

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-515936
(P2024-515936A)

(43)公表日 令和6年4月11日(2024.4.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	2 G 0 4 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783		
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z	
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全77頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-556950(P2023-556950)	(71)出願人	522185863
(86)(22)出願日	令和4年3月18日(2022.3.18)		メタゲノミ, インク.
(85)翻訳文提出日	令和5年10月2日(2023.10.2)		アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォル
(86)国際出願番号	PCT/US2022/021004		ニア州 エメリービル パーク・アベニュー
(87)国際公開番号	WO2022/198080		ー 1 5 4 5
(87)国際公開日	令和4年9月22日(2022.9.22)	(74)代理人	110003797
(31)優先権主張番号	63/163,510		弁理士法人清原国際特許事務所
(32)優先日	令和3年3月19日(2021.3.19)	(72)発明者	トーマス, ブライアン
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォル
(31)優先権主張番号	63/186,506		ニア州 エメリービル パーク・アベニュー
(32)優先日	令和3年5月10日(2021.5.10)		ー 1 5 4 5
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ブラウン, クリストファー
			アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォル
(31)優先権主張番号	63/241,916		ニア州 エメリービル パーク・アベニュー
			ー 1 5 4 5

最終頁に続く		最終頁に続く	
--------	--	--------	--

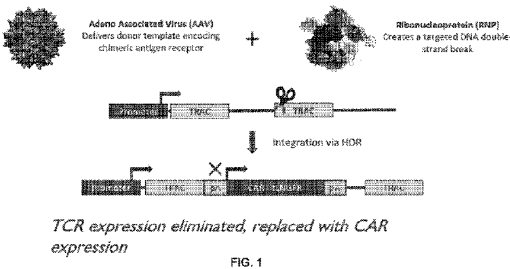
(54)【発明の名称】 C A S 酵素を用いたマルチプレックス編集

(57)【要約】

本明細書では、C a s 酵素を使用したマルチプレックス編集、又はC a s 酵素を使用したT細胞若しくは関連細胞の編集のための方法、組成物、及びシステムが記載される。

【選択図】図 1

Gene editing to create an allogeneic CAR-T cell



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内の 2 つ以上の遺伝子座を編集する方法であって、前記細胞に、

(a) クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼ複合体であって、

(i) クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼと、

(i i) 第 1 の操作されたガイド RNA であって、

前記クラス 2、クラス I I C a s エンドヌクレアーゼに結合するように構成された RNA 配列、及び

1 つ以上の標的遺伝子座の第 1 のセットにハイブリダイズするように構成されたスーパー配列を含む、第 1 の操作されたガイド RNA と、を含む、クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼ複合体、

(b) クラス 2、タイプ V C a s エンドヌクレアーゼ複合体であって、

(i) クラス 2、タイプ V C a s エンドヌクレアーゼと、

(i i) 第 2 の操作されたガイド RNA であって、

前記クラス 2、クラス V C a s エンドヌクレアーゼに結合するように構成された RNA 配列、及び

1 つ以上の標的遺伝子座の第 2 のセットにハイブリダイズするように構成されたスーパー配列を含む、第 2 の操作されたガイド RNA と、を含む、クラス 2、タイプ V C a s エンドヌクレアーゼ複合体を接触させることを含む、方法。

【請求項 2】

前記クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼが、C a s 9 エンドヌクレアーゼではない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼが、C a s 1 2 a エンドヌクレアーゼである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼが、配列番号 1 若しくは 4 のうちのいずれか 1 つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも約 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記クラス 2、タイプ V C a s エンドヌクレアーゼが、配列番号 7 又はそのバリエーションに対して少なくとも約 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 の操作されたガイド RNA 又は前記第 2 の操作されたガイド RNA が、配列番号 3、6、又は 9 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、又は 9 5 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記方法が、少なくとも約 2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、若しくはそれ以上の効率を有する前記第 1 の遺伝子座、及び／又は少なくとも約 2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、若しくはそれ以上の効率を有する前記第 2 の遺伝子座のゲノム配列を編集する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼ又は前記第 2 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、2 0 0 p m o l 以下、1 0 0 p m o l 以下、5 0 p m o l 以下、2 5 p m o l

10

20

30

40

50

以下、5 p m o l 以下、又は1 p m o l 以下の濃度で導入される、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記細胞内のオフターゲット部位が、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、0.2%未満の頻度で破壊される、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記細胞内のオフターゲット部位が、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、0.01%未満の頻度で破壊される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

1つ以上の標的遺伝子座の前記第1のセット、又は1つ以上の標的遺伝子座の前記第2のセットが、T細胞受容体（TCR）遺伝子座を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

1つ以上の標的遺伝子座の前記第1のセットにハイブリダイズするように構成された前記スペーサー配列、又は1つ以上の標的遺伝子座の前記第2のセットにハイブリダイズするように構成された前記スペーサー配列が、配列番号10～15のうちのいずれか1つ、又はその相補体に対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

1つ以上の標的遺伝子座の前記第1のセット、又は1つ以上の標的遺伝子座の前記第2のセットが、アルブミン（ALB）遺伝子座を含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

1つ以上の標的遺伝子座の前記第1のセットにハイブリダイズするように構成された前記スペーサー配列、又は1つ以上の標的遺伝子座の前記第2のセットにハイブリダイズするように構成された前記スペーサー配列が、配列番号17～19のうちのいずれか1つ、又はその相補体に対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

1つ以上の標的遺伝子座の前記第1のセット、又は1つ以上の標的遺伝子座の前記第2のセットが、核内受容体サブファミリー3グループCメンバー1（NR3C1）遺伝子座を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

1つ以上の標的遺伝子座の前記第1のセットにハイブリダイズするように構成された前記スペーサー配列、又は1つ以上の標的遺伝子座の前記第2のセットにハイブリダイズするように構成された前記スペーサー配列が、配列番号16、20、21、若しくは22のうちのいずれか1つ、又はその相補体に対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記細胞に、異種の操作されたT細胞受容体分子をコードするオープンリーディングフレームを含むドナーDNA配列、1つ以上の標的遺伝子座の前記第1のセットの第1の側に位置するDNA配列を含む第1の相同アーム、及び1つ以上の標的遺伝子座の前記第1のセットの第2の側に位置するDNA配列を含む第2の相同アームを導入することを更に含む、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

編集が、インデルの挿入、未成熟終止コドン、ミスセンスコドン、フレームシフト変異、アデニン脱アミノ化、シトシン脱アミノ化、又はそれらの任意の組み合わせを含む、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

10

20

30

40

50

グルココルチコイド抵抗性の操作された T 細胞を作製する方法であって、T 細胞又はその前駆体に、

(a) T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子座を標的化する RNA ガイドエンドヌクレアーゼ複合体であって、

(i) 第 1 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼ又は前記第 1 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼをコードする DNA と、

(ii) 第 1 の操作されたガイド RNA であって、

前記第 1 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成された RNA 配列、及び

前記 TCR 遺伝子座の少なくとも一部にハイブリダイズするように構成された第 1 のスパーサー配列を含む、第 1 の操作されたガイド RNA と、を含む、TCR 遺伝子座を標的化する RNA ガイドエンドヌクレアーゼ複合体、並びに

(b) T 細胞受容体核内受容体サブファミリー 3 グループ C メンバー 1 (NR3C1) 遺伝子座を標的化する RNA ガイドエンドヌクレアーゼ複合体であって、

