＮＫ細胞、例えば編集ｉＮＫ細胞）を単独で又は１つ又は複数の追加的ながん治療法と組み合わせて用いて治療され得る血液がん適応症としては、ＡＬＬ、ＣＬＬ、ＮＨＬ、ＤＬＢＣＬ、ＡＭＬ、ＣＭＬ及び多発性骨髄腫（ＭＭ）が挙げられる。

【０３０８】

肺の細胞増殖性及び／又は分化性障害としては、腫瘍随伴症候群をはじめとする気管支原性肺がんなどの腫瘍、細気管支肺胞がん、気管支カルチノイドなどの神経内分泌腫瘍、他の腫瘍、転移性腫瘍及び孤立性線維性腫瘍（胸膜線維腫）をはじめとする胸膜腫瘍並びに悪性中皮腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３０９】

乳房の細胞増殖性及び／又は分化性障害の例としては、例えば、上皮過形成、硬化性腺症及び小管乳頭腫をはじめとする増殖性乳房疾患；腫瘍、例えば線維腺腫、葉状腫瘍及び肉腫などの間質性腫瘍並びに大管乳頭腫などの上皮性腫瘍；腺管上皮内がん（パジェット病を含む）及び非浸潤性小葉がんをはじめとする上皮内（非浸潤性）がんを含む乳房のがん；及び浸潤性乳管がん、侵襲性小葉がん、髄様がん、コロイド（粘液性）がん、管状がん及び侵襲性乳頭がんをはじめとするが、これらに限定されない侵襲性（浸潤性）がん；及び他の悪性新生物が挙げられるが、これらに限定されない。男性の乳房の障害としては、女性化乳房及びがん腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３１０】

結腸が関与する細胞の増殖性及び／又は分化性障害の例としては、非腫瘍性ポリープ、腺腫、家族性症候群、結腸直腸発がん、結腸直腸がん及びカルチノイド腫瘍などの結腸の腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３１１】

上記のものに加えて、がん又は腫瘍性病状の例としては、線維肉腫、筋肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、胃がん、食道がん、直腸がん、膵臓がん、卵巣がん、前立腺がん、子宮がん、頭頸部がん、皮膚がん、脳がん、扁上皮がん、皮脂腺がん、乳頭がん、乳頭腺がん、嚢胞腺がん、髄様がん、気管支原性肺がん、腎細胞がん、肝細胞腫、胆管がん、絨毛がん、セミノーマ、胚性がん、ウイルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、膀胱がん腫、上皮性がん、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫、網膜芽細胞腫、白血病、リンパ腫又はカポジ肉腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３１２】

例示的な有用な追加的ながん治療法としては、チオテパ及びＣＹＴＯＸＡＮ（登録商標）シクロホスファミドなどのアルキル化剤をはじめとする化学療法剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドパ、カルボコン、メトレドパ及びウレドパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド及びトリメチルオロメラミンをはじめとするエチレンイミン及びメチルアメラミン；アセトゲニン（特にブラタシン及びブラタシノン）；δ－９－テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、ＭＡＲＩＮＯＬ（登録商標））；β－ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成類似体トポテカン（ＨＹＣＡＭＴＩＮ（登録商標））、ＣＰＴ－１１（イリノテカン、ＣＡＭＰＴＯＳＡＲ（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン及び９－アミノカンプトテシンをはじめとする）；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ－１０６５（そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成類似体をはじめとする）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特に

クリプトフィシン１及びクリプトフィシン８）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、ＫＷ－２１８９及びＣＢ１－ＴＭ１をはじめとする）；エレウテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンビキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン及びラニムスチンなどのニトロソ尿素；エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシンγ１Ｉ及びカリケアマイシンωｌ１（例えば、Ａｇｎｅｗ，Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔｌ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．，３３：１８３－１８６（１９９４）を参照されたい）などの抗生物質；ダイネミシンＡをはじめとするダイネミシン；エスペラミシン；並びにネオカルジノスタチン発色団と関連する色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ドキソルビシン（アドリアマイシン（登録商標）、モルホリノ－ドキソルビシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシン、ドキソルビシンＨＣｌリポソーム注射（ドキシル（登録商標））及びデオキシドキソルビシンをはじめとする）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンなどのマイトマイシンＣ、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキサート、ゲムシタビン（ＧＥＭＺＡＲ（登録商標））、テガフール（ＵＦＴＯＲＡＬ（登録商標））、カペシタビン（ＸＥＬＯＤＡ（登録商標））、エポチロン及び５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）などの代謝拮抗薬；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗アドレナリン薬；フォリン酸などの葉酸補給剤；アセグラトン；アルドホスファミド配糖体；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトレキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォルミチン；酢酸エリプチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；メイタンシン及びアンサミトシンなどのメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラミン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ（登録商標）多糖類複合体（ＪＨＳ　Ｎａｔｕｒａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ｅｕｇｅｎｅ，Ｏｒｅｇ．）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；２，２’，２”－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にＴ－２トキシン、ベラクリンＡ、ロリジンＡ及びアングイジン）；ウレタン；ビンデシン（ＥＬＤＩＳＩＮＥ（登録商標）、ＦＩＬＤＥＳＩＮ（登録商標））；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ａｒａ－Ｃ」）；チオテパ；例えば、パクリタキセル（ＴＡＸＯＬ（登録商標））、パクリタキセル（ＡＢＲＡＸＡＮＥＴ（商標））のアルブミン操作ナノ粒子製剤及びドセタキセルタキソテール（登録商標））などのタキソイド；クロラムブシル；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン及びカルボプラチンなどの白金類似体；ビンブラスチン（ベルバン（登録商標））；白金；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン（ＯＮＣＯＶＩ

Ｎ（登録商標））；オキサリプラチン；ロイコボリン；ビノレルビン（ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ（登録商標））；ノバントロン；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；シクロスポリン、シロリムス、ラパマイシン、ラパログ、イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）；レチノイン酸などのレチノイド；シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニゾロンの併用療法の略語であるＣＨＯＰと、オキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮ（商標））と、５－ＦＵ、ロイコボリンとの併用療法の略語であるＦＯＬＦＯＸ；例えば、タモキシフェン（ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）タモキシフェンをはじめとする）、ラロキシフェン（ＥＶＩＳＴＡ（登録商標））、ドロロキシフェン、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン及びトレミフェン（ＦＡＲＥＳＴＯＮ（登録商標））をはじめとする、抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節因子（ＳＥＲＭ）；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体ダウンレギュレーター（ＥＲＤ）；フルベストラント（フェソロデックス（登録商標））などのエストロゲン受容体拮抗薬；例えば、酢酸ロイプロリド（ＬＵＰＲＯＮ（登録商標）及びＥＬＩＧＡＲＤ（登録商標））、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプトレリンなどの黄体形成ホルモン放出ホルモン（ＬＨＲＨ）作動薬などの卵巣を抑制又は停止させるように機能する薬剤；フルタミド、ニルタミド及びビカルタミドなどの他の抗アンドロゲン；及び例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール（ＭＥＧＡＳＥ（登録商標））、エキセメスタン（ＡＲＯＭＡＳＩＮ（登録商標））、フォルメスタニー、ファドロゾール、ボロゾール（ＲＩＶＩＳＯＲ（登録商標））、レトロゾール（ＦＥＭＡＲＡ（登録商標））及びアナストロゾール（ＡＲＩＭＩＤＥＸ（登録商標））などの、副腎におけるエストロゲン産生を制御する、酵素アロマターゼを抑制する、アロマターゼ阻害剤；クロドロネート（例えば、ＢＯＮＥＦＯＳ（登録商標）又はＯＳＴＡＣ（登録商標））、エチドロネート（ＤＩＤＲＯＣＡＬ（登録商標））、ＮＥ－５８０９５、ゾレドロン酸／ゾレドロネート（ＺＯＭＥＴＡ（登録商標））、アレンドロネート（ＦＯＳＡＭＡＸ（登録商標））、パミドロネート（ＡＲＥＤＩＡ（登録商標））、チルドロネート（ＳＫＥＬＩＤ（登録商標））又はリセドロネート（ＡＣＴＯＮＥＬ（登録商標））などのビスホスホネート；トロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；例えば、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許第６，３４４，３２１号明細書に記載されている、アプタマー；抗ＨＧＦモノクローナル抗体（例えば、ＡｖｅｏからのＡＶ２９９、ＡｍｇｅｎからのＡＭＧ１０２）；短縮型ｍＴＯＲ変異型（例えば、ＣｏｍｐｕｇｅｎからのＣＧＥＮ２４１）；ｍＴＯＲ誘導経路を遮断するプロテインキナーゼ阻害剤（例えば、ＡｒｑｕｌｅからのＡＲＱ１９７、ＥｘｅｌｅｘｉｓからのＸＬ８８０、ＳＧＸ　ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓからのＳＧＸ５２３、ＳｕｐｅｒｇｅｎからのＭＰ４７０、ＰｆｉｚｅｒからのＰＦ２３４１０６６）；ＴＨＥＲＡＴＯＰＥ（登録商標）ワクチン及び例えばＡＬＬＯＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチン、ＬＥＵＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチン及びＶＡＸＩＤ（登録商標）ワクチンなどの遺伝子療法ワクチンなどのワクチン；トポイソメラーゼ１阻害剤（例えば、ＬＵＲＴＯＴＥＣＡＮ（登録商標））；ｒｍＲＨ（例えば、ＡＢＡＲＥＬＩＸ（登録商標））；ラパチニブジトシレート（ＧＷ５７２０１６としても知られているＥｒｂＢ－２及びＥＧＦＲ二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤）；セレコキシブ（セレブレックス（登録商標）；４－（５－（４－メチルフェニル）－３－（トリフルオロメチル）－１Ｈ－ピラゾール－１－イル）ベンゼンスルホンアミドなどのＣＯＸ－２阻害剤；及び上記のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸又は誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３１３】

本開示の組成物及び方法と共に使用するのに適した、がんの治療に有効な他の化合物は、当技術分野で公知であり、本明細書に記載されており、追加的ながん治療法は、例えば、関連する部分に参照により本明細書に援用される、“Ｐｈｙｓｉｃｉａｎｓ’　Ｄｅｓｋ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，６２ｎｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ．Ｏｒａｄｅｌｌ，Ｎ．Ｊ．：Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｅｃｏｎｏｍｉｃｓ　Ｃｏ．，２００８”；Ｇｏｏｄｍａｎ＆Ｇｉｌｍａｎ’ｓ“

Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｅｌｅｖｅｎｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ．ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，２００５”；“Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２０ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ．Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．：Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ，２０００．”；及び“Ｔｈｅ Ｍｅｒｃｋ Ｉｎｄｅｘ，Ｆｏｕｒｔｅｅｎｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ．Ｗｈｉｔｅｈｏｕｓｅ Ｓｔａｔｉｏｎ，Ｎ．Ｊ．：Ｍｅｒｃｋ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，２００６”に記載されている。

【０３１４】

本明細書全体を通じて、文脈上別段の必要がない限り、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」及び「含んでいる」という言葉は、記載されたステップ若しくは要素又はステップ若しくは要素のグループを含むことを暗示するが、いかなる他のステップ若しくは要素又はステップ若しくは要素のグループの除外も暗示しないものと理解される。「からなる」は、「からなる」という語句に続くものを含み、それに限定されることを意味する。したがって、「からなる」という語句は、列挙された要素が必要又は必須であり、他の要素が存在しなくてもよいことを示す。「から本質的になる」は、語句の後に列挙された要素を含むことを意味し、列挙された要素についての開示で指定された活性又は作用を妨害したり、それに寄与したりしない他の要素に限定される。したがって、「から本質的になる」という語句は、列挙された要素が要求され又は必須であるが、他のいかなる要素も任意選択的でなく、列挙された要素の活性又は作用に影響を与えるかどうかに応じて、存在しても存在しなくてもよいことを示す。

【０３１５】

上記の詳細な説明に照らして、実施形態に対するこれら及び他の変更形態がなされ得る。一般に、以下の特許請求の範囲において、使用されている用語は、本明細書及び特許請求の範囲に開示されている特定の実施形態に特許請求の範囲を限定すると解釈されるべきではなく、このような特許請求の範囲が権利を有する完全な範囲の均等物と共に、全ての可能な実施形態を含むものと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示によって限定されない。

【０３１６】

上記の様々な実施形態を組み合わせて、さらなる実施形態が提供され得る。本明細書で言及され、出願データシートに列挙される全ての米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願及び非特許刊行物は、それらの全体が参照により本明細書に援用される。例えば、本明細書で提供されるＮＣＢＩヌクレオチド又はタンパク質データベース入力項目などのデータベース入力項目の内容は、それらの全体が本明細書に援用される。データベース入力項目が時間経過と共に変更される可能性がある場合、本出願の出願日現在の内容が参照により本明細書に援用される。実施形態の態様は、必要に応じて、様々な特許、出願及び刊行物の概念を用いてさらに別の実施形態を提供するように修正され得る。

【０３１７】

本開示は、以下の実施例によってさらに説明される。実施例は、説明のみを目的として提供される。それらは、決して本開示の範囲又は内容を限定すると解釈されない。

【実施例】

【０３１８】

実施例１：Ｃａｓ１２ａを使用した編集ｉＰＳＣの作製と万能性に対するアクチビンＡの影響の試験

万能性幹細胞からナチュラルキラー細胞を作製するために、代表的な人工万能性幹細胞（ｉＰＳＣ）株を作製し、「ＰＣＳ－２０１」と命名した。この株は、ＡＴＣＣから購入した成人男性ヒト初代皮膚線維芽細胞（ＡＴＣＣ（登録商標）ＰＣＳ－２０１－０１２）を、市販の非修飾ＲＮＡ再プログラム化キット（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ／Ｒｅｐｒｏｃｅｌｌ、ＵＳＡ）を使用して再プログラム化することによって作製した。再プログラム化キット