(i) 第 2 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼと、

(ii) 第 2 の操作されたガイド RNA であって、

前記第 2 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成された RNA 配列、及び

前記 NR3C1 遺伝子座の少なくとも一部にハイブリダイズするように構成された第 2 のスパーサー配列を含む、第 2 の操作されたガイド RNA と、を含む、T 細胞受容体 NR3C1 遺伝子座を標的化する RNA ガイドエンドヌクレアーゼ複合体を導入することを
含む、方法。

【請求項 20】

前記 TCR 遺伝子座の前記少なくとも一部が、前記 T 細胞遺伝子座内にある、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記細胞に、(b) 異種の操作された T 細胞受容体分子をコードするオープンリーディングフレームを含むドナー DNA 配列、前記 TCR 遺伝子座内の、前記標的配列の第 1 の側に位置する DNA 配列を含む第 1 の相同アーム、及び前記第 2 の標的配列の第 2 の側に位置する DNA 配列を含む第 2 の相同アームを導入することを更に含む、請求項 19 又は 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記第 1 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼ又は前記第 2 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、クラス 2、タイプ II、又はクラス 2、タイプ V Cas エンドヌクレアーゼを含む、請求項 19～21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記第 1 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、前記クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼを含み、前記第 2 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、前記クラス 2、タイプ V Cas エンドヌクレアーゼを含む、請求項 19～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記第 2 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、前記クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼを含み、前記第 1 の RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、前記クラス 2、タイプ V Cas エンドヌクレアーゼを含む、請求項 19～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記異種の操作された T 細胞受容体が、CAR 分子である、請求項 19～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記 T 細胞受容体遺伝子座の前記少なくとも一部が、T 細胞受容体アルファ定常 (TR

10

20

30

40

50

A C) 遺伝子座又は T 細胞受容体ベータ定常 (T R B C) 遺伝子座である、請求項 19 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記相同アームが、前記 T 細胞受容体遺伝子座の前記少なくとも一部に近位の前記 T C R 遺伝子座内に、イントロン領域又はエクソン領域を含む、請求項 19 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記 T 細胞受容体遺伝子座の前記少なくとも一部が、T R A C の第 1 又は第 3 のエクソンである、請求項 19 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記方法が、少なくとも約 25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又はそれ以上の効率で、前記 T C R 遺伝子座及び前記 N R 3 C 1 遺伝子座のゲノム配列を破壊する、請求項 19 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記効率が、前記 T C R 遺伝子座及び N R 3 C 1 遺伝子座から発現されたタンパク質に対するフローサイトメトリーによって決定される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記 N R 3 C 1 遺伝子座の前記少なくとも一部が、エクソン 2 又はエクソン 3 である、請求項 19 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記方法が、少なくとも約 25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、又はそれ以上の効率で、前記 C A R 分子に対して陽性、かつ N R 3 C 1 に対して陰性の細胞を産生する、請求項 19 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

(a) ~ (c) を前記 T 細胞又はその前駆体に同時に導入することを含む、請求項 19 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記第 1 の R N A ガイドエンドヌクレアーゼ又は前記第 2 の R N A ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 1、4、又は 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 19 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記第 1 の操作されたガイド R N A 又は前記第 2 の操作されたガイド R N A が、配列番号 3、6、又は 9 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、又は 95 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 19 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記第 1 の R N A ガイドエンドヌクレアーゼ又は前記第 2 の R N A ガイドエンドヌクレアーゼが、100 p m o l 以下、50 p m o l 以下、25 p m o l 以下、5 p m o l 以下、又は 1 p m o l 以下の濃度で存在する、請求項 19 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記 T 細胞又はその当該前駆体が、T 細胞、造血幹細胞 (H S C)、又は末梢血単核細胞 (P B M C) を含む、請求項 19 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記第 2 のスパーサー配列が、配列番号 16、20、21、若しくは 22 のうちのいずれか 1 つ、又はその相補体に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、又は 95 % の配

10

20

30

40

50

列同一性を有する配列を含む、請求項 19～37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記第 1 又は前記第 2 のスペーサー配列が、少なくとも約 19～24 個のヌクレオチド、少なくとも約 19 個のヌクレオチド、少なくとも約 20 個のヌクレオチド、少なくとも約 22 個のヌクレオチド、又は少なくとも約 24 個のヌクレオチドを含む、請求項 19～38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記ドナー DNA 配列が、ウイルスベクター中に送達される、請求項 19～38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記ウイルスベクターが、AAV ベクター又は AAV-6 ベクターである、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

グルココルチコイド抵抗性 T 細胞の集団であって、

(a) TCR 遺伝子座内の配列番号 10～15 のうちのいずれか 1 つのハイブリダイゼーション領域の 100、75、50、25、又は 10 ヌクレオチド内の異種配列、

(b) インデルを含む NR3C1 遺伝子座を含む、グルココルチコイド抵抗性 T 細胞の集団。

【請求項 43】

前記異種配列が、インデルである、請求項 42 に記載のグルココルチコイド抵抗性 T 細胞の集団。

【請求項 44】

前記異種配列が、異種 T 細胞受容体又は CAR 分子をコードするヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームを含む、請求項 42 又は 43 に記載のグルココルチコイド抵抗性 T 細胞の集団。

【請求項 45】

前記 NR3C1 遺伝子座が、配列番号 16、20、21、又は 22 のうちのいずれか 1 つのハイブリダイゼーション領域の 100、75、50、25、又は 10 ヌクレオチド内にインデルを含む、請求項 42～44 のいずれか一項に記載のグルココルチコイド抵抗性 T 細胞の集団。

【請求項 46】

0.2%未満が、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、オフターゲット遺伝子座にインデルを有する、請求項 42～45 のいずれか一項に記載のグルココルチコイド抵抗性 T 細胞の集団。

【請求項 47】

0.01%未満が、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、オフターゲット遺伝子座にインデルを有する、請求項 43 に記載のグルココルチコイド抵抗性 T 細胞の集団。

【請求項 48】

前記細胞の集団が、染色体転座を実質的に含まない、請求項 42～47 のいずれか一項に記載のグルココルチコイド抵抗性 T 細胞の集団。

【請求項 49】

細胞内の 2 つ以上の遺伝子座を編集する方法であって、前記細胞に、

(a) 第 1 の Cas エンドヌクレアーゼ複合体であって、

(i) 第 1 の Cas エンドヌクレアーゼと、

(ii) 1 つ以上の操作されたガイド RNA であって、

前記クラス 2、クラス II Cas エンドヌクレアーゼに結合するように構成された RNA 配列、及び

第 1 の標的配列にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、1 つ以上の操作されたガイド RNA と、を含む、第 1 の Cas エンドヌクレアーゼ複合体、

10

20

30

40

50

(b) 第2のCasエンドヌクレアーゼ複合体であって、

(i) 第2のCasエンドヌクレアーゼと、

(ii) 1つ以上の操作されたガイドRNAであって、

前記クラス2、クラスII Casエンドヌクレアーゼに結合するように構成されたRNA配列、及び

第2の標的配列にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、1つ以上の操作されたガイドRNAと、を含む、第2のCasエンドヌクレアーゼ複合体を接触させることを含む、方法。

【請求項50】

前記細胞に、

(c) 第1の導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム、前記第1の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む5'相同アーム、及び前記第1の標的配列の3'側に位置するDNA配列を含む3'相同アームを含む、第1のドナーDNA配列、並びに

(d) 第2の導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム、前記第2の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む5'相同アーム、及び前記第2の標的配列の3'側に位置するDNA配列を含む3'相同アームを含む、第2のドナーDNA配列を導入することを更に含む、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記第1の導入遺伝子及び前記第2の導入遺伝子が、異なっている、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記第1の標的配列又は前記第2の標的配列が、T細胞受容体遺伝子座、TRAC、TRBC、NR3C1、若しくはAAVS1遺伝子座、又はそれらの任意の組み合わせ内の標的配列である、請求項50～51のいずれか一項に記載の方法。

【請求項53】

前記第1又は第2の導入遺伝子が、GRのアルファ、ベータ、アルファ-D3、若しくはベータ-D3アイソフォーム、CAR分子、短縮型低親和性神経成長因子受容体(tLNGFR)配列、上皮成長因子受容体の短縮型(tEGFR)、GFPコード配列、又はそれらの任意の組み合わせである、請求項50～52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項54】

前記第1の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む前記5'相同アーム、又は前記第2の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む前記5'相同アームが、配列番号42又は23を含む、請求項50～53のいずれか一項に記載の方法。

【請求項55】

前記第1の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む前記3'相同アーム、又は前記第2の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む前記3'相同アームが、配列番号43又は24を含む、請求項50～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

前記第1又は前記第2のクラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼが、配列番号1若しくは4のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を含む、請求項49～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項57】

前記第1の操作されたガイドRNA又は前記第2の操作されたガイドRNAが、配列番号3、6、又は9のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する配列を含む、請求項49～56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項58】

前記第1の標的配列にハイブリダイズするように構成された前記スペーサー配列、又は

10

20

30

40

50

前記第 2 の標的配列にハイブリダイズするように構成された前記スペーサー配列が、配列番号 16、20、21、22、若しくは 41 のうちのいずれか 1 つ、又はその相補体に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、又は 95 % の配列同一性を有する、請求項 49 ~ 57 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

前記第 1 又は前記第 2 のエンドヌクレアーゼが、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼ、若しくはクラス 2、タイプ V Cas エンドヌクレアーゼ、又はそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 49 ~ 58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

配列番号 63 ~ 65 のうちのいずれか 1 つの配列、又はそれに対して少なくとも約 75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有する配列を含む、単離された核酸。

10

【請求項 61】

請求項 60 に記載の単離された核酸を含む、細胞。

【請求項 62】

前記細胞が、T 細胞又はその前駆体である、請求項 61 に記載の細胞。

【請求項 63】

前記 T 細胞又はその前駆体が、T 細胞、造血幹細胞 (HSC)、又は末梢血単核細胞 (PBMC) を含む、請求項 62 に記載の細胞。

20

【請求項 64】

請求項 60 に記載の単離された核酸の配列を含む、ベクター。

【請求項 65】

前記ベクターが、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、請求項 64 に記載のベクター。

【請求項 66】

前記 AAV ベクターが、AAV-6 血清型ベクターである、請求項 65 に記載のベクター。

【請求項 67】

配列番号 23、24、42、又は 43 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % の配列同一性を有する配列を含む、ベクター。

30

【請求項 68】

配列番号 23、24、42、又は 43 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも約 75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % の配列同一性を有する前記配列が隣接した導入遺伝子を更に含む、請求項 67 に記載のベクター。

【請求項 69】

前記導入遺伝子が、GR のアルファ、ベータ、アルファ-D3、若しくはベータ-D3 アイソフォーム、CAR 分子、短縮型低親和性神経成長因子受容体 (tLNGFR) 配列、上皮成長因子受容体の短縮型 (tEGFR)、GFP コード配列、又はそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 68 に記載のベクター。

40

【請求項 70】

配列番号 63 の tEGFR コード配列、又はそれに対して 75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、若しくは 99 % の配列同一性を有するバリエーションを含む、請求項 67 又は 68 に記載のベクター。

【請求項 71】

配列番号 64 の tLNGFR コード配列、又はそれに対して 75 %、80 %、85 %、

50

86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するバリエーションを含む、請求項67又は68に記載のベクター。

【請求項72】

配列番号63のMNDプロモーター、又はそれに対して75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するバリエーションを含む、請求項67又は68に記載のベクター。

【請求項73】

配列番号64のMSCVプロモーター、又はそれに対して75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するバリエーションを含む、請求項67又は68に記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2021年3月19日出願された「MULTIPLEX EDITING WITH CAS ENZYMES」と題する、米国仮特許出願第63/163,510号、2021年5月10日出願された「MULTIPLEX EDITING WITH CAS ENZYMES」と題する、米国仮特許出願第63/186,506号、及び2021年9月8日出願された「MULTIPLEX EDITING WITH CAS ENZYMES」と題する、米国仮特許出願第63/241,916号の利益を主張し、これらの各々は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含有し、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2022年3月17日に作成された当該ASCIIコピーは、55921-719-601-SL.txtと名付けられ、70,612バイトのサイズである。

【背景技術】

【0003】

Cas酵素は、それらの関連するクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リポート(CRISPR)ガイドリボ核酸(RNA)と共に、原核生物の免疫システムの広範(細菌の約45%、古細菌の約84%)な成分であるようであり、CRISPR-RNAガイド核酸切断による感染性ウイルス及びプラスミドなどの非自己核酸からこうした微生物を保護するのに役立つ。CRISPR RNAエレメントをコードするデオキシリボ核酸(DNA)エレメントは、構造及び長さが比較的保存され得るが、それらのCRISPR関連(Cas)タンパク質は、高度に多様であり、非常に様々な核酸相互作用ドメインを含有する。CRISPR DNAエレメントは、早くも1987年に観察されているが、CRISPR/Cas複合体のプログラム可能なエンドヌクレアーゼ切断能力は、比較的最近でしか認識されておらず、多様なDNA操作及び遺伝子編集用途における組換えCRISPR/Casシステムの使用につながっている。

【発明の概要】

【0004】

一部の態様では、本開示は、細胞内の2つ以上の遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a)クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼ複合体であって、(i)クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼと、(ii)第1の操作されたガイドRNAであって、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼに結合するように構成されたRNA配列、及び1つ以上の標的遺伝子座の第1のセットにハイブ

リダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、第1の操作されたガイドRNAと、を含む、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼ複合体、(b) クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼ複合体であって、(i) クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼと、(ii) 第2の操作されたガイドRNAであって、クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼに結合するように構成されたRNA配列、及び1つ以上の標的遺伝子座の第2のセットにハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、第2の操作されたガイドRNAと、を含む、クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼ複合体を接触させることを含む。一部の実施形態では、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、Cas 9 エンドヌクレアーゼではない。一部の実施形態では、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、Cas 12a エンドヌクレアーゼである。一部の実施形態では、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号1若しくは4のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号7又はそのバリエーションに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1の操作されたガイドRNA又は当該第2の操作されたガイドRNAは、配列番号3、6、又は9のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該方法は、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、若しくはそれ以上の効率を有する当該第1の遺伝子座、及び／又は少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、若しくはそれ以上の効率を有する当該第2の遺伝子座のゲノム配列を編集する。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、200 pmol以下、100 pmol以下、50 pmol以下、25 pmol以下、5 pmol以下、又は1 pmol以下の濃度で導入される。一部の実施形態では、当該細胞内のオフターゲット部位は、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、0.2%未満の頻度で破壊される。一部の実施形態では、当該細胞内のオフターゲット部位は、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、0.01%未満の頻度で破壊される。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセット、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットは、T細胞受容体(TCR)遺伝子座を含む。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセットにハイブリダイズするように構成された当該スパーサー配列、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットにハイブリダイズするように構成された当該スパーサー配列は、配列番号10~15のうちのいずれか1つ、その相補体、又はその逆相補体に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセット、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットは、アルブミン(ALB)遺伝子座を含む。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセットにハイブリダイズするように構成された当該スパーサー配列、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットにハイブリダイズするように構成された当該スパーサー配列は、配列番号17~19のうちのいずれか1つ、その相補体、又はその逆相補体に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセット、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットは、核内受容体サブファミリー3グループCメンバー1(NR3C1)遺伝子座を含む。一