は、非修飾再プログラム化ｍＲＮＡ（ＯＣＴ４、ＳＯＸ２、ＫＬＦ４、ｃＭＹＣ、ＮＡＮＯＧ及びＬＩＮ２８）と共に、免疫回避ｍＲＮＡ（Ｅ３、Ｋ３及びＢ１８Ｒ）と３０２／３６７クラスターからの二本鎖マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）を含有する。線維芽細胞を線維芽細胞増殖培地（１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭ／Ｆ１２）に播種した。翌日、培地をＮｕｔｒｉｓｔｅｍ培地に切り替え、４日間（１日目から４日目）にわたり毎日一晩形質移入を実施した。一次ｉＰＳＣコロニーは７日目に出現し、１０～１４日目に採取した。採取コロニーは、マスター細胞バンクを確立するのに十分な数の細胞を達成するためにクローン的に拡大した。このプロセスから選択され、その後の実験に使用された親株は、幹細胞性マーカー発現、正常な核型及び万能性の確認をはじめとする、標準的な品質管理に合格した。

【０３１９】

編集ｉＰＳＣ細胞を作製するために、関心のある標的遺伝子を切断するように設計されたＣａｓ１２ａ　ＲＮＰをＰＣＳ－２０１（ＰＣＳ）細胞に電気穿孔した。簡潔に述べると、ＲＯＣＫ阻害剤（Ｙ２７６３２）で形質移入する２４時間前に細胞を処理した。形質移入の当日、アキュターゼを使用して単一細胞溶液を作製し、５０万個のＰＣＳ　ｉＰＳ細胞を適切な電気穿孔緩衝液とＣａｓ１２ａ　ＲＮＰに、最終濃度２μＭで再懸濁した。２種のＲＮＰを同時に添加した場合、総ＲＮＰ濃度は４μＭ（２＋２）であった。この溶液をＬｏｎｚａ　４Ｄ電気穿孔装置を使用して電気穿孔した。電気穿孔に続いて、ＣｌｏｎｅＲ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を含有するｍＴＥＳＲ培地の６ウェルプレートに、細胞をプレーティングした。培地を毎日交換しながら細胞を３～５日間増殖させ、電気穿孔の４８時間後までにＣｌｏｎｅＲを培地から除去した。単一コロニーを採取するために、増殖した細胞を単一細胞懸濁液に再懸濁した後、１０ｃｍプレートに低密度でプレーティングした。プレート上のコロニーのサイズに応じて、プレーティング後３～５日間の単一細胞プレーティング中に、ＲＯＣＫ阻害剤を使用して細胞をサポートした。７～１０日後、許容可能な形態の十分なサイズのコロニーを採取し、２４ウェルプレートにプレーティングした。採取したコロニーを十分な数に増殖させ、その後の分析及び細胞株の凍結保存のためにゲノムＤＮＡを採取できるようにした。編集をＮＧＳによって確認し、選択されたクローンをさらに増殖させて保存した。最終的に、選択されたクローンのサブセット上で核型分析、幹細胞フロー及び分化アッセイを実施した。

【０３２０】

関心のある２つの標的遺伝子はＣＩＳＨ及びＴＧＦβＲＩＩであり、いずれもナチュラルキラー細胞の機能を増強するという仮説が立てられていた。ＴＧＦβ：ＴＧＦβＲＩＩ経路は万能性の維持に関与すると考えられているため、ｉＰＳＣにおけるＴＧＦβＲＩＩの機能的欠失は分化をもたらし、ＴＧＦβＲＩＩ編集ｉＰＳＣの作製を妨げるという仮説が立てられた。ＳＭＡＤ２／３及び他の細胞内分子の調節におけるアクチビン受容体シグナル伝達とＴＧＦβＲＩＩシグナル伝達の収束により、アクチビンＡが市販の万能性幹細胞培地中のＴＧＦβを置き換えて、編集株が作製され得るという仮説が立てられた。この仮説を検証するために、アクチビンＡを用いて増殖させた未編集及びＴＧＦβＲＩＩ編集ｉＰＳＣの万能性を評価した。いくつかの異なる培地が用いられた：ＴＧＦβを欠く「Ｅ６」（Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　６（商標）培地、＃Ａ１５１６４０１、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）；１００ｎｇ／ｍｌのｂＦＧＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、＃１００－１８Ｂ）を添加したＥ６である「Ｅ７」；「Ｅ８」（Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　８（商標）培地、＃Ａ１５１７００１、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）；及び様々な濃度のアクチビンＡ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ　＃１２０－１４Ｐ）を添加したＥ６である「Ｅ７＋ＡｃｔＡ」。典型的には、Ｅ６及びＥ７培地は、培養の複数の継代にわたってＰＳＣの幹細胞性及び万能性を維持するには、典型的には不十分である。

【０３２１】

アクチビンＡが外因性ＴＧＦβの不在下でＰＣＳ　ｉＰＳＣを維持できるかどうかを判定するために、未編集ＰＣＳ　ｉＰＳＣをＬａｍｉｎＳｔｅｍ（商標）５２１（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ）でコーティングした６ウェルプレートにプレーテ

ィングし、（１ｎｇ／ｍｌ及び４ｎｇ／ｍｌの２つの異なる濃度のアクチビンＡを用いて）Ｅ６、Ｅ７、Ｅ８又はＥ７＋ＡｃｔＡ中で培養した。２継代後、形態と幹細胞性マーカーの発現について細胞を評価した。形態は、倒立顕微鏡上で標準的な位相差設定を用いて評価した。ｉＰＳＣのコロニーに典型的な、境界が明確で未分化な細胞を有するコロニーは、幹細胞とみなされた。形態学的観察を確認するために、標準的なｉＰＳ細胞幹細胞性マーカーの発現を、細胞内フローサイトメトリーを使用して測定した。簡潔に述べると、細胞を解離させて細胞外マーカーで染色し、次にＦｏｘｐ３／転写因子染色緩衝液セット（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標））からの試薬と標準プロトコルを用いて、一晩固定し透過処理した。細胞をフローサイトメトリー分析のために、抗－ヒトＴＲＡ－１－６０－Ｒ＿ＡＦ（登録商標）４８８（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）；クローンＴＲＡ－１－６０－Ｒ）、抗ヒトＮａｎｏｇ＿ＡＦ（登録商標）６４７（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（商標）；クローンＮ３１－３５５）及び抗Ｏｃｔ４（Ｏｃｔ３）＿ＰＥ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）；クローン３Ａ２Ａ２０）を用いて染色した。細胞をＮｏｖｏＣｙｔｅ　Ｑｕａｎｔｅｏｎフローサイトメーター（Ａｇｉｌｅｎｔ）上で記録し、ＦｌｏｗＪｏ（ＦｌｏｗＪｏ，ＬＬＣ）を用いて解析した。図１に示すように、１ｎｇ／ｍＬと４ｎｇ／ｍｌの両方のアクチビンＡは、Ｅ８中で増殖された細胞と同等の幹細胞マーカー発現で、万能性を維持するのに十分であった。予想通り、（ＴＧＦβを欠く）Ｅ６及びＥ７中で増殖された細胞は、Ｅ８と同程度に幹細胞性遺伝子発現を維持せず、ＴＧＦβ又はアクチビンＡの不在下でｉＰＳＣ幹細胞性が失われたことが示された。これらの結果は、アクチビンＡが、ＴＧＦβシグナル伝達の不在下でｉＰＳＣ幹細胞性を補い得ることを示唆する。

【０３２２】

アクチビンＡがＴＧＦβの不在下でｉＰＳＣ幹細胞性をサポートし得るという実証を踏まえて、ＴＧＦβＲＩＩノックアウト（「ＫＯ」）ｉＰＳＣ、ＣＩＳＨ　ＫＯ　ｉＰＳＣ及びＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト（「ＤＫＯ」）ｉＰＳＣ株を作製した。具体的には、３つのアミノ酸置換（Ｍ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ、Ｈ８００Ａ（配列番号１１４８））がある誘導Ｃａｓ１２ａを有するＲＮＰと、ＣＩＳＨ又はＴＧＦβＲＩＩに特異的なｇＲＮＡとを使用して、ｉＰＳ細胞を編集した。ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＰＳＣを作製するために、ＣＩＳＨを標的化するＲＮＰとＴＧＦβＲＩＩを標的化するＲＮＰを用いて、ｉＰＳＣを同時に処理した。表１０の特定のガイドＲＮＡ配列を、ＣＩＳＨ及びＴＧＦβＲＩＩの編集のために使用した。いずれのガイドも、ＲＮＡからなる標的化ドメイン、標的化ドメインの５’に位置する配列ＵＡＡＵＵＵＣＵＡＣＵＣＵＵＧＵＡＧＡＵ（配列番号１１５３）のＡｓＣｐｆ１スキャフォールド及びスキャフォールド配列の５’末端にある配列ＡＴＧＴＧＴＴＴＴＴＧＴＣＡＡＡＡＧＡＣＣＴＴＴＴ（配列番号１１５４）の２５量体のＤＮＡ伸長を用いて作製した。

【０３２３】

【表５５】

表 10. ガイド RNA 配列

標的	gRNA 標的化ドメイン配列	完全長 gRNA 配列
CISH 7050	GGUGUACAGCAGUGGCUGGU (配列番号 1155)	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrGrGrUrGrUrArCrArGrCrArGrUrGrGrCrUrGrGrU (配列番号 1156)
TGFβRII 24026	UGAUGUGAGAUUUUCCACCU (配列番号 1157)	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrGrArUrGrUrGrArGrArUrUrUrUrCrCrArCrCrU (配列番号 1158)

【０３２４】

編集クローンは、ＴＧＦβＲＩＩ　ＲＮＰで処理した細胞に若干の修正を加えて、上記のように作製した。簡潔に述べると、編集クローンの作製をサポートするために、１０ｎｇ／ｍｌのアクチビンＡを添加したｍＴＥＳＲの６ウェル段階での電気穿孔後、ＴＧＦβＲＩＩ－編集ＰＣＳ　ｉＰＳＣ及びＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ編集ＰＣＳ　ｉＰＳＣをプレーティングした。細胞は、１０ｎｇ／ｍｌのアクチビンＡと共に、細胞コロニーの採取と初期増殖段階を通じて培養した。正しい一重ＫＯ（ＣＩＳＨ　ＫＯ又はＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯ）又は二重ＫＯ（ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ）を有すると評価されたコロニーを採取し、増殖させた（クローン選択）。

【０３２５】

ＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯ及びＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ　ＤＫＯ　ｉＰＳＣの培養に最適なアクチビンＡの濃度を判定するために、図２に示すようにわずかに拡大した濃度曲線を試験した。以前に実施した評価と同様に、ｉＰＳＣは、１ｎｇ／ｍｌ、２ｎｇ／ｍｌ、４ｎｇ／ｍｌ及び１０ｎｇ／ｍｌのアクチビンＡ濃度でマトリゲル処理した、６ウェルプレート内で培養した。図２に示すように、４ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを添加したＥ７培地中で１９日間（５継代以上）培養したＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯ又はＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ細胞は、野生型の形態を維持していた。図３は、ＧＦβＲＩＩ　ＫＯ　ＰＣＳ－２０１　ｈｉＰＳＣクローン９の形態を示す。

【０３２６】

図４Ａに示すように、ＣＩＳＨとＴＧＦβＲＩＩ　ＲＮＰを用いて同時に処理されたｉＰＳＣの初期編集効率は高く（クローン選択前）、ＣＩＳＨ対立遺伝子の９５％が編集され、ＴＧＦβＲＩＩ対立遺伝子の７８％が編集された。未編集のｉＰＳＣ対照では、いずれの遺伝子座にもインデルは見られなかった。ＣＩＳＨ又はＴＧＦβＲＩＩ　ＲＮＰで個別に処理されたｉＰＳＣは、クローン選択前に９３％及び８２％の編集率を示した（図４Ａに描写される）。引き続いて、ＫＯ細胞株（ＣＩＳＨ　ＫＯ　ｉＰＳＣ、ＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯ　ｉＰＳＣ及びＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＰＳＣ）について、補足的なアクチビンＡの存在下で培養した後、万能性マーカーＯｃｔ４、ＳＳＥＡ４、Ｎａｎｏｇ及びＴｒａ－１－６０の存在について評価した。図４Ｂ及び５に示すように、アクチビンＡ中でＫＯ細胞株を培養すると、これらの万能性マーカーの発現が維持された。

【０３２７】

次にアクチビンＡ中で培養されたＫＯ　ｉＰＳＣ系統を分化能力について、図６に概略的に示すようにＳＴＥＭｄｉｆｆ（商標）Ｔｒｉｌｉｎｅａｇｅ分化キットアッセイ（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ，Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，ＢＣ，ＣＡ）を使用して評価した。図７Ａに示すように、一重ＫＯ（ＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯ　ｉＰＳ

ＣＩＳＨ　ＫＯ　ｉＰＳＣ）及びＤＫＯ（ＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ　ＤＫＯ　ｉＰＳＣ）細胞株を、アクチビンＡ添加培地中で培養すると、外胚葉（ＯＴＸ２）、中胚葉（短尾）及び内胚葉（ＧＡＴＡ４）マーカーの発現によって示されるように、３つの胚葉全ての初期前駆細胞に分化する能力が維持された（図７Ａ）。未編集ＰＣＳ対照細胞もこれらの各マーカーを発現できた。

【０３２８】

次に、編集ｉＰＳＣを核型分析し、Ｃａｓ１２ａ編集が転座などの大きい遺伝的異常を引き起こしたかどうかを判定した。図７Ｂに示すように、細胞は正常な核型を有し、切断部位間の転座はなかった。