10

20

30

40

50

部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセットにハイブリダイズするように構成された当該スパーサー配列、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットにハイブリダイズするように構成された当該スパーサー配列は、配列番号16、20、21、若しくは22のうちのいずれか1つ、その相補体、又はその逆相補体に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、方法は、当該細胞に、異種の操作されたT細胞受容体分子をコードするオープンリーディングフレームを含むドナーDNA配列、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセットの第1の側に位置するDNA配列を含む第1の相同アーム、及び1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセットの第2の側に位置するDNA配列を含む第2の相同アームを導入することを更に含む。一部の実施形態では、編集は、インデルの挿入、未成熟終止コドン、ミスセンスコドン、フレームシフト変異、アデニン脱アミノ化、シトシン脱アミノ化、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0005】

一部の態様では、本開示は、グルココルチコイド抵抗性の操作されたT細胞を作製する方法を提供し、方法は、T細胞又はその前駆体に、(a) T細胞受容体(TCR)遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体であって、(i) 第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼをコードするDNAと、(ii) 第1の操作されたガイドRNAであって、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されたRNA配列、及び当該TCR遺伝子座の少なくとも一部にハイブリダイズするように構成された第1のスパーサー配列を含む、第1の操作されたガイドRNAと、を含む、TCR遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体、並びに(b) T細胞受容体核内受容体サブファミリー3グループCメンバー1(NR3C1)遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体であって、(i) 第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼと、(ii) 第2の操作されたガイドRNAであって、当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されたRNA配列、及び当該NR3C1遺伝子座の少なくとも一部にハイブリダイズするように構成された第2のスパーサー配列を含む、第2の操作されたガイドRNAと、を含む、T細胞受容体NR3C1遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体を導入することを更に含む。一部の実施形態では、当該TCR遺伝子座の当該少なくとも一部は、当該T細胞遺伝子座内にある。一部の実施形態では、方法は、当該細胞に、(b) 異種の操作されたT細胞受容体分子をコードするオープンリーディングフレームを含むドナーDNA配列、当該TCR遺伝子座内の、当該標的配列の第1の側に位置するDNA配列を含む第1の相同アーム、及び当該第2の標的配列の第2の側に位置するDNA配列を含む第2の相同アームを導入することを更に含む。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII、又はクラス2、タイプV Casエンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼを含み、当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプV Casエンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼを含み、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプV Casエンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、当該異種の操作されたT細胞受容体は、CAR分子である。一部の実施形態では、当該T細胞受容体遺伝子座の当該少なくとも一部は、T細胞受容体アルファ定常(TRAC)遺伝子座又はT細胞受容体ベータ定常(TRBC)遺伝子座である。一部の実施形態では、当該相同アームは、当該T細胞受容体遺伝子座の当該少なくとも一部に近位の当該TCR遺伝子座内に、イントロン領域又はエクソン領域を含む。一部の実施形態では、当該T細胞受容体遺伝子座の当該少なくとも一部は、TRACの第1又は第3のエクソンである。一部の実施形態では、当該方法は、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50

20

30

40

50

%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又はそれ以上の効率で、当該TCR遺伝子座及び当該NR3C1遺伝子座のゲノム配列を破壊する。一部の実施形態では、当該効率は、当該TCR遺伝子座及びNR3C1遺伝子座から発現されたタンパク質に対するフローサイトメトリーによって決定される。一部の実施形態では、当該NR3C1遺伝子座の当該少なくとも一部は、エクソン2又はエクソン3である。一部の実施形態では、当該方法は、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又はそれ以上の効率で、CAR分子に対して陽性、かつNR3C1に対して陰性の細胞を産生する。一部の実施形態では、方法は、(a)～(c)を当該T細胞又はその前駆体に同時に導入することを更に含む。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号1、4、若しくは7のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1の操作されたガイドRNA又は当該第2の操作されたガイドRNAは、配列番号3、6、若しくは9のうちのいずれか1つ、その相補体、又はその逆相補体に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、100 pmol以下、50 pmol以下、25 pmol以下、5 pmol以下、又は1 pmol以下の濃度で存在する。一部の実施形態では、当該T細胞又はその当該前駆体は、T細胞、造血幹細胞(HSC)、又は末梢血単核細胞(PBMC)を含む。一部の実施形態では、当該第2のスペーサー配列は、配列番号16、20、21、若しくは22のうちのいずれか1つ、その相補体、又はその逆相補体に対して少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1又は当該第2のスペーサー配列は、少なくとも約19～24個のヌクレオチド、少なくとも約19個のヌクレオチド、少なくとも約20個のヌクレオチド、少なくとも約22個のヌクレオチド、又は少なくとも約24個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、当該ドナーDNA配列は、ウイルスベクター中で送達される。一部の実施形態では、当該ウイルスベクターは、AAVベクター又はAAV-6ベクターである。

10

20

30

40

50

【0006】

一部の態様では、本開示は、(a) TCR遺伝子座内の配列番号10～15のうちのいずれか1つのハイブリダイゼーション領域の100、75、50、25、又は10ヌクレオチド内の異種配列を含む、グルココルチコイド抵抗性T細胞又はその前駆体の集団を提供する。一部の実施形態では、T細胞又はその前駆体は、(b) インデルを含むNR3C1遺伝子座を更に含む。一部の実施形態では、当該異種配列は、インデルである。一部の実施形態では、当該異種配列は、異種T細胞受容体又はCAR分子をコードするヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームを含む。一部の実施形態では、当該NR3C1遺伝子座は、配列番号16、20、21、又は22のうちのいずれか1つのハイブリダイゼーション領域の100、75、50、25、又は10ヌクレオチド内のインデルを含む。一部の実施形態では、当該細胞の0.2%未満が、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、オフターゲット遺伝子座にインデルを有する。一部の実施形態では、当該細胞の0.01%未満が、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、オフターゲット遺伝子座にインデルを有する。一部の実施形態では、当該細胞の集団は、染色体転座を実質的に含まない。

【0007】

一部の態様では、本開示は、細胞内の2つ以上の遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a) 第1のCasエンドヌクレアーゼ複合体であって、(i) 第1

の Cas エンドヌクレアーゼと、(i i) 1つ以上の操作されたガイド RNA であって、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼに結合するように構成された RNA 配列、及び第 1 の標的配列にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、1つ以上の操作されたガイド RNA と、を含む、第 1 の Cas エンドヌクレアーゼ複合体、(b) 第 2 の Cas エンドヌクレアーゼ複合体であって、(i) 第 2 の Cas エンドヌクレアーゼと、(i i) 1つ以上の操作されたガイド RNA であって、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼに結合するように構成された RNA 配列、及び第 2 の標的配列にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、1つ以上の操作されたガイド RNA と、を含む、第 2 の Cas エンドヌクレアーゼ複合体を接触させることを含む。一部の実施形態では、方法は、当該細胞に、(c) 第 1 の導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム、当該第 1 の標的配列の 5' 側に位置する DNA 配列を含む 5' 相同アーム、及び当該第 1 の標的配列の 3' 側に位置する DNA 配列を含む 3' 相同アームを含む、第 1 のドナー DNA 配列、並びに (d) 第 2 の導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム、当該第 2 の標的配列の 5' 側に位置する DNA 配列を含む 5' 相同アーム、及び当該第 2 の標的配列の 3' 側に位置する DNA 配列を含む 3' 相同アームを含む、第 2 のドナー DNA 配列を導入することを更に含む。一部の実施形態では、当該第 1 の導入遺伝子及び当該第 2 の導入遺伝子は、異なっている。一部の実施形態では、当該第 1 の標的配列又は当該第 2 の標的配列は、T 細胞受容体遺伝子座、TRAC、TRBC、NR3C1、若しくは AAVS1 遺伝子座、又はそれらの任意の組み合わせ内の標的配列である。一部の実施形態では、当該第 1 又は第 2 の導入遺伝子は、GR のアルファ、ベータ、アルファ-D3、若しくはベータ-D3 アイソフォーム、CAR 分子、短縮型低親和性神経成長因子受容体 (tLNGFR) 配列、上皮成長因子受容体の短縮型 (tEGFR)、GFP コード配列、又はそれらの任意の組み合わせである。一部の実施形態では、当該第 1 の標的配列の 5' 側に位置する DNA 配列を含む当該 5' 相同アーム、又は当該第 2 の標的配列の 5' 側に位置する DNA 配列を含む当該 5' 相同アームは、配列番号 42 若しくは 23、又はそれに対して少なくとも 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは 99% の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第 1 の標的配列の 5' 側に位置する DNA 配列を含む当該 3' 相同アーム、又は当該第 2 の標的配列の 5' 側に位置する DNA 配列を含む当該 3' 相同アームは、配列番号 43 若しくは 24、又はそれに対して少なくとも 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは 99% の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第 1 又は当該第 2 のクラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号 1 若しくは 4 のうちのいずれか 1 つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも約 75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第 1 の操作されたガイド RNA 又は当該第 2 の操作されたガイド RNA は、配列番号 3、6、若しくは 9 のうちのいずれか 1 つ、その相補体、又はその逆相補体に対して少なくとも 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第 1 の標的配列にハイブリダイズするように構成された当該スペーサー配列、又は当該第 2 の標的配列にハイブリダイズするように構成された当該スペーサー配列は、配列番号 16、20、21、22、若しくは 41 のうちのいずれか 1 つ、又はその相補体、その相補体、又はその逆相補体に対して少なくとも 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の配列同一性を有する。一部の実施形態では、当該第 1 又は当該第 2 のエンドヌクレアーゼは、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼ、若しくはクラス 2、タイプ V Cas エンドヌクレアーゼ、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

10

20

30

40

50

【0008】

一部の態様では、本開示は、配列番号63～65のうちのいずれか1つの配列、又はそれに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有する配列を含む、単離された核酸を提供する。

【0009】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される核酸配列のうちのいずれか、その相補体、又はその逆相補体を含む単離された核酸を提供する。一部の実施形態では、単離された核酸は、ガイドRNAである。

【0010】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される核酸のうちのいずれかを含む細胞を提供する。一部の実施形態では、当該細胞は、T細胞又はその前駆体である。一部の実施形態では、当該T細胞又はその前駆体は、T細胞、造血幹細胞（HSC）、又は末梢血単核細胞（PBMC）を含む。

【0011】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載される核酸のうちのいずれかを含むベクターを提供する。一部の実施形態では、当該ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。一部の実施形態では、当該AAVベクターは、AAV-6血清型ベクターである。

【0012】

一部の態様では、本開示は、配列番号23、24、42、又は43のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する配列を含む、ベクターを提供する。一部の実施形態では、ベクターは、配列番号23、24、42、又は43のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する当該配列が隣接した導入遺伝子を更に含む。一部の実施形態では、当該導入遺伝子は、GRのアルファ、ベータ、アルファ-D3、若しくはベータ-D3アイソフォーム、CAR分子、短縮型低親和性神経成長因子受容体（tLNGFR）配列、上皮成長因子受容体の短縮型（tEGFR）、GFPコード配列、又はそれらの任意の組み合わせを含む。一部の実施形態では、ベクターは、配列番号63のtEGFRコード配列、又はそれに対して75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するバリエーションを更に含む。一部の実施形態では、ベクターは、配列番号64のtLNGFRコード配列、又はそれに対して75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するバリエーションを更に含む。一部の実施形態では、ベクターは、配列番号63のMNDプロモーター、又はそれに対して75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するバリエーションを更に含む。一部の実施形態では、ベクターは、配列番号64のMSCVプロモーター、又はそれに対して75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するバリエーションを更に含む。

【0013】

一部の態様では、本開示は、細胞内の2つ以上の遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、（a）クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼ複合体であって、（i）クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼと、（ii）1つ以上の操作されたガイドRNAであって、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼに

10

20

30

40

50

結合するように構成されたRNA配列、及び1つ以上の標的遺伝子座の第1のセットにハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、1つ以上の操作されたガイドRNAと、を含むか、又はそれらをコードするポリヌクレオチドを含む、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼ複合体を接触させるか、又は導入することを含む。一部の実施形態では、方法は、当該細胞に、(b) (i) クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼと、(i i) 1つ以上の操作されたガイドRNAであって、クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼに結合するように構成されたRNA配列、及び1つ以上の標的遺伝子座の第2のセットにハイブリダイズするように構成されたスパーサー配列を含む、1つ以上の操作されたガイドRNAと、を含むクラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼ複合体を接触させるか、又は導入することを含む。一部の実施形態では、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、Cas 9 エンドヌクレアーゼではない。一部の実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、Cas 12 a エンドヌクレアーゼである。一部の実施形態では、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号1若しくは4のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号7又はそのバリエーションに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1の操作されたガイドRNA又は当該第2の操作されたガイドRNAは、配列番号3、6、若しくは9のうちのいずれか1つ、又はその相補体に対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該方法は、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、若しくはそれ以上の効率を有する当該第1の遺伝子座、及び／又は少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、若しくはそれ以上の効率を有する当該第2の遺伝子座のゲノム配列を編集する。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、200 pmol以下、100 pmol以下、50 pmol以下、25 pmol以下、5 pmol以下、又は1 pmol以下の濃度で導入される。一部の実施形態では、当該細胞内のオフターゲット部位は、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、0.2%未満の頻度で破壊される。一部の実施形態では、当該細胞内のオフターゲット部位は、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断によって決定される場合、0.01%未満の頻度で破壊される。一部の実施形態では、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析は、HTGTSアッセイ（ハイスループット、ゲノムワイドな転座シーケンシング；例えば、Charles et al. Cell. 2011 Sep 30; 147 (1): 107-19. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.049（参照により全ての目的のために本明細書に明示的に組み込まれる）を参照のこと）、LAM-HTGTSアッセイ（線形増幅媒介ハイスループットゲノムワイドシーケンシング；例えば、Hu et al. Nat Protoc. 2016. 11 (5): 853-71. doi: 10.1038/nprot.2016.043（参照により全ての目的のために本明細書に明示的に組み込まれる）を参照のこと）、又はDigenome-Seqアッセイ（インビトロCas-消化全ゲノムシーケンシング；例えば、Kim et al. Nat Methods. 2015. 12 (3): 237-43. doi: 10.1038/nmeth.3284（参照により全ての目的のために本明細書に明示的に組み込まれる）を参照のこと）を含む。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセット、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットは、T細胞受容体（TCR）遺伝子座を含む。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセットにハイブリダイズするように構成された当該