【０３２９】

上記の結果をさらに裏付けるために、未編集親ＰＳＣ株、編集ＧＦβＲＩＩ　ＫＯ　ｉＰＳＣクローン（Ｃ７）及びＲＵＣＤＲと称される追加的な代表的な（未編集）細胞株（ＲＵＣＤＲ　Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ　ｇｒｏｕｐ，Ｐｉｓｃａｗａｙ　ＮＪ）上で拡大アクチビンＡ濃度曲線を実施した。最初に、１×ＬａｍｉｎＳｔｅｍ（商標）５２１（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ）で被覆された１２ウェルプレートに、ｉＰＳＣを１ウェルあたり１ｅ５細胞で播種した。次にウェルが７５％を超える培養密度を達成するまで、１×ＰＢＳ分離中の０．５ｍＭのＥＤＴＡとＹ－２７６３２（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ）とを使用して、細胞を約４０～５０日にわたり１０回継代した。対照のために細胞をＥｓｓｅｎｔｉａｌ　６（商標）培地（Ｇｉｂｃｏ）、ＴｅＳＲ（商標）－Ｅ７（商標）及びＴｅＳＲ（商標）－Ｅ８（商標）（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中で培養し、４対数濃度用量（０．００１～１０ｎｇ／ｍＬ）にわたる大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）由来組換えヒト／マウス／ラットアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）を添加したＴｅＳＲ（商標）－Ｅ７（商標）を使用して、滴定した。５回の継代及び１０回の継代後、細胞を解離させ、Ｆｏｘｐ３／転写因子染色緩衝液セット（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（商標））からの試薬と標準プロトコルを用いて、一晩固定し透過処理した。細胞をフローサイトメトリー分析のために、抗ヒトＴＲＡ－１－６０－Ｒ＿ＡＦ（登録商標）４８８（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）；クローンＴＲＡ－１－６０－Ｒ）、抗Ｓｏｘ２＿ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ（商標）５．５（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（商標）；クローンＯ３０－６７８）、抗ヒトＮａｎｏｇ＿ＡＦ（登録商標）６４７（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（商標）；クローンＮ３１－３５５）、抗Ｏｃｔ４（Ｏｃｔ３）＿ＰＥ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）；クローン３Ａ２Ａ２０）及び抗ヒトＳＳＥＡ－４＿ＰＥ／Ｄａｚｚｌｅ（商標）５９４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ（登録商標）；クローンＭＣ－８１３－７０）を用いて染色した。細胞をＮｏｖｏＣｙｔｅ　Ｑｕａｎｔｅｏｎフローサイトメーター（Ａｇｉｌｅｎｔ）上で記録し、ＦｌｏｗＪｏ（ＦｌｏｗＪｏ，ＬＬＣ）を用いて解析した。図７Ｃは、試験したｉＰＳＣ株の滴定曲線を示す。各株の維持に必要なアクチビンＡの最小濃度は、わずかに変動し、ＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯ　ｉＰＳＣは親対照と比較してより高いベースライン量のアクチビンＡを必要とした（０．５ｎｇ／ｍｌ対０．１ｎｇ／ｍｌ）。３つの細胞株全てにおいて、４ｎｇ／ｍｌは、長期の培養期間にわたって幹細胞マーカーの発現を維持するために必要なアクチビンＡの最小量を十分に超えていた。図７Ｄは、基礎培地のみ（アクチビンＡなし）を用いた細胞培養における幹細胞性マーカーの発現を示す。予想通り、ＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯ　ｉＰＳＣは、発現を維持しなかったが、２つの未編集株は、Ｅ８における幹細胞性マーカーの発現を維持できた。

【０３３０】

実施例２：編集ＣＩＳＨ　ＫＯ、ＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯ及びＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＰＳＣから機能増強を示すｉＮＫ細胞への分化

図８Ａは、強化されたＣＤ５６＋ｉＮＫ細胞を作製するためのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａ編集ｉＰＳＣプラットフォームを開発するための、例示的なワークフローの概略図を描写する。図８Ａに示すように、電気穿孔を使用した細胞へのＲＮＰの送達を介して、ＣＩＳＨ及びＴＧＦβＲＩＩ遺伝子をｉＰＳＣ中で標的化し、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ

ＤＫＯ ｉＰＳＣを作製する。次に、ＣＩＳＨ遺伝子とＴＧＦβＲＩＩ遺伝子の両方に所望の編集を有するｉＰＳＣを選択して増殖させ、マスターｉＰＳＣバンクを作成し得る。次に、ｉＰＳＣマスターバンクからの編集細胞を、ＣＤ５６＋ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ ＤＫＯ ｉＮＫ細胞に分化させ得る。

【０３３１】

図８Ｂ及び８Ｃは、ｉＰＳＣをｉＮＫ細胞に分化させるプロセスの２つの例示的な概略図を示す。図８Ｂ及び８Ｃに示すように、編集細胞（又は未編集対照細胞）は、２段階のプロセスを使用して区別した。最初に、「造血分化期」では、ＳＣＦ（４０ｎｇ／ｍＬ）、ＢＭＰ４（２０ｎｇ／ｍＬ）及びＶＥＧＦ（２０ｎｇ／ｍＬ）を添加したＳｔｅｍＤｉｆｆ（商標）ＡＰＥＬ２（商標）培地（ＳｔｅｍＣｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中で（編集及び未編集）ｈｉＰＳＣを０日目から１０日目まで培養し、スピン胚様体（ＳＥＢ）を産生させた。図８Ｂに示すように、次にＳＥＢをＮＫ細胞分化相において、ＩＬ－３（５ｎｇ／ｍＬ、培養の最初の１週間のみ存在）、ＩＬ－７（２０ｎｇ／ｍＬ）、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍＬ）、ＳＣＦ（２０ｎｇ／ｍＬ）及びＦｌｔ３Ｌ（１０ｎｇ／ｍＬ）を含むＳｔｅｍＤｉｆｆ（商標）ＡＰＥＬ２（商標）培地中で１１日目から３９日目まで培養した。ＣＩＳＨ ＫＯ ｉＰＳＣ、ＴＧＦβＲＩＩ ＫＯ ｉＰＳＣ、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ ＤＫＯ ｉＰＳＣ及び未編集野生型ｉＰＳＣ株（ＰＣＳ）は、図８Ｂの概略図に従ってｉＮＫに分化させ、次に特性決定してそれらがＮＫ細胞と一致する表現型を示すかどうかを評価した（図９、１０及び１１Ａを参照されたい）。図１１Ｂ、１１Ｃ、１２Ｂ、１２Ｃ及び１３に記載されているＣＩＳＨ ＫＯ ｉＰＳＣ、ＴＧＦβＲＩＩ ＫＯ ｉＰＳＣ、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ ＤＫＯ ｉＰＳＣ及び未編集野生型ｉＰＳＣ株も、図８Ｃに示す代替方法を利用してｉＮＫに分化させ、次に特性決定してそれらがＮＫ細胞と一致する表現型を示すかどうかを評価した（図１１Ｂ、１１Ｃ、１２Ｂ、１２Ｃ及び１３を参照されたい）。

【０３３２】

具体的には、フローサイトメトリーにより、ＣＩＳＨ ＫＯ ｉＮＫ、ＴＧＦβＲＩＩ ＫＯ ｉＮＫ、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ ＤＫＯ ｉＮＫを（ｉ）幹細胞（ＣＤ３４）；及び（ｉｉ）造血細胞（ＣＤ４３及びＣＤ４５）の例示的な表現型マーカーについて評価した。簡潔に述べると、各遺伝子型の９６ウェルプレートから２列の胚様体を採取して染色した。トリプシン及び機械的破壊を使用して単一細胞溶液を作製したら、細胞をヒトマーカーＣＤ３４、ＣＤ４５、ＣＤ３１、ＣＤ４３、ＣＤ２３５ａ及びＣＤ４１で染色した。図９に示すように、ＣＩＳＨ ＫＯ ｉＮＫ、ＴＧＦβＲＩＩ ＫＯ ｉＮＫ、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ ＤＫＯ ｉＮＫ及び野生型親クローン（ＰＣＳ）由来ｉＮＫは、精製ＣＤ３４＋ＨＳＣである対照細胞と比較してより低いＣＤ３４レベルを示した。ＣＤ３４の発現レベルは、これらのｉＮＫ細胞クローン全体にわたり類似しており、ｉＰＳ細胞の編集がＣＤ３４＋段階への分化に影響を与えなかったことが示された。図１０は、ＣＩＳＨ ＫＯ ｉＮＫ、ＴＧＦβＲＩＩ ＫＯ ｉＮＫ、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ ＤＫＯ ｉＮＫ及び野生型親クローン（ＰＣＳ）由来ｉＮＫが、ＣＤ４３及びＣＤ４５について同様の表面発現プロファイルを示したことを示す。したがって、編集ｉＰＳＣ及び未編集ｉＰＳＣから分化したｉＮＫは、幹細胞及び造血細胞について同様のマーカーレベルを示し、分化した編集細胞及び未編集細胞のいずれも、マーカー発現プロファイルに基づいて特定のＮＫ細胞表現型を示した。

【０３３３】

ＣＩＳＨ ＫＯ ｉＮＫ、ＴＧＦβＲＩＩ ＫＯ ｉＮＫ、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ ＤＫＯ ｉＮＫ、野生型親クローン（ＷＴ）由来ｉＮＫ及び末梢血由来ＮＫ細胞（ＰＢＮＫ）をさらにアッセイし、ＮＫ細胞のマーカーであるＣＤ５６の表面発現を測判定した。簡潔に述べると、分化の３９日目に細胞を採取して洗浄し、ヒトＣＤ５６、ＣＤ１６、ＮＫｐ８０、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ３３５、ＣＤ３３６、ＣＤ３３７、ＣＤ９４、ＣＤ１５８を認識する抗体を含有するフロー染色緩衝液に再懸濁した。細胞イベントをＮｏｖｏＣｙｔｅ Ｑｕａｎｔｅｏｎフローサイトメーター（Ａｇｉｌｅｎｔ）上で記録し

、ＦｌｏｗＪｏ（ＦｌｏｗＪｏ，ＬＬＣ）を用いて解析した。図１１Ａは、編集ｉＰＳＣ由来ｉＮＫ細胞が、未編集ｉＰＳＣ親クローン由来ｉＮＫ及びＰＢＮＫ細胞由来ｉＮＫと比較して、同様のＣＤ５６＋表面発現を示したことを示す（培養３９日目）。図１１Ｂは、編集ｉＰＳＣ由来ｉＮＫ細胞が、未編集ｉＰＳＣ親クローン由来ｉＮＫと比較して、同様のＣＤ５６＋及びＣＤ１６＋表面発現を示したことを示す（培養３９日目）。図１１Ｃは、編集ｉＰＳＣ由来ｉＮＫ細胞が、未編集ｉＰＳＣ親クローン由来ｉＮＫ及びＰＢＮＫ細胞由来ｉＮＫと比較して、同様のＣＤ５６＋、ＣＤ５４＋、ＫＩＲ＋、ＣＤ１６＋、ＣＤ９４＋、ＮＫＧ２Ａ＋、ＮＫＧ２Ｄ＋、ＮＣＲ１＋、ＮＣＲ２＋及びＮＣＲ３＋表面発現を示したことを示す（培養３９日目）。

【０３３４】

細胞の機能を確認するために、ｘＣｅｌｌｉｇｅｎｃｅプラットフォーム上で腫瘍細胞の細胞傷害性アッセイを用いて細胞を評価した。簡潔に述べると、腫瘍標的であるＳＫ－ＯＶ－３腫瘍細胞をプレーティングし、９６ウェルのｘＣｅｌｌｉｇｅｎｃｅプレートで最適な細胞密度まで増殖させた。次に、ＴＧＦβの存在下において、ｉＮＫを異なるＥ：Ｔ比（１：４、１：２、１：１、２：１、４：１及び８：１）で腫瘍標的に添加した。図１２Ｃは、ＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯ及びＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ細胞が、ＴＧＦ－βの存在下又は不在下のいずれかにおいて、未編集ｉＮＫ細胞と比較して、細胞溶解百分率によって測定されるように、ＳＫ－ＯＶ－３細胞をより効果的に殺滅したことを示す（１：４、１：２、１：１及び２：１のＥ：Ｔ比）。