10

20

30

40

50

スパーサー配列、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットにハイブリダイズするように構成された当該スパーサー配列は、配列番号10～15のうちのいずれか1つ、又はその相補体に対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセット、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットは、核内受容体サブファミリー3グループCメンバー1 (NR3C1) 遺伝子座を含む。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセットにハイブリダイズするように構成された当該スパーサー配列、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットにハイブリダイズするように構成された当該スパーサー配列は、配列番号16、20、21、若しくは22のうちのいずれか1つ、又はその相補体に対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、方法は、当該細胞に、異種の操作されたT細胞受容体分子をコードするオープンリーディングフレームを含むドナーDNA配列、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセットの第1の側に位置するDNA配列を含む第1の相同アーム、及び1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセットの第2の側に位置するDNA配列を含む第2の相同アームを導入することを更に含む。一部の実施形態では、編集は、インデルの挿入、未成熟終止コドン、ミスセンスコドン、フレームシフト変異、アデニン脱アミノ化、シトシン脱アミノ化、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0014】

一部の態様では、本開示は、グルココルチコイド抵抗性の操作されたT細胞を作製する方法を提供し、方法は、T細胞又はその前駆体に、(a) T細胞受容体 (TCR) 遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体であって、(i) 第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼをコードするDNAと、(ii) 第1の操作されたガイドRNAであって、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されたRNA配列、及び当該TCR遺伝子座の少なくとも一部にハイブリダイズするように構成された第1のスパーサー配列を含む、第1の操作されたガイドRNAと、を含むか、又はそれらをコードするポリヌクレオチドを含む、TCR遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体、並びに (b) T細胞受容体核内受容体サブファミリー3グループCメンバー1 (NR3C1) 遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体であって、(i) 第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼと、(ii) 第2の操作されたガイドRNAであって、当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されたRNA配列、及び当該NR3C1遺伝子座の少なくとも一部にハイブリダイズするように構成された第2のスパーサー配列を含む、第2の操作されたガイドRNAと、を含むか、又はそれらをコードするポリヌクレオチドを含む、T細胞受容体NR3C1遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体を導入することを更に含む。一部の実施形態では、当該TCR遺伝子座の当該少なくとも一部は、当該T細胞遺伝子座内にある。一部の実施形態では、方法は、当該細胞に、(b) 異種の操作されたT細胞受容体分子をコードするオープンリーディングフレームを含むドナーDNA配列、当該TCR遺伝子座内の、当該標的配列の第1の側に位置するDNA配列を含む第1の相同アーム、及び当該第2の標的配列の第2の側に位置するDNA配列を含む第2の相同アームを導入することを更に含む。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII、又はクラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼを含み、当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼを含み、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、当該異種の操作されたT細胞受容体は、CAR分子である。一部の実施形態では、当該T細胞受容体遺伝子座の当該少なくとも一部は、T細胞受容体アルファ定常 (TR

20

30

40

50

A C) 遺伝子座又はT細胞受容体ベータ定常 (T R B C) 遺伝子座である。一部の実施形態では、当該相同アームは、当該T細胞受容体遺伝子座の当該少なくとも一部に近位の当該T C R 遺伝子座内に、イントロン領域又はエクソン領域を含む。一部の実施形態では、当該T細胞受容体遺伝子座の当該少なくとも一部は、T R A C の第1又は第3のエクソンである。一部の実施形態では、当該方法は、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又はそれ以上の効率で、当該T C R 遺伝子座及び当該N R 3 C 1 遺伝子座のゲノム配列を破壊する。一部の実施形態では、当該効率は、当該T C R 遺伝子座及びN R 3 C 1 遺伝子座から発現されたタンパク質に対するフローサイトメトリーによって決定される。一部の実施形態では、当該N R 3 C 1 遺伝子座の当該少なくとも一部は、エクソン2又はエクソン3である。一部の実施形態では、当該方法は、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又はそれ以上の効率で、C A R 分子に対して陽性、かつN R 3 C 1 に対して陰性の細胞を産生する。一部の実施形態では、方法は、(a) ~ (c) を当該T細胞又はその前駆体に同時に導入することを含む。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号1、4、又は7のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1の操作されたガイドRNA又は当該第2の操作されたガイドRNAは、配列番号3、6、若しくは9のうちのいずれか1つ、又はその相補体に対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、100 p m o l 以下、50 p m o l 以下、25 p m o l 以下、5 p m o l 以下、又は1 p m o l 以下の濃度で存在する。一部の実施形態では、当該T細胞又はその当該前駆体は、T細胞、造血幹細胞 (H S C)、又は末梢血単核細胞 (P B M C) を含む。一部の実施形態では、当該第2のスペーサー配列は、配列番号16、20、21、若しくは22のうちのいずれか1つ、又はその相補体に対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1又は当該第2のスペーサー配列は、少なくとも約19~24個のヌクレオチド、少なくとも約19個のヌクレオチド、少なくとも約20個のヌクレオチド、少なくとも約22個のヌクレオチド、又は少なくとも約24個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、当該ドナーDNA配列は、ウイルスベクター中で送達される。一部の実施形態では、当該ウイルスベクターは、A A V ベクター又はA A V - 6 ベクターである。

【0015】

一部の態様では、本開示は、(a) T C R 遺伝子座内の配列番号10~15のうちのいずれか1つのハイブリダイゼーション領域の100、75、50、25、若しくは10ヌクレオチド内の異種配列、又は配列番号42のハイブリダイゼーション領域の100、75、50、25、若しくは10ヌクレオチド内の異種配列を含む、T細胞の集団を提供する。一部の実施形態では、T細胞の集団は、(b) インデルを含むN R 3 C 1 遺伝子座を更に含む。一部の実施形態では、当該N R 3 C 1 遺伝子座中の当該インデルは、当該T細胞にグルコシルコイド抵抗性を付与する。当該異種配列のハイブリダイゼーション領域の100、75、50、25、又は10ヌクレオチド内の異種配列は、インデルである。一部の実施形態では、当該異種配列は、異種T細胞受容体又はC A R 分子をコードするヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームを含む。一部の実施形態では、当該N R 3 C 1 遺伝子座は、配列番号16、20、21、又は22のうちのいずれか1つのハイブリダイゼーション領域の100、75、50、25、又は10ヌクレオチド内のインデルを含む。一部の実施形態では、0.2%未満が、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、オフターゲット遺伝子座にインデルを有する。一部の実施形態では、0.01%未満が、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によ

10

20

30

40

50

って決定される場合、オフターゲット遺伝子座にインデルを有する。一部の実施形態では、当該細胞の集団は、染色体転座を実質的に含まない。

【0016】

一部の態様では、本開示は、細胞内の2つ以上の遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a)第1のCasエンドヌクレアーゼ複合体であって、(i)第1のCasエンドヌクレアーゼと、(ii)1つ以上の操作されたガイドRNAであって、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼに結合するように構成されたRNA配列、及び第1の標的配列にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、1つ以上の操作されたガイドRNAと、を含むか、又はそれらをコードするポリヌクレオチドを含む、第1のCasエンドヌクレアーゼ複合体、(b)第2のCasエンドヌクレアーゼ複合体であって、(i)第2のCasエンドヌクレアーゼと、(ii)1つ以上の操作されたガイドRNAであって、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼに結合するように構成されたRNA配列、及び第2の標的配列にハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、1つ以上の操作されたガイドRNAと、を含む、第2のCasエンドヌクレアーゼ複合体を接触させることを含む。一部の実施形態では、方法は、当該細胞に、(c)第1の導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム、当該第1の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む5'相同アーム、及び当該第1の標的配列の3'側に位置するDNA配列を含む3'相同アームを含む、第1のドナーDNA配列、並びに(d)第2の導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム、当該第2の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む5'相同アーム、及び当該第2の標的配列の3'側に位置するDNA配列を含む3'相同アームを含む、第2のドナーDNA配列を導入することを更に含む。一部の実施形態では、当該第2の導入遺伝子は、異なっている。一部の実施形態では、当該第1の標的配列又は当該第2の標的配列は、T細胞受容体遺伝子座、TRAC、TRBC、NR3C1、若しくはAAVS1遺伝子座、又はそれらの任意の組み合わせ内の標的配列である。一部の実施形態では、当該第1又は第2の導入遺伝子は、GRのアルファ、ベータ、アルファ-D3、又はベータ-D3アイソフォーム、CAR分子、又はそれらの任意の組み合わせである。一部の実施形態では、当該第1の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む当該5'相同アーム、又は当該第2の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む当該5'相同アームは、配列番号42又は23を含む。一部の実施形態では、当該第1の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む当該3'相同アーム、又は当該第2の標的配列の5'側に位置するDNA配列を含む当該3'相同アームは、配列番号43又は24を含む。一部の実施形態では、当該第1又は当該第2のクラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼは、配列番号1若しくは4のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1の操作されたガイドRNA又は当該第2の操作されたガイドRNAは、配列番号3、6、若しくは9のうちのいずれか1つ、又はその相補体に対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1の標的配列にハイブリダイズするように構成された当該スペーサー配列、又は当該第2の標的配列にハイブリダイズするように構成された当該スペーサー配列は、配列番号16、20、21、22、若しくは41のうちのいずれか1つ、又はその相補体に対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、当該第1又は当該第2のエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼ、若しくはクラス2、タイプV Casエンドヌクレアーゼ、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

【0017】

本開示の更なる態様及び利点は、以下の詳細な説明から、当業者に容易に明らかになり、ここで、本開示の例示的な実施形態のみが示され、記載される。理解されるように、本開示は、他の異なる実施形態をすることができ、そのいくつかの詳細は、全て本開示から

10

20

30

40

50

逸脱することなく、様々な明白な点において改変することができる。したがって、図面及び説明は、本質的に例示とみなされるべきであり、制限とみなされるべきではない。

【0018】

参照による組み込み

本明細書において言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、それぞれ個々の刊行物、特許、又は特許出願が、参照により組み込まれるべきことが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

本発明の新規の特徴は、添付の特許請求の範囲に特記して記載される。本発明の特徴及び利点のより良好な理解は、本発明の原理が利用される例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、及び添付の図面を参照することによって得られるだろう。

【0020】

【図1】CAR-Tドナー配列を送達するAAVベクターと組み合わせて、本明細書に記載されるCasエンドヌクレアーゼを使用して同種CAR-T細胞を産生するためのスキームを示す。

【図2】Cas9対照と共に、TRACを標的化するガイドRNAを含有するMG3-6、MG3-8、及びMG29-1 RNPによるTRACにおけるインデル形成を試験する、実施例1の実験の結果を示す。左のパネルは、次世代シーケンシング(NGS)によって測定されたインデルの形成%を示し、一方で、右のパネルは、フローサイトメトリーによって評価された細胞表現型(TCR+又はTCR-)を示す。

【図3】CAR-T配列を含有するAAVドナーベクターと組み合わせてTRACを標的化する、本明細書に記載されるRNPヌクレアーゼ複合体を使用した、標的化されたCAR-T組み込みを試験する実施例1の実験の結果を示す。CAR抗原結合ドメインの発現(y軸)と共に、TCR発現状態(TCR-又はTCR+、x軸)を示すフローサイトメトリープロットが示されている。MG3-6、MG3-8、及びMG29-1の全てについて、同様の結果が得られた。

【図4】実施例2に記載されるように、MG3-6及びMG29-1 RNP複合体の組み合わせを使用した、2つの遺伝子座(1つはTRACである)のマルチプレックス編集を示す。

【図5】実施例2に記載されるように、MG3-6及びMG29-1 RNP複合体の組み合わせを使用した、3つの遺伝子座(1つはTRACである)のマルチプレックス編集を示す。

【図6】実施例3にあるように、各部位を標的化する別々のドナーDNAへの曝露と共に異なるCas酵素を使用して、AAVS1及びTRAC遺伝子座が同時に標的化された実験の結果を示す、AAVS1遺伝子座(A)又はアガロースゲル写真(B及びC)への、GR導入遺伝子の組み込みを試験するための、実施例3にあるようなPCR実験の設計を示す。(B)は、T細胞が、GR導入遺伝子担持AAV構築物(レーン2~5)、GR導入遺伝子AAV構築物/AAVS1を標的化するSpCas9/TRACを標的化するMG3-6/CAR導入遺伝子AAV(レーン6~9)、又はGR AAV構築物/25Kの感染多重度(MOI)でAAVS1を単独で標的化するSpCas9(レーン10~13)に曝露されたいずれかの条件からのGR導入遺伝子の増幅を示す。(C)は、T細胞が、アッセイ対照(偽トランスフェクション若しくは導入遺伝子なしのCas複合体;レーン2~4)、50KのMOIでのGR AAV構築物/AAVS1を単独で標的化するSpCas9(レーン5~8)、又は100KのMOIでのGR AAV構築物/50Kの多重感染度(MOI)でAAVS1を単独で標的化するSpCas9(レーン9~12)に曝露されたいずれかの状態からのGR導入遺伝子の増幅を示す。結果は、追加のTRAC遺伝子座が標的化されたかどうかにかかわらず、同様の効率でAAVS1遺伝子座内に組み込まれたGR導入遺伝子を示す。

【図7】実施例3にあるように、各部位を標的化する別々のドナーDNAへの曝露と共に

異なる Cas 酵素を使用して、AAVS1 及び TRAC 遺伝子座が同時に標的化された、実施例 3 にあるような実験の結果を示すフローサイトメトリープロットを示す。各 GR 導入遺伝子を担持する AAV が、AAVS1 標的化 SpCas9 複合体、TRAC 標的化 MG3-6 複合体、及び CAR 担持 AAV と共に T 細胞に導入された、個々のプロット (A ~ D) が示されている。結果は、TCR ノックアウト及び CAR 組み込みが、全ての GR 導入遺伝子で同様に効率的であったこと、及び AAVS1 遺伝子座の同時標的化にもかかわらず高かったこと (51.31% ~ 61.1% の効率) を示す。

【図 8】実施例 4 にあるように、SpCas9 (「Cas9」) と共に、MG3-6、MG3-8、及び MG29-1 エンドヌクレアーゼのオフターゲット特異性を評価するために実施された、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析アッセイの結果を示す。

【図 9】活性な完全 TCR を作製するデルタ鎖、ガンマ鎖、及びイプシロン鎖の集合の図である。

【図 10】インデルを含有する標的遺伝子座における配列の割合によって評価される場合の、実施例 5 に記載されるような、一次 T 細胞におけるマルチプレックス TRAC / TRBC 編集を示す。結果は、両方の部位が同時に標的化される場合の、両方の部位での高頻度な破壊を示す。

【図 11】実施例 6 に記載される単一遺伝子ノックアウト実験に対するフローサイトメトリーによる、遺伝子編集結果を示す。TCR 及び B2M のノックアウトを評価する 4 つの表現型 (TCR-B2M-DKO、TCR-B2M+、TCR+B2M-、及び TCR+B2M+) の各々を含有する、解析された細胞の割合を示す棒グラフが示されている。このグラフは、(a) TCR 標的化条件の全てが、TCR ノックアウトを効率的にもたらし、MG3-6 TRAC6 及び MG3-6 TRBC E2 sgRNA が、最も効率的な TCR ノックアウトをもたらし、並びに (b) B2M 標的化条件の全てが、B2M ノックアウトをもたらし、B2M H1 及び B2M D2 が、最も効率的な B2M ノックアウトをもたらし、ことを示す。