【０３３５】

図８Ｂに記載されている代替方法を用いて作製されたｉＮＫ細胞は、ＣＤ５６＋であり、生体外細胞傷害性アッセイで腫瘍標的を殺滅できた一方、ｉＮＫは、ＣＤ１６、ＮＫＧ２Ａ及びＫＩＲなどの成熟ＮＫ細胞に関連する標準的なマーカーの多くを発現しなかった。Ｋ５６２フィーダー細胞株は、典型的に、同様の分化方法によって作製されたｉＮＫを増殖及び成熟させるために使用される。フィーダー上で増殖させた後、ｉＮＫは、ＣＤ１６、ＫＩＲ及びより成熟した表現型を示す他の表面マーカーを発現する事が多い。機能が強化されたより成熟したｉＮＫを達成するためのフィーダーフリーアプローチを特定するために、１１日目及び３９日目の分化段階について代替培地組成を試験した。（図８Ｂに示すように）ＡＰＥＬ２中で１１日目から３９日目まで細胞を培養する代わりに、スピン胚様体（ＳＥＢ）を上記と同じサイトカインの存在下において、１５％ヒトＡＢ血清を含むＮＫ　ＭＡＣＳ（登録商標）培地（ＭＡＣＳ　Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）中で培養した。このプロトコルは、図８Ｃに描写される。２つの培地組成を比較するために、分化プロセスの後半で、ＷＴ　ＰＣＳ、ＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯｉＰＳＣ、ＣＩＳＨＫＯ　ｉＰＳＣ及びＤＫＯ　ｉＰＳＣの１１日目のＳＥＢを、１つはＡＰＥＬ２ベース、もう１つはＮＫＭＡＣＳ＋血清ベースの２つの条件に分割した。３９日目に、細胞収率、マーカー発現及び細胞傷害性レベルを評価した。全ての場合において、ＮＫＭＡＣＳ＋血清条件（図８Ｃに描写される）は、ＡＰＥＬ２条件（図８Ｂに示される）よりも優れていた。図８Ｄは、ＮＫＭＡＣＳ＋血清条件が、３９日間のプロセスの終わりにより大きい倍数増殖をもたらしたことを示す（ほぼ３００倍の増殖対１００倍の増殖）。ＮＫマーカーの発現を上記のようにフローサイトメトリーで分析した場合、ＮＫＭＡＣＳ＋血清中で培養されたｉＮＫは、３４％ＣＤ１６陽性であり、２０％ＫＩＲ発現を示した一方、ＡＰＥＬ２条件では両方のマーカーについて本質的に陰性の細胞をもたらした。これは、試験されたテストされた全ての遺伝子型に当てはまった。時間又は条件に対するマーカーを可視化するために、フローサイトメトリーデータをＦｌｏｗＪｏでゲート制御して解析し、ヒートマップを構築した（図８Ｅ及び図８Ｆ）。サンプルは、最初に、生細胞（ＦＳＣ－Ｈ対ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（商標）Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｙｅｌｌｏｗ）、続いて免疫細胞（ＳＳＣ－Ａ対ＦＳＣ－Ａ）、シングレット（ＦＳＣ－Ｈ対ＦＳＣ－Ａ）及びナチュラルキラー細胞集団（ＣＤ５６対ＣＤ４５）に対するゲーティングによって浄化した。ＣＤ４５＋５６＋細胞として定義されるＮＫ集団をゲート制御し、各マーカーをＸ軸に沿ってヒストグラム／カウントプロットと同義の解析を行った（ＣＤ１６＋、ＣＤ９４＋、ＮＫＧ２Ａ＋、ＮＫ

Ｇ２Ｄ＋、ＣＤ３３５＋、ＣＤ３３６＋、ＣＤ３３７＋、ＮＫｐ８０＋、ｐａｎＫＩＲ＋）。前述のマーカーの統計値を、黒＝０、中程度の強度３０＜ｘ＜５０、最大強度＝１００のパラメータにキーを設定した、二重勾配ヒートマップ（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　８）を用いて可視化した。この解析に基づいて、全ての遺伝子型にわたる発現の動態と大きさは、ＮＫＭＡＣＳ＋血清条件によって改善された。細胞は、前述のように腫瘍細胞傷害性アッセイでも評価した。ＮＫＭＡＣＳ＋血清条件で作製されたｉＮＫは、ＡＰＥＬ２中で分化した細胞よりも低いＥ：Ｔ比で殺滅することができ、ＮＫ成熟の改善が細胞の機能に肯定的な影響を有したことが示された（図８Ｇ）。

【０３３６】

ＮＫＭＡＣＳ＋血清中の追加的な分化マーカーの分析により、ＣＤ１６の発現を確認した。図１１Ｂは、未編集又はＤＫＯ　ｉＰＳＣに由来する特定の亜集団（ＣＤ４５対ＣＤ５６及びＣＤ５６対ＣＤ１６）の分析を示す。さらに、図１１Ｃの未編集のｉＮＫ細胞及びＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫの細胞表面マーカープロファイルにより、編集ｉＮＫ細胞のＮＫ細胞マーカープロファイルが、未編集ｉＮＫ細胞のプロファイルと類似していることを確認した。総合すると、これらのデータは、Ｃａｓ１２ａで編集された一重及び二重ＫＯ　ｉＰＳＣクローンが、ＮＫ細胞マーカーによって定義されるように、未編集ｉＰＳＣクローンと同様の様式でｉＮＫ細胞に分化することを示す。

【０３３７】

さらに、特定の編集ｉＮＫクローン細胞（ＣＩＳＨ一重ノックアウト「ＣＩＳＨ＿Ｃ２、Ｃ４、Ｃ５及びＣ８」、ＴＧＦβＲＩＩ一重ノックアウト「ＴＧＦβＲＩＩ－Ｃ７」及びＴＧＦβＲＩＩ／ＣＩＳＨ二重ノックアウト「ＤＫＯ－Ｃ１」）並びに親クローンｉＮＫ細胞（「ＷＴ」）を、１ｎｇ／ｍＬ又は１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５の存在下で培養し、ｈｉＰＳＣ分化後２５日目、３２日目及び３９日目に分化マーカーを評価した。図１４に示すように、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５中で培養した表面発現表現型（集団の百分率として測定）は、一重ノックアウト、二重ノックアウト及び親クローン株で、表面発現のより高い割合をもたらした。

【０３３８】

ＮＫ　ＭＡＣＳ（登録商標）培地＋血清条件で分化させた編集ｉＮＫ細胞は、一連の分子及び機能解析を用いて、生体外でのエフェクター機能について評価した。最初に、ホスホフローサイトメトリーアッセイを実施して、３９日目のｉＮＫ細胞におけるＳＴＡＴ３（ｐＳＴＡＴ３）及びＳＭＡＤ２／３（ｐＳＭＡＤ２／３）のリン酸化状態を判定した。未編集ｉＮＫ細胞と比較して、ＣＩＳＨ　ＫＯ　ｉＮＫはＩＬ－１５刺激時にｐＳＴＡＴ３の増加を示し（図１１Ｄ）、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫはＴＧＦ－β刺激時にｐＳＭＡＤ２／３レベルの減少を示した（図１１Ｅ）。これらのデータは、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫが、ＩＬ－１５に対する感受性の向上及びＴＧＦ－β媒介免疫抑制に対する耐性の向上を有することを示唆する。さらに、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫは、酢酸ミリスチン酸ホルボール及びイオノマイシン（ＰＭＡ／ＩＭＮ）刺激アッセイを用いて、ＩＦＮγ及びＴＮＦαの産生を特性評価した。簡潔に述べると、細胞を２ｎｇ／ｍｌのＰＭＡと０．１２５μＭのイオノマイシン並びにタンパク質輸送阻害剤で４時間処理した。細胞を採取し、標準的な細胞内染色プロトコルを用いて染色した。ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫは、ＰＭＡ／ＩＭＮで刺激すると有意により大量のＩＦＮγ及びＴＦＮαを産生し（図１１Ｆ及び１１Ｇ）、未編集対照ｉＮＫと比較して、刺激後のサイトカイン産生が増強された証拠を提供した。

【０３３９】

ｉＮＫ腫瘍細胞殺滅活性を試験するために、３Ｄ固形腫瘍細胞殺滅アッセイ（図１２Ａに概略的に描写される）を利用した。簡単に説明すると、９６ウェル超低付着プレートに、５０００個のＮｕｃＬｉｇｈｔ　Ｒｅｄ標識ＳＫ－ＯＶ－３細胞を播種してスフェロイドを形成させた。スフェロイドを３７℃で培養した後、エフェクター細胞（異なるＥ：Ｔ比）と１０ｎｇ／ｍＬのＴＧＦ－βとを添加し、引き続いてスフェロイドをＩｎｃｕｃｙｔｅ　Ｓ３システムを用いて２時間ごとに１２０時間まで画像化した。示されているデー

タは、エフェクターの追加時の赤色オブジェクトの強度に対して正規化されている。回転楕円曲線の正規化は、正規化されていないデータで観察されたのと同じ有効性パターンを維持する。このアッセイを用いて、４つのＣＩＳＨ　ＫＯ　ｉＰＳＣクローン、２つのＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯ　ｉＰＳＣクローン及び１つのＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＰＳＣクローンから分化したｉＮＫの細胞傷害性を、未編集親ｉＰＳＣ由来対照ｉＮＫと比較した。図１２Ｂに示すように、編集ｉＮＫ細胞は、未編集ｉＮＫ最小細胞よりも効果的に、ＳＫ－ＯＶ－３スフェロイドのサイズを縮小できた（６つのアッセイからの平均データ）。特に、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫ細胞は、０．０１を超える全てのＥ：Ｔ比で、未編集ｉＮＫ細胞よりもＳＫ－ＯＶ－３スフェロイドのサイズをより大きく縮小させ、１以上のＥ：Ｔ比では有意に縮小させた。ＴＧＦβＲＩＩ　ＫＯクローン７　ｉＮＫは、未編集ｉＮＫ細胞と比較して有意に増強された殺滅も示した。多くのＣＩＳＨ　ＫＯクローンは、１０：１のＥ：Ｔ比では滅殺力の著しい増強は見られなかったが、クローンの大部分は、ＳＫ－ＯＶ－３スフェロイド細胞殺滅が増加する傾向を示し、その差はＥ：Ｔ比が最も高いときに最大となった。編集ｉＮＫの機能をさらに解明するために、細胞が数日間にわたって腫瘍標的を繰り返し殺滅するように仕向け、本明細書では生体外連続殺滅アッセイと記載されている。アッセイの０日目に、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＴＧＦ－β（１０ｎｇ／ｍｌ）の存在下で１０×１０^{6}個のＮａｌｍ６腫瘍細胞（Ｂ細胞白血病細胞株）及び２×１０^{5}個のｉＮＫを９６ウェルプレートの各ウェルにプレーティングした。４８時間の間隔で５×１０^{3}個のＮａｌｍ６腫瘍細胞（Ｂ細胞白血病細胞株）のボーラスを追加して、ｉＮＫ集団を再チャレンジした。図１３に示すように、編集ｉＮＫ細胞（ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫ細胞）は、Ｎａｌｍ６腫瘍細胞を用いた複数回チャレンジの後、Ｎａｌｍ６細胞の継続的な殺滅を示した一方、未編集ｉＮＫ細胞は、それらの連続殺滅効果が制限されていた。データは、ＣＩＳＨ及びＴＧＦβＲＩＩの編集が、細胞殺滅の長期的な増強をもたらすという結論を裏付ける。

【０３４０】

最後に、生体内モデルにおいて、腫瘍標的を殺滅する能力について、編集ｉＮＫ細胞（ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫ細胞）をアッセイした。この目的のために、確立されたＮＯＤ　ｓｃｉｄガンマ（ＮＳＧ）異種移植モデルを図１５Ａに描写されるアッセイで用いた。簡潔に述べると、ルシフェラーゼを発現するように操作された、１×１０^{6}個のＳＫ－ＯＶ－３細胞を腹腔内（ＩＰ）に０日目に注射した。３日目に、接種したマウスを、生体内イメージングシステム（ＩＶＩＳ）を用いて画像化し、３群に無作為に割り付けた。翌日（４日目）、２０×１０^{6}個の未編集ｉＮＫ又はＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫをＩＰ注射で投与し、第３群には対照としてビヒクルを注射した。動物に腫瘍細胞を接種した後、動物を週１回画像化して、経時的な腫瘍量を測定した。図１５Ｂは、３つの異なる群（各群はｎ＝９）、ビヒクル、未編集ｉＮＫ及びＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫの個々のマウスの腫瘍の生物発光を描写する。これらの同じ動物の経時的な平均腫瘍量は、図１５Ｃに描写される。データに対して二元配置分散分析を実施したところ、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫ処置動物は、未編集ｉＮＫで処理された動物と比較して、生物発光による測定で有意により少ない腫瘍量を有した（ｐ値：０．０００４）。腫瘍移植後１０日目までに、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫを注射したマウスは、ビヒクル対照又は未編集ｉＮＫを注射したマウスと比較して、それらの腫瘍サイズの有意な減少を示した。腫瘍サイズの全体的な減少は、数日間にわたり、少なくとも腫瘍移植後３５日目まで見られる。これらのデータは、編集ＤＫＯ　ｉＮＫが、この生体内モデルにおいて腫瘍細胞を積極的に殺滅していたことを示す。

【０３４１】

全体として、これらの結果は、未編集及びＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＰＳＣが、標準的なＮＫ細胞マーカーを示すｉＮＫ細胞に分化し得ることを実証する。さらに、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫ細胞は、固形悪性腫瘍及び悪性血液疾患の両方に由来する腫瘍細胞株に対して、増強された抗腫瘍活性を実証した。

【０３４２】

実施例３：ＡＤＯＲＡ２Ａ編集ｉＰＳＣは機能増強を有する編集ｉＮＫを生じる

ＤＯＲＡ２Ａは、関心のあるもう１つの標的遺伝子であり、その喪失は腫瘍微小環境（ＴＭＥ）のＮＫ細胞機能に影響を与えるという仮説が立てられている。ＡＤＯＲＡ２Ａ遺伝子は、ＴＭＥのアデノシンに応答する受容体をコード化し、ＮＫ細胞に対するいくつかの抑制効果を駆動するように機能する、ｃＡＭＰの産生をもたらす。本発明者らは、ＡＤＯＲＡ２Ａの機能をノックアウトすることで、ｉＮＫ細胞の機能を強化し得るという仮説を立てた。実施例１及び２に記載されているものと同様のアプローチを利用して、３つのアミノ酸置換（Ｍ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａ（配列番号１１４８））を有する操作されたＣａｓ１２ａを有するＲＮＰと、ＡＤＯＲＡ２Ａに対する特異的ｇＲＮＡを使用して、ＰＣＳ　ｉＰＳＣ株を編集した（ただし２μＭのＲＮＰではなく、４μＭのＲＮＰが細胞に送達された）。実施例１に記載されているように、ＲＮＡ、標的化ドメインの５’に位置する配列ＵＡＡＵＵＵＣＵＡＣＵＣＵＵＧＵＡＧＡＵ（配列番号１１５３）のＡｓＣｐｆ１スキャフォールド及びスキャフォールド配列の５’末端の配列ＡＴＧＴＧＴＴＴＴＧＴＣＡＡＡＡＧＡＣＣＴＴＴＴ（配列番号１１５４）の２５量体ＤＮＡ伸長からなる、標的化ドメインを用いてｇＲＮＡを作製した。ＡＤＯＲＡ２Ａ　ｇＲＮＡ配列を表１１に示す。

【０３４３】

【表５６】

表 11. ガイド RNA 配列

標的	gRNA 標的化ドメイン配列	完全長 gRNA 配列
ADORA2A 4113	CCAUCGGCCUGACUCCCAUG (配列番号 1159)	ATGTGTTTTTGTCAAAAGACCTTTTrUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrArUrCrGrGrCrCrUrGrArCrUrCrCrCrArUrG (配列番号 1160)

【０３４４】

クローン選択前のＣａｓ１２ａ　ＲＮＰによるバルク編集率は、次世代配列決定（ＮＧＳ）による測定で４９％であった。それでもなお、両方のＡＤＯＲＡ２Ａ対立遺伝子が編集されたいくつかのクローンが同定され、増殖及び分化された。ＡＤＯＲＡ２Ａ編集ｉＰＳＣが、ＣＤ４５＋ＣＤ５６＋ｉＮＫをもたらし得るかどうかを判定するために、実施例２に記載されているＮＫＭＡＣＳ＋血清プロトコルを用いて、バルク及び単一ＡＤＯＲＡ２Ａ　ＫＯクローンの両方を区別した（図８Ｃ）。図１６Ａに示すように、編集ｉＰＳＣは、未編集対照ｉＰＳＣと比較して、同様のＮＫ細胞マーカー発現を有するｉＮＫに分化した。

【０３４５】

Ｃａｓ１２ａ媒介ＡＤＯＲＡ２Ａ編集が、遺伝子の機能的欠失をもたらしたことを確認するために、編集ｉＮＫ及び未編集対照ｉＮＫの両方で、５’－Ｎ－エチルカルボキサミドアデノシン（「ＮＥＣＡ」、ＡＤＯＲＡ２Ａ作動薬の役割を果たすより安定したアデノシン類似体）での処理に応じたｃＡＭＰ蓄積を評価した。ＡＤＯＲＡ２Ａの機能的ノックアウトを有する編集細胞は、機能的ＡＤＯＲＡ２Ａを有する細胞と比較して、ＮＥＣＡに応答して細胞内にそれほど多くのｃＡＭＰを蓄積するとは予想されなかった。簡潔に述べると、ｉＮＫ細胞を様々な濃度のＮＥＣＡで１５分間処理した。次に、ｉＮＫ細胞を溶解し、溶解産物中のｃＡＭＰをＣｉｓＢｉｏ　ｃＡＭＰキットを使用して測定した。図１６Ｂに示すように、未編集ｉＮＫは、ＮＥＣＡの濃度が増加するにつれてｃＡＭＰ蓄積のレベルが増加した（ｎ＝２）。反対に、ＡＤＯＲＡ２Ａ（「Ａ２Ａ　ＫＯ」）ＫＯ　ｉＮＫは、ＮＥＣＡの濃度が増加すると、最小のｃＡＭＰ産生量を示し、Ｃａｓ１２ａによって誘導される編集により、ＡＤＯＲＡ２Ａ機能が機能的にノックアウトされたことが示され

た。バルクｉＮＫ（図１６Ｂの上２つのＡ２Ａ　ＫＯ　ｉＮＫ株）は、バルク集団のより低い編集率から予測されたように、選択したＡＤＯＲＡ２Ａ　ＫＯクローン（図１６Ｂの下４つのＡ２Ａ　ＫＯ　ｉＮＫ株）よりわずかに高いレベルのｃＡＭＰを示した。このＡＤＯＲＡ２Ａの機能除去の分子的証拠に基づいて、ｉＮＫは、腫瘍微小環境においてアデノシンの阻害効果に抵抗性であることが予測される。

【０３４６】

ＡＤＯＲＡ２Ａ　ＫＯ　ｉＮＫは、実施例２に記載されているように生体外ＮＡＬＭ６連続殺滅アッセイでも試験したが、ＴＧＦβの代わりに１００μＭのＮＥＣＡを添加したという１つの大きい違いがあった。ＡＤＯＲＡ２Ａ　ＫＯ　ｉＮＫは、ＮＥＣＡの存在下において、野生型ｉＮＫと比較して強化された連続殺滅を示し、ＡＤＯＲＡ２Ａ　ＫＯ　ｉＮＫがＮＥＣＡ阻害に抵抗性であることが示された（図１６Ｃ）。結果として、ＡＤＯＲＡ２Ａ　ＫＯ　ｉＮＫ細胞は、ＴＭＥ中にアデノシンが存在する場合、未編集ｉＮＫ細胞と比較して腫瘍細胞に対する細胞傷害性が改善されることが予測された。

【０３４７】

実施例４：ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ／ＡＤＯＲＡ２Ａ三重編集（ＴＫＯ）ｉＰＳＣの作製及び分化ＴＫＯ　ｉＮＫの特性評価

ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲＩＩ及びＡＤＯＲＡ２Ａ三重編集（ＴＫＯ）ｉＰＳＣを作製するために、２つのアプローチを採用した；１）実施例１及び２に記載されているＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ（ＣＲ）ｉＰＳＣクローンが、ＲＮＰを標的化するＡＤＯＲＡ２Ａを用いた電気穿孔を介して、ＡＤＯＲＡ２Ａ遺伝子座で編集される２段階編集（実施例３に記載されている）、及び２）標的遺伝子毎に１つずつ、３つのＲＮＰ全てを用いたＰＣＳ　ｉＰＳ細胞の同時編集。いずれのストラテジーも、実施例１で簡潔に記載されている編集プロトコルを利用した。同時編集の場合、総ＲＮＰ濃度は、８μＭ（Ｃｉｓｈ：２μＭ＋ＴＧＦβＲＩＩ：２μＭ＋ＡＤＯＲＡ２Ａ：４μＭ）であった。アプローチに関係なく、細胞をプレーティングして増殖させ、コロニーを上記のように採取した。ＮＧＳを用いて、ｉＰＳＣから採取したｇＤＮＡを分析したところ、全ての標的遺伝子を同時に編集した場合、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲＩＩ及びＡＤＯＲＡ２Ａのバルク編集率は、それぞれ９６．７０％、９７．１７％及び９０．１６％であった。６つの対立遺伝子全てに挿入及び／又は欠失（インデル）を有する採取されたコロニーを、さらなる分析のために選択した。

【０３４８】

実施例１に記載されている分析と同様に、未編集ｉＰＳＣ及び編集ｉＰＳＣは、ＮＫＭＡＣＳ＋血清条件（図８Ｃに記載されている）を用いてｉＮＫに分化させ、培養の２５日目、３２日目及び３９日目を含めた異なる時点でフローサイトメトリーによって評価した。図１７Ａに示すように、異なるＮＫ表面マーカーの分析は、二段階編集法（ＣＲ＋Ａ８）又は同時編集法（ＣＲＡ６）によって作成されたクローン間に、大きい違いがないことを明らかにした。いずれのＴＫＯクローン（ＣＲ＋Ａ８及びＣＲＡ６）も、各時点で未編集ｉＮＫ（Ｗｔ）と同様の発現プロファイルを示した。ＴＫＯ　ｉＮＫ細胞のＮＥＣＡに対する応答性を分析したところ（実施例３に記載されている）、両方のＴＫＯ　ｉＮＫにはｃＡＭＰの蓄積がほとんど又は全くなく（図１７Ｂ）、ＡＤＯＲＡ２Ａが機能的にノックアウトされたことが実証された。対照的に、未編集ｉＮＫは、ｃＡＭＰのＮＥＣＡ用量依存的増加を実証した（図１７Ｂ）。これらの結果は、ＴＫＯ　ｉＮＫが、ＴＭＥにおけるアデノシンの阻害効果に抵抗性であると予測されることを示す。最後に、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ／ＡＤＯＲＡ２Ａ　ＴＫＯ　ｉＮＫを、ＣＩＳＨ／ＴＧＦβＲＩＩ　ＤＫＯ　ｉＮＫ、ＡＤＯＲＡ２Ａ単一ＫＯ（ＳＫＯ）ｉＮＫ及び未編集ｉＮＫと共に、３Ｄ腫瘍細胞殺滅アッセイで評価した。このアッセイは、ＩＬ－１５及びＴＧＦβを使用したがＮＥＣＡは使用せずに、実施例２に記載されているように実施した。興味深いことに、ＴＫＯ（ＣＲＡ６）とＤＫＯ（ＣＲ）の両方のｉＮＫは、腫瘍細胞の殺滅において未編集ｉＮＫよりも優れており、両方の多重編集ｉＮＫが、未編集対照細胞に優る能増強を有したことが示された（図１７Ｃ）。これらの結果は、ＡＤＯＲＡ２Ａをノックアウトしても、

ＣＩＳＨ及びＴＧＦＢＲＩＩ　ＫＯを有するｉＮＫが、腫瘍スフェロイド細胞を殺滅する能力に悪影響を及ぼさないことを示す。

【０３４９】

実施例５：ｇＲＮＡを標的化するＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲＩＩ、ＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａの選択。

ＣＩＳＨ、ＴＧＦＢＲＩＩ、ＡＤＯＲＡ２Ａ、ＴＩＧＩＴ及びＮＫＧ２Ａ　Ｃａｓ１２ａガイドＲＮＡの切断効率をさらに試験した。ガイドＲＮＡは、市販の合成されたｇＲＮＡとＣａｓ１２ａを生体外で複合体化し、電気穿孔を介してｇＲＮＡ／Ｃａｓ１２ａリボ核タンパク質（ＲＮＰ）をＩＰＳＣに導入することによってスクリーニングした。ｉＰＳＣは、３つのアミノ酸置換（Ｍ５３７Ｒ、Ｆ８７０Ｌ及びＨ８００Ａ（配列番号１１４８））がある操作されたＣａｓ１２ａを有する、ＲＮＰを使用して編集した。ＲＮＡ、標的化ドメインの５’に位置する配列ＵＡＡＵＵＵＣＵＡＣＵＣＵＵＧＵＡＧＡＵ（配列番号１１５３）のＡｓＣｐｆ５スキャフォールド及びスキャフォールド配列の５’末端の配列ＡＴＧＴＧＴＴＴＴＧＴＣＡＡＡＡＧＡＣＣＴＴＴＴ（配列番号１１５４）の２５量体ＤＮＡ伸長からなる、標的化ドメインを用いてｇＲＮＡを作製した。表１２は、編集活性について試験されたガイドＲＮＡの標的化ドメインドを提供する。

【０３５０】

【表５７】

表 12: ガイド RNA 配列

標的	gRNA 標的化ドメイン配列
TGFβRII	UGAUGUGAGAUUUUCCACCUG (配列番号 1161)
CISH	ACUGACAGCGUGAACAGGUAG (配列番号 1162)
ADORA2A	CCAUCGGCCUGACUCCCAUGC (配列番号 1163)
ADORA2A	CCAUCACCAUCAGCACCGGGU (配列番号 1164)
ADORA2A	CCUGUGUGCUGGUGCCCCUGC (配列番号 1165)
TIGIT	UGCAGAGAAAGGUGGCUCUAU (配列番号 1166)
TIGIT	UCUGCAGAAAUGUUCCCCGUU (配列番号 1167)
TIGIT	UAGGACCUCCAGGAAGAUUCU (配列番号 1168)
NKG2A	GCAACUGAACAGGAAAUAACC (配列番号 1169)
NKG2A	GUUGCUGCCUCUUUGGGUUUG (配列番号 1170)
NKG2A	AAGGGAAUGACAAAACCUAUC (配列番号 1171)

【０３５１】

手短に述べると、１０万個のｉＰＳＣ／ウェルを関心のあるＲＮＰで形質移入し、細胞を３７℃で７２時間培養した後、ＤＮＡの特性評価のために採取した。ｉＰＳ細胞に、様々な濃度のｇＲＮＡ／Ｃａｓ１２ａ　ＲＮＰを形質移入した。編集イベントの百分率は、陰性対照（０ｍＭ）から８ｍＭまでの８つの異なるＲＮＰ濃度に対して判定した。

【０３５２】

図１８のパネル１に示すように、ＴＧＦβＲＩＩｇ　ＲＮＡ（配列番号１１６１）は、約７９ｎＭＲＮＰのＥＣ５０を示した。図１８のパネル２に示すように、ＣＩＳＨｇ　ＲＮＡ（配列番号１１６２）は、約５０ｎＭＲＮＰのＥＣ５０を示した。図１８のパネル３に示すように、ＲＮＰ２９６０に含まれるＡＤＯＲＡ２Ａ　ｇＲＮＡ（配列番号１１６３）は、約６３ｎＭＲＮＰのＥＣ５０を示した一方、ＲＮＰ３１０９に含まれるＡＤＯＲＡ２Ａ　ｇＲＮＡ（配列番号１１６４）又はＲＮＰ３１０８に含まれるｇＲＮＡ（配列番号１１６５）は、それぞれ約４９３ｎＭ及び約２８０ｎＭのＲＮＰのＥＣ５０値を示した。図１８のパネル４に示すように、ＲＮＰ２８９２に含まれるＴＩＧＩＴ　ｇＲＮＡ（配列番号１１６６）は、約２９ｎＭのＲＮＰのＥＣ５０を示した一方、ＲＮＰ３１０６に含ま