【図 12】実施例 6 の B2M 及び TRAC 条件を使用するが、組み合わせて使用する、実施例 7 に記載される二重遺伝子ノックアウト実験に対するフローサイトメトリーによる、遺伝子編集結果を示す。TCR 及び B2M のノックアウトを評価する 4 つの表現型 (TCR-B2M-DKO、TCR-B2M+、TCR+B2M-、及び TCR+B2M+) の各々を含有する、解析された細胞の割合を示す棒グラフが示されている。グラフは、最も効率的な二重標的化条件が、MG29-1 B2M H1、D2、又は A3 条件と共に MG3-6 TRAC6 条件を伴う、A4、B4、及び C4 であったことを示す。最も効率的な二重標的化条件は、MG3-6 TRAC6 sgRNA 及び MG29-1 B2M D2 sgRNA を使用した B4 であるように見えた。

【図 13】実施例 6 からの B2M、TRAC、及び TRBC 条件を使用するが、組み合わせて使用する、実施例 8 に記載される三重遺伝子ノックアウト実験に対するフローサイトメトリーによる、遺伝子編集結果を示す。

【図 14】実施例 6 からの B2M、TRAC、及び TRBC 条件を使用するが、組み合わせて使用する、実施例 8 に記載される三重遺伝子ノックアウト実験に対する DNA レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 15】実施例 8 に記載される三重遺伝子ノックアウト実験に対する次世代シーケンシング (NGS) によって決定された、遺伝子編集結果の解析を示す。

【図 16】実施例 9 に記載される実験に対する、T 細胞におけるタンパク質レベルでの遺伝子編集結果を示す。実施例 9 に記載されるヌクレアーゼ、ガイド、及び AAV の組み合わせを使用して、蛍光活性化細胞選別 (FACS) によって決定される場合の、GFP / tEGFR、tLNGFR、二重標的組み込み (GFP / tLNGFR)、二重標的組み込み (tEGFR / tLNGFR)、又は TCR に対して陽性の T 細胞の割合 (%) を示す棒グラフを示す。

【図 17】実施例 10 に記載される実験についての、AAVS1 部位及び TRAC 遺伝子座に対する T 細胞における DNA レベルでの遺伝子編集結果を示す。実施例 10 に記載さ

10

20

30

40

50

れる条件を使用して、A A V S 1 遺伝子座で検出された少なくとも1つのインデルを有する次世代シーケンシング (I l l u m i n a M i S e q) によって検出された配列の割合 (インデルの%) の棒グラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明の様々な実施形態は本明細書に示され、記載されるが、このような実施形態が、例示の目的でのみ提供されることは、当業者には明らかであろう。多数の変形、変更、及び置換は、本発明から逸脱することなく、当業者にとって生じ得る。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替が用いられ得ることは、理解されるべきである。

【0022】

本明細書に開示されるいくつかの方法の実践は、別段の示唆がない限り、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクス、及び組換えDNAの技術を用いる。例えば、Sambrook and Green, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th Edition (2012)、the series Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds.), the series Methods In Enzymology (Academic Press, Inc.), PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6th Edition (R. I. Freshney, ed. (2010)) (参照により本明細書に完全に組み込まれる) を参照のこと。

【0023】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が別途明確に示さない限り、複数形も含むことが意図される。更に、用語「含むこと」、「含む」、「有すること」、「有する」、「有する」、又はそのバリエーションが、詳細な説明及び／又は特許請求の範囲のいずれかで使用される限りにおいて、かかる用語は、用語「含むこと」と類似した様式で包含的であることが意図される。

【0024】

用語「約」又は「およそ」は、当業者によって決定される特定の値についての許容可能な誤差範囲内を意味し、これは、値がどのように測定又は決定されるか、すなわち、測定システムの限界に部分的に依存する。例えば、「約」は、当該技術分野の慣行によると、1つ以上の標準偏差内を意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の最大20%、最大15%、最大10%、最大5%、又は最大1%の範囲を意味し得る。

【0025】

本明細書で使用される場合、「細胞」は概して生物学的細胞を指す。細胞は、生きている生物の基本的な構造、機能、及び／又は生物学的単位であり得る。細胞は、1つ以上の細胞を有する任意の生物を起源とし得る。いくつかの非限定的な例としては、原核細胞、真核生物の細胞、細菌細胞、古細菌細胞、単一細胞の真核生物の細胞、原虫細胞、植物由来の細胞 (例えば、植物作物、果実、野菜、穀物、大豆、トウモロコシ、トウモロコシ、小麦、種子、トマト、米、キャッサバ、サトウキビ、カボチャ、乾草、ジャガイモ、綿、大麻、タバコ、開花している植物、針葉樹、ジムノスパーム、シダ、ヒカゲノカズラ、ツノゴケ、コケ植物、コケ由来の細胞)、藻類の細胞 (例えば、ボトリオコッカス・ブラウニイ (Botryococcus braunii)、クラミドモナス・ラインハルトイ (Chlamydomonas reinhardtii)、ナンノクロロプシス・ガジタナ (Nannochloropsis gaditana)、クロレラ・ピレノイドサ (Chlorella pyrenoidosa)、サルガッサム・パテンスC. アガ

ード (*Sargassum patens* C. Agardh) など)、海藻 (例えば、ケルプ)、真菌細胞 (例えば、酵母細胞、キノコ由来の細胞)、動物細胞、脊椎動物 (例えば、フルーツフライ、クニダリアン、エキノデルム、線虫など) 由来の細胞、脊椎動物 (例えば、魚、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類) 由来の細胞、哺乳類 (例えば、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、げっ歯類、ラット、マウス、非ヒト霊長類、ヒトなど) 由来の細胞などが挙げられる。細胞は、天然の生物に由来するものではない場合もある (例えば、細胞は、合成的に作製されてもよく、時には人工細胞と呼ばれることがある)。

【0026】

本明細書で使用される場合、用語「ヌクレオチド」は、概して、塩基-糖-リン酸の組み合わせを指す。ヌクレオチドは、合成ヌクレオチドを含んでもよい。ヌクレオチドは、核酸配列 (例えば、デオキシリボ核酸 (DNA) 及びリボ核酸 (RNA)) の単量体単位であってもよい。ヌクレオチドという用語は、リボヌクレオシド三リン酸アデノシン三リン酸 (ATP)、ウリジン三リン酸 (UTP)、シトシン三リン酸 (CTP)、グアノシン三リン酸 (GTP) 及びデオキシリボヌクレオシド三リン酸、例えば、dATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTP、又はその誘導体を含み得る。かかる誘導体としては、例えば、 $[\alpha S]$ dATP、 γ -デアザ-dGTP 及び γ -デアザ-dATP、並びにそれらを含む核酸分子にヌクレアーゼ耐性を付与するヌクレオチド誘導体を挙げることができる。本明細書で使用される場合、ヌクレオチドという用語は、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (ddNTP) 及びその誘導体を指す場合がある。ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸の例としては、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddITP、及び ddTTP が挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、光学的に検出可能な部分 (例えば、フルオロフォア) を含む部分を使用するなど、非標識又は検出可能に標識されてもよい。標識はまた、量子ドットを用いて行われてもよい。検出可能な標識としては、例えば、放射性同位元素、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、及び酵素標識を挙げることができる。ヌクレオチドの蛍光標識は、フルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン (FAM