れるＴＩＧＩＴ　ｇＲＮＡ（配列番号１１６７）又はＲＮＰ３１０７に含まれるｇＲＮＡ（配列番号１６７）は、それぞれ約１１４６ｎＭ及び約４０ｎＭのＲＮＰのＥＣ５０値を示した。図１８のパネル５に示すように、ＲＮＰ１９１４２に含まれるＮＫＧ２Ａ　ｇＲＮＡ（配列番号１１６９）は、約８ｎＭのＲＮＰのＥＣ５０を示した一方、ＲＮＰ３０６９に含まれるＮＫＧ２Ａ　ｇＲＮＡ（配列番号１１７０）又はＲＮＰ２８９１に含まれるｇＲＮＡ（配列番号１１７１）は、それぞれ約１２ｎＭ及び約１３ｎＭのＲＮＰのＥＣ５０値を示した。

【０３５３】

均等物

本開示をその詳細な説明と併せて説明してきたが、前述の説明は、本開示の範囲を説明するためのものであり、添付の請求項の範囲によって定義される本開示の範囲を限定するものではないことが理解されるであろう。他の態様、利点及び修正形態は、以下の請求項の範囲内である。

【図面】

【図１】

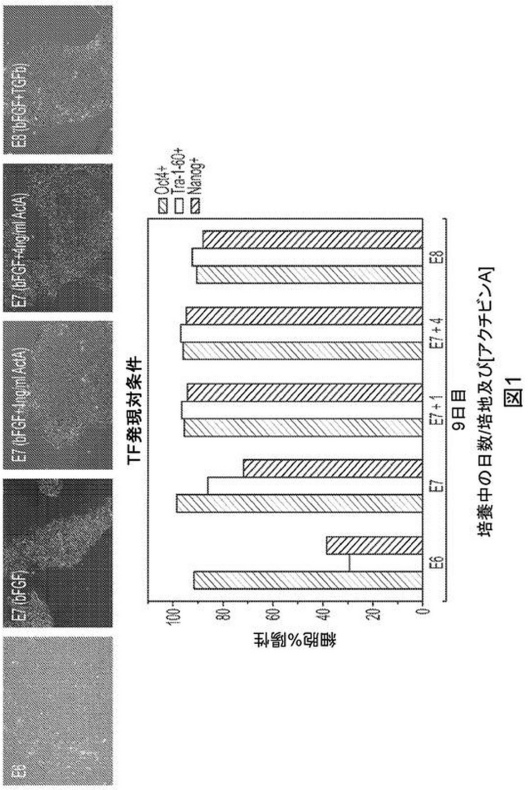


図1

【図２】

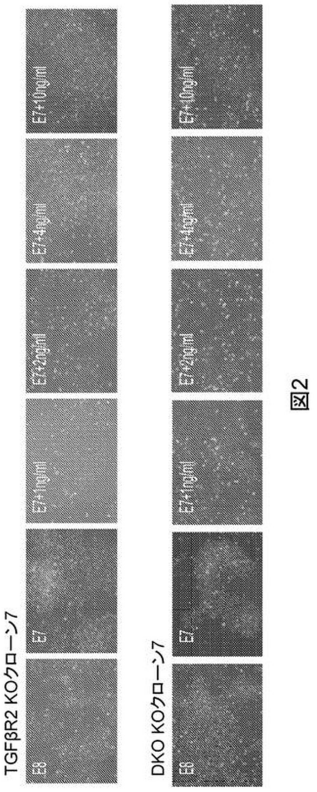


図2

【図３】

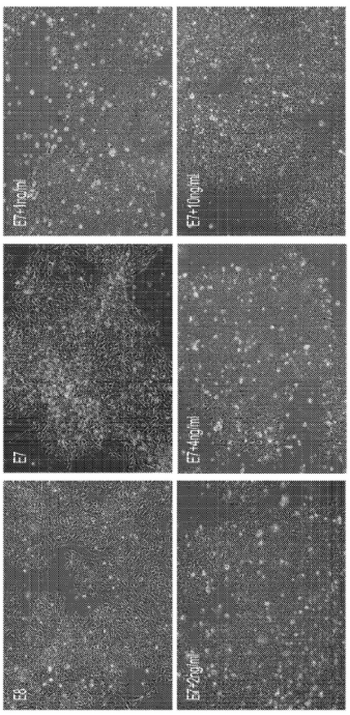


FIG. 3

【図４Ａ】

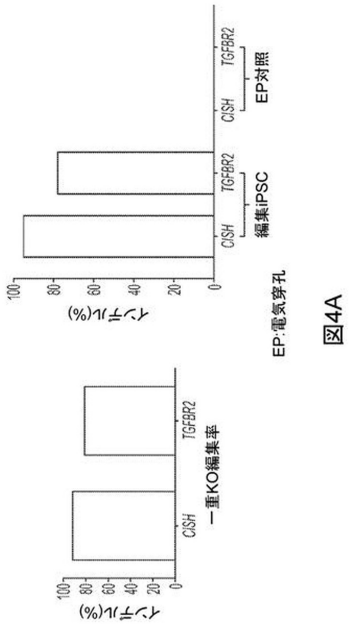


図4A

【図４Ｂ】

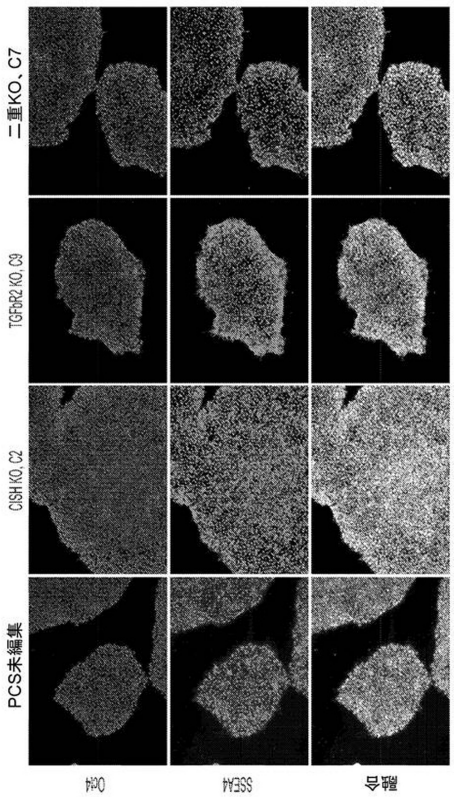


図4B

【図５】

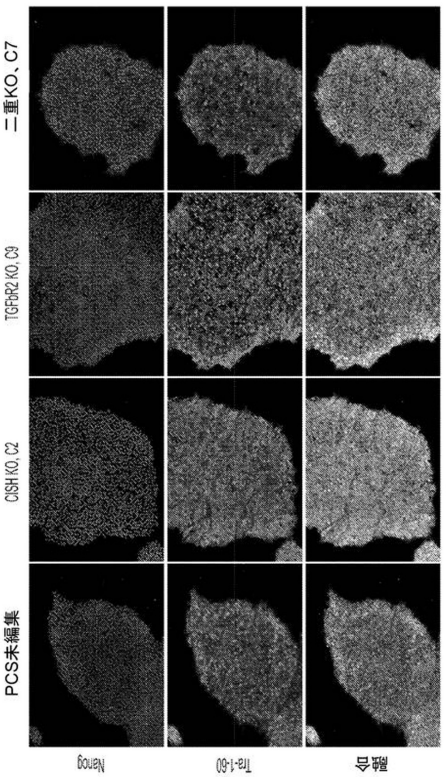


図5

【図６】

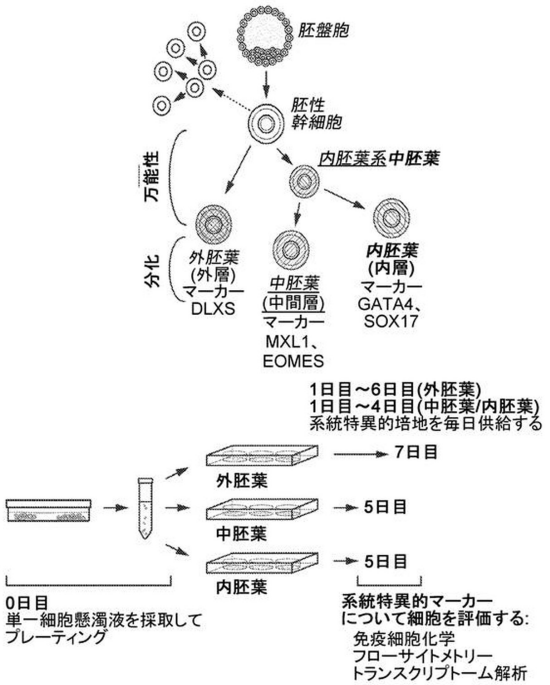


図6

【図７Ａ】

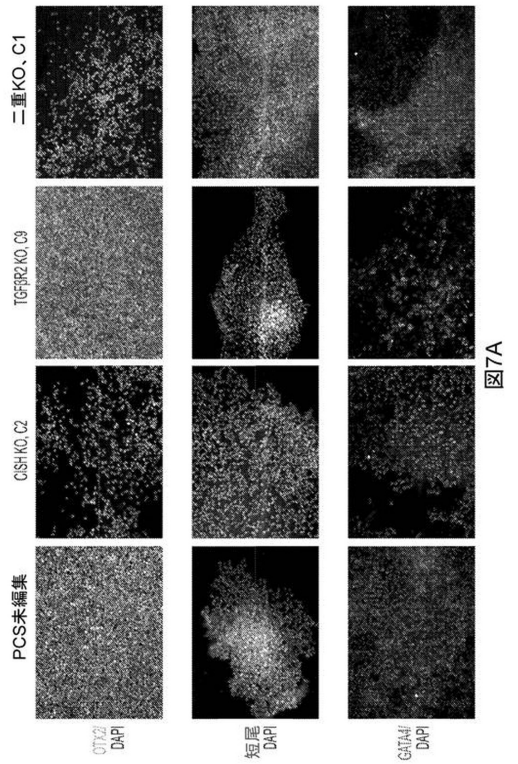


図7A

【図７Ｂ】

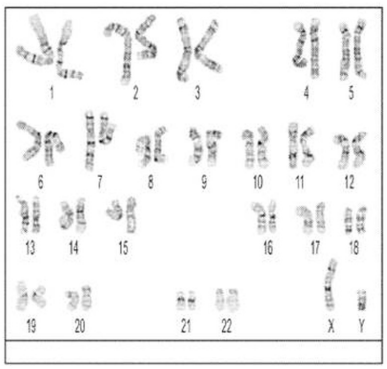


FIG. 7B

【図７Ｃ】

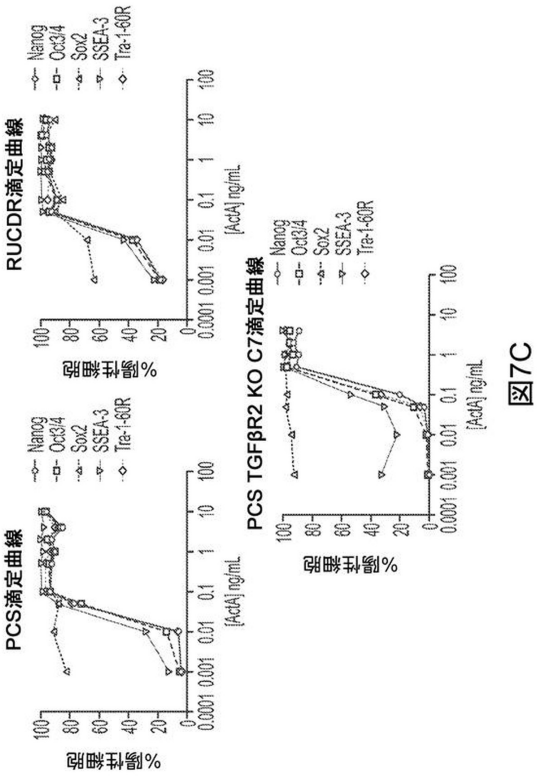


図7C

【図７Ｄ】

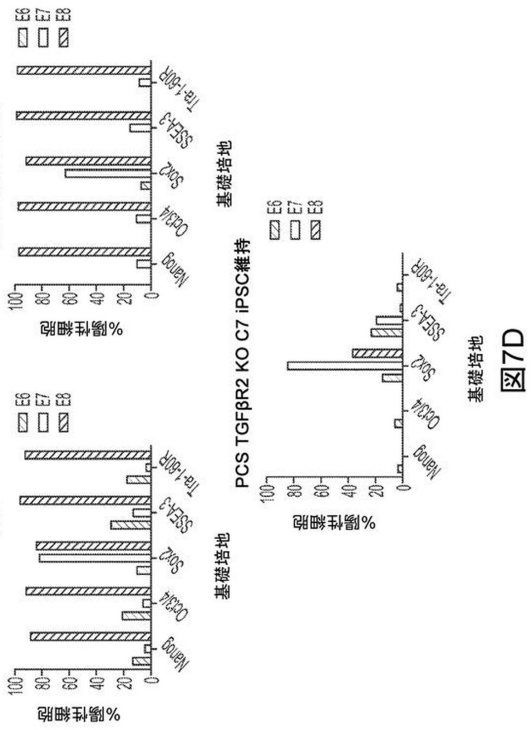


図7D

【図８Ａ】

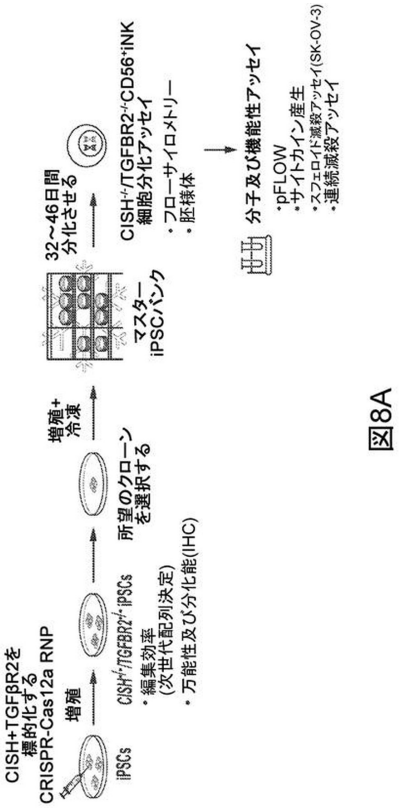


図8A

【図８Ｂ】

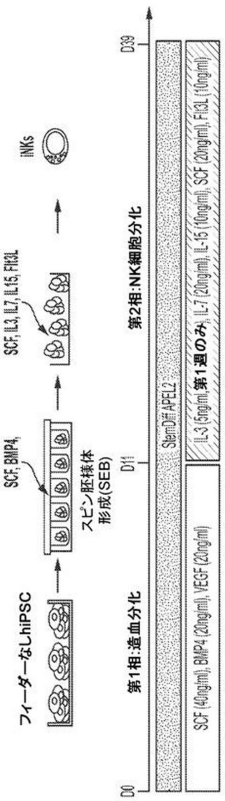


図8B

【図８Ｃ】

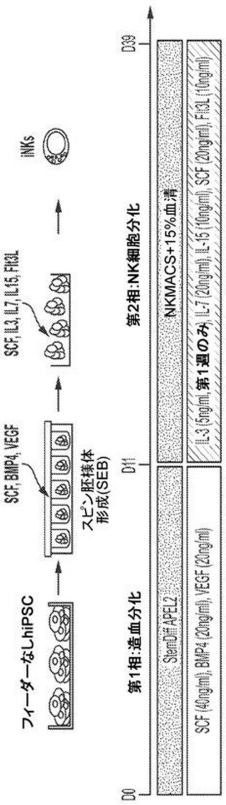


図8C

【図８Ｄ】

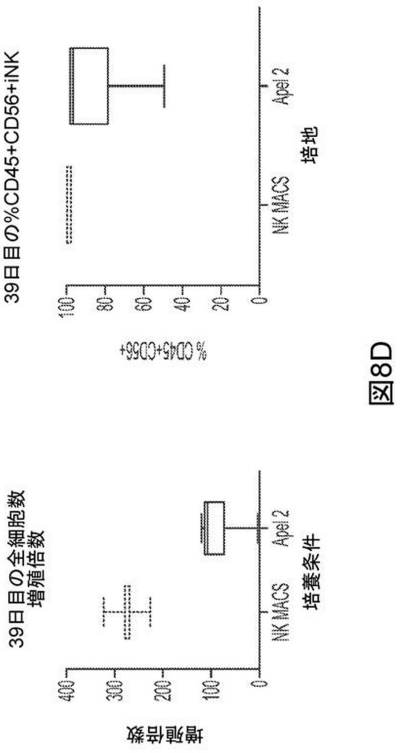


図8D

【図８Ｅ】

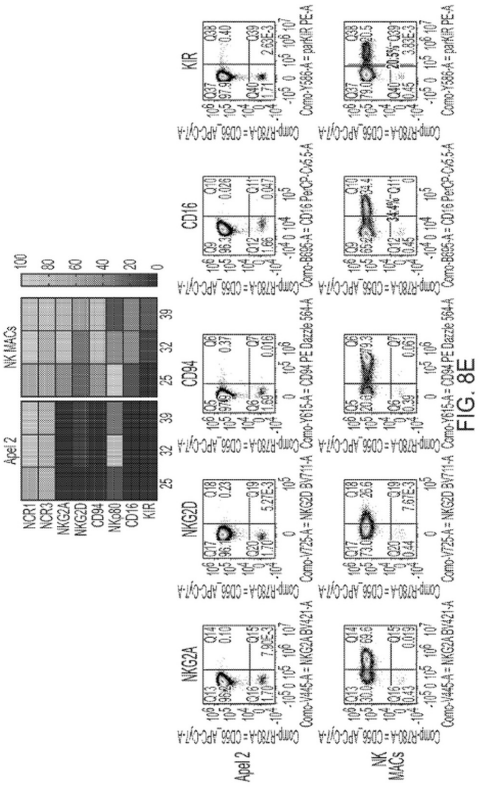


FIG. 8E

【図８Ｆ】

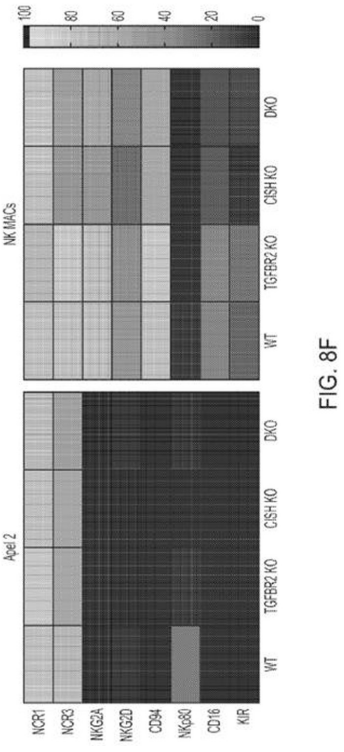


FIG. 8F

【図８Ｇ】

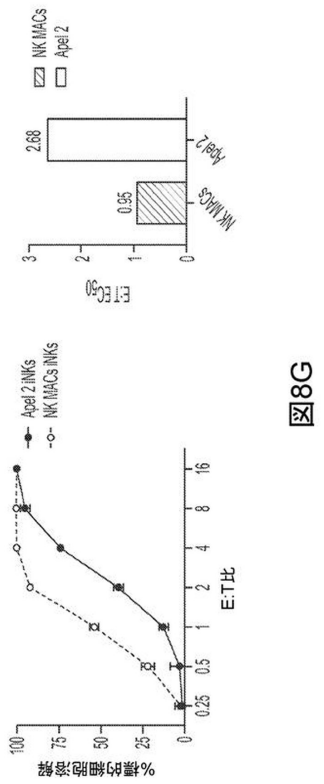


図8G

【図９】

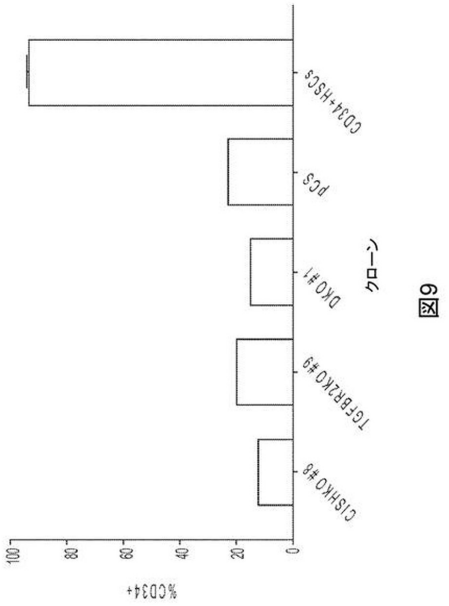


図9

【図１０】

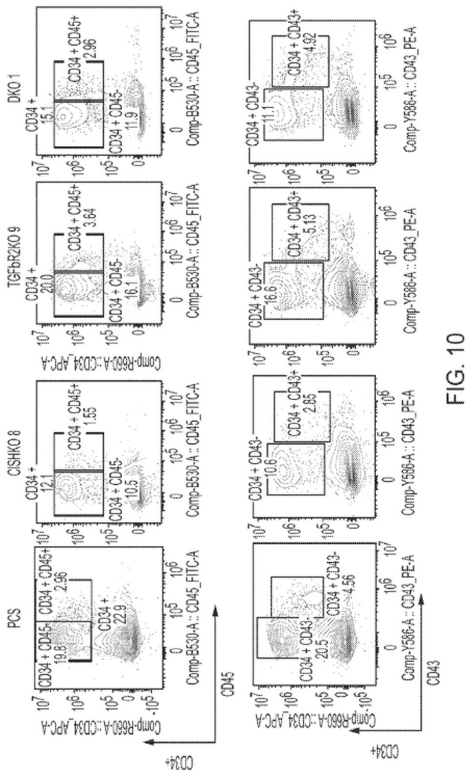


FIG. 10

【図１１Ａ】

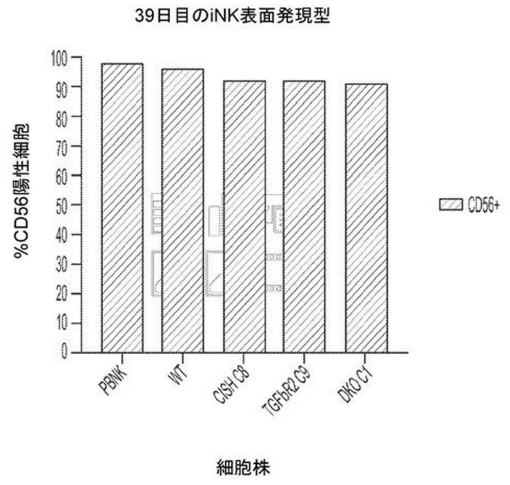


図11A

【図１１Ｂ】

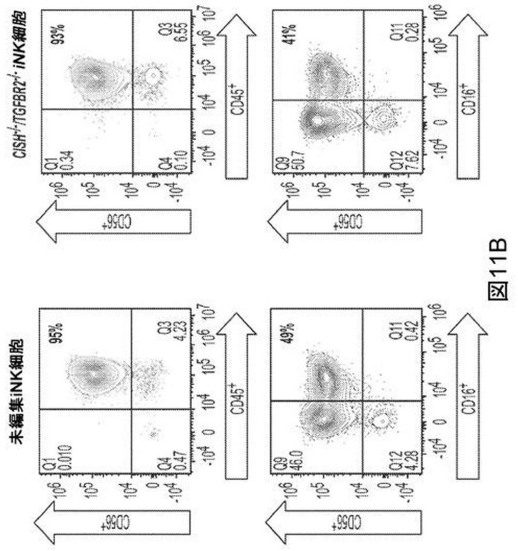


図11B

【図１１Ｃ】

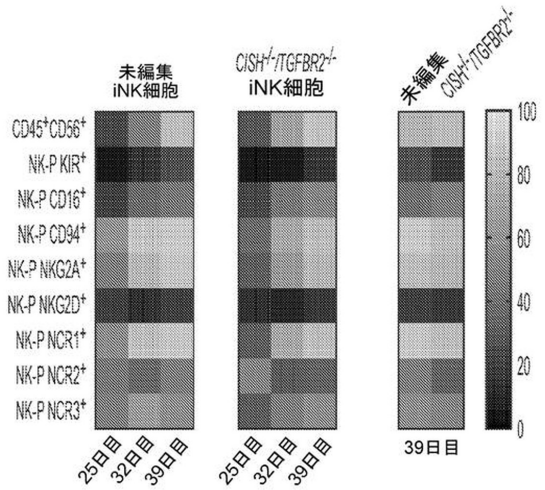


図11C

【図１１Ｄ】

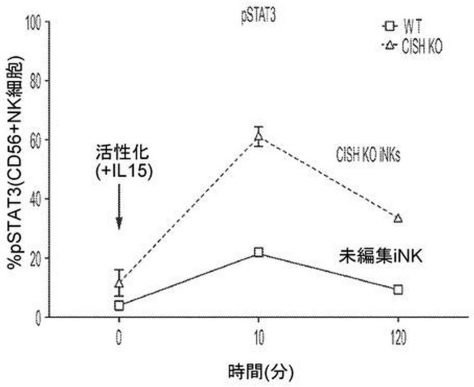


図11D

【図１１Ｅ】

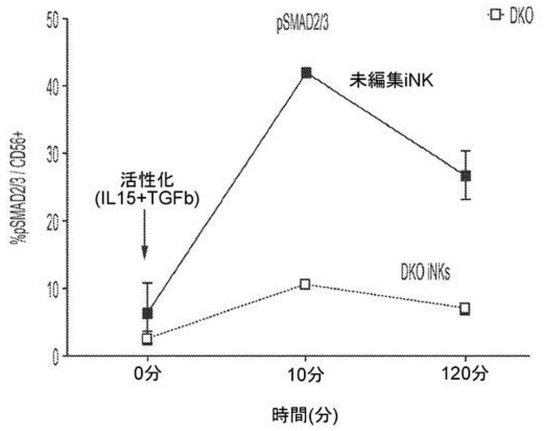


図11E

【図１１Ｆ】

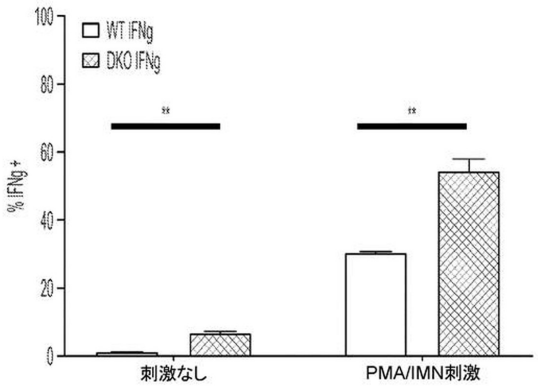


図11F

【図１１Ｇ】

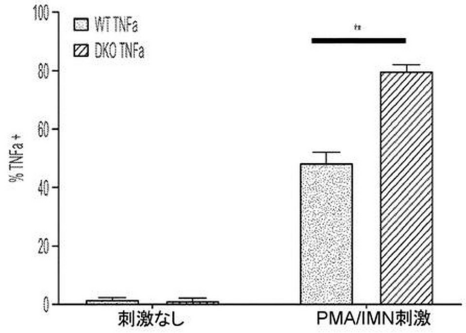


図11G

【図１２Ａ】

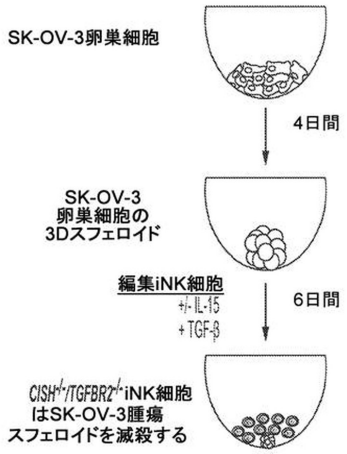


図12A

【図１２Ｂ】

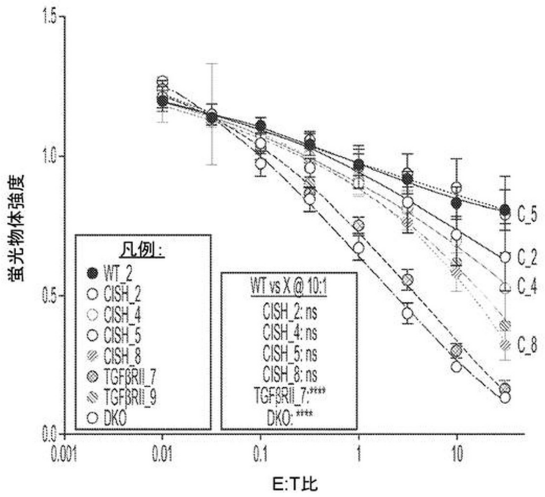


図12B

【図１２Ｃ】

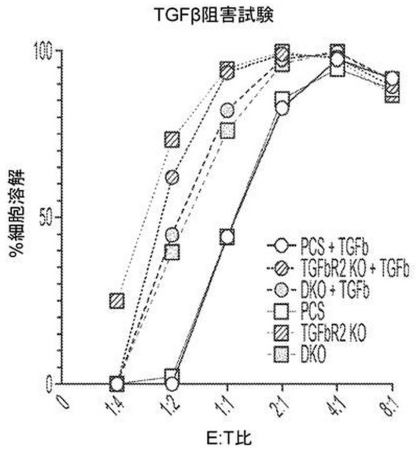


図12C

【図１３】

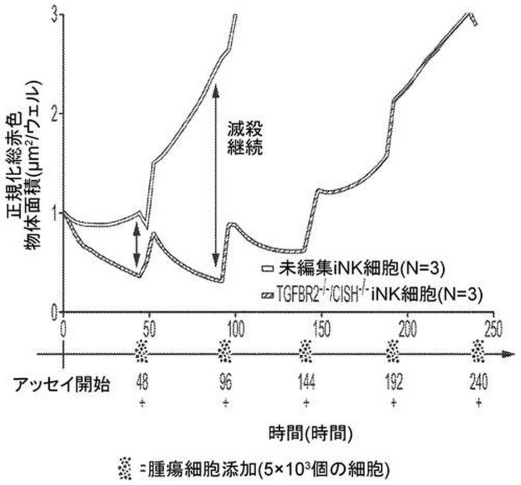


図13

【図１４】

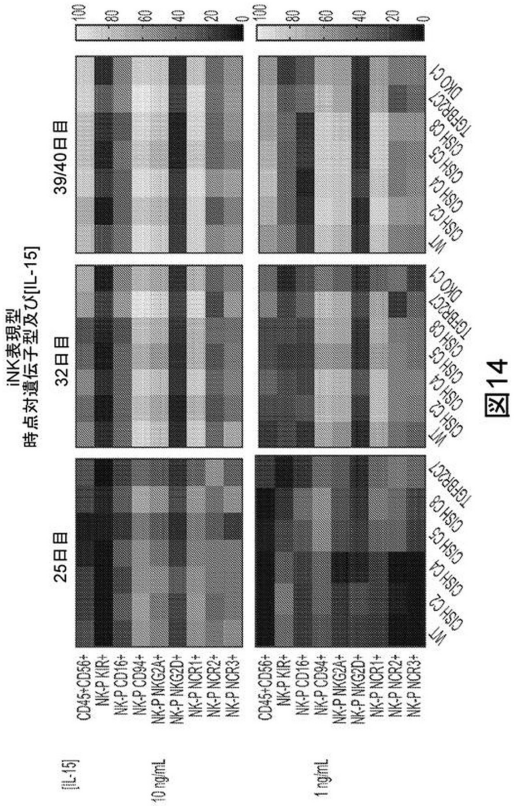


図14

【図１５Ａ】

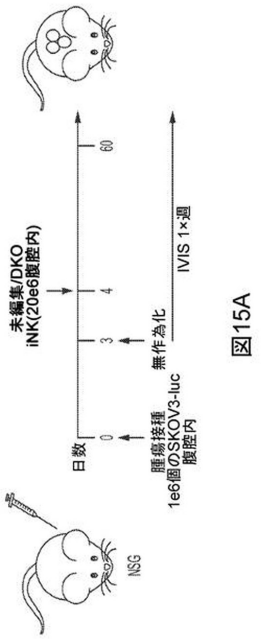


図15A

【図１５Ｂ】

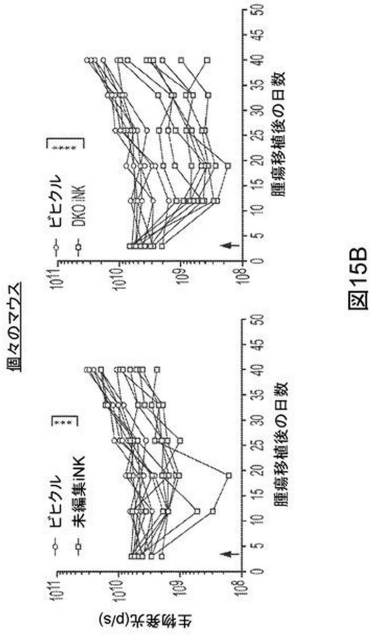


図15B

【図１５Ｃ】

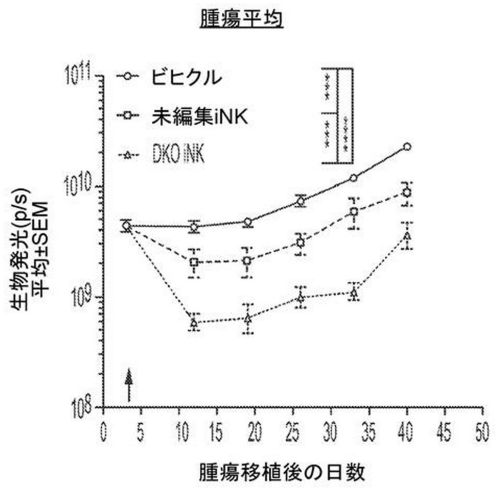


図15C

【図１６Ａ】

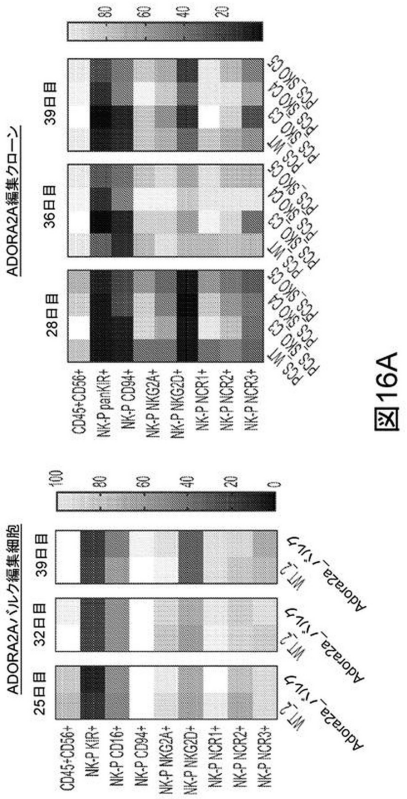


図16A

【図１６Ｂ】

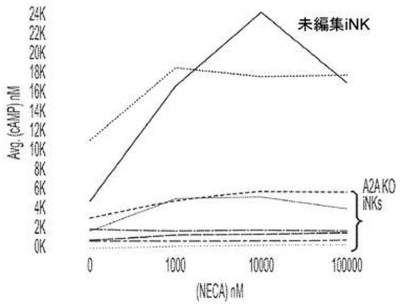


図16B

【図１６Ｃ】

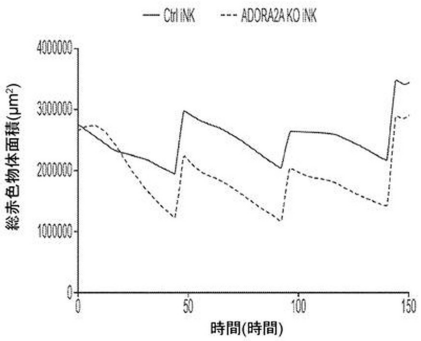


図16C

【図１７Ａ】

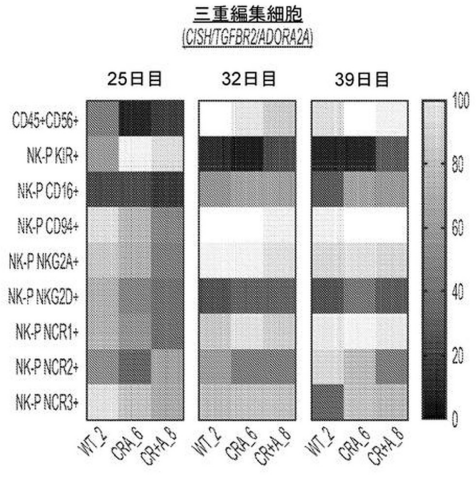


図17A

【図１７Ｂ】

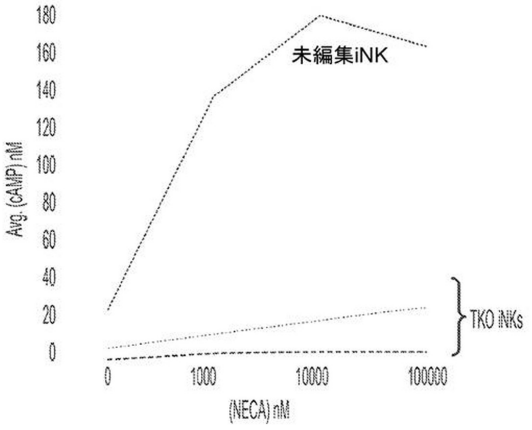


図17B

【図１７Ｃ】

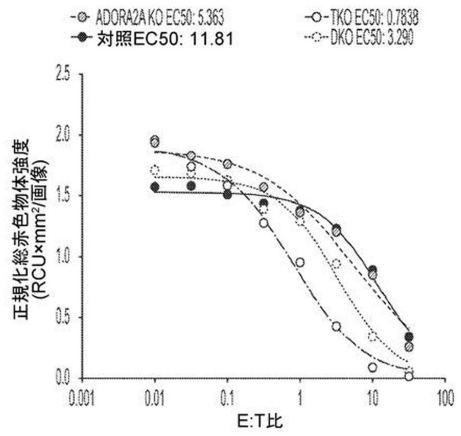


図17C

【図１８】

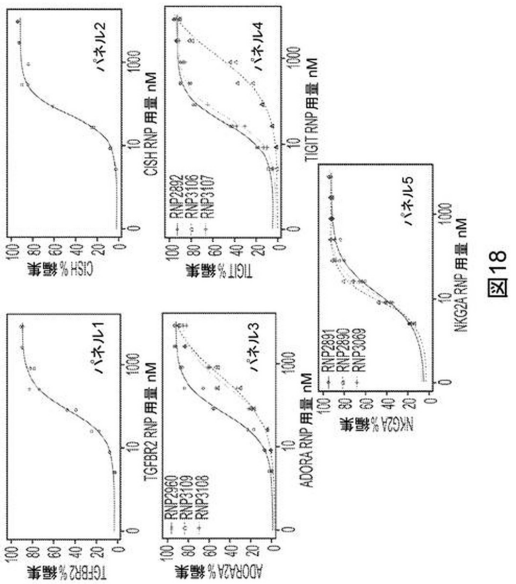


図18

【配列表】

2023507118000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/066256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 35/17; C07K 14/71; C12N 5/00 (2021.01)
CPC - C07K 14/71; C12N 5/0646; C12N 5/0696; C12N 2510/00 (2021.02)

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)
see Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2019/0374576 A1 (INTIMA BIOSCIENCE, INC. et al) 12 December 2019 (12.12.2019) entire document	1-4, 14-18, 37-40
X -- Y	US 2010/0240090 A1 (SAKURADA et al) 23 September 2010 (23.09.2010) entire document	55, 56 --- 57
X -- Y	US 2013/0157947 A1 (MERCOLA et al) 20 June 2013 (20.06.2013) entire document	68 --- 69-72, 75, 76
X -- Y	WO 2019/089884 A2 (EDITAS MEDICINE, INC. et al) 09 May 2019 (09.05.2019) entire document	74 --- 57, 69-72, 75, 76
A	WO 2019/217956 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 14 November 2019 (14.11.2019) entire document	1-4, 14-18, 37-40, 55-57, 68-72, 74-76

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 April 2021	APR 23 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/066256

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed:

      ☐ 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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1144-1152 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/066256

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 5-13, 19-36, 41-54, 58-67, 73, 77-82
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/17*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	Ｚ	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		

(32)優先日 令和2年11月18日(2020.11.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．プルロニック
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２４５９， ニュートン デヴォン テラス １２
(72)発明者 ムーン ジョン イル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２４２１， レキシントン エイプリル レイン ３１

Ｆターム（参考） 4B065 AA93X AB01 BA02 CA44
4C087 AA01 AA02 BB37 BB57 BB65 NA05 NA14 ZB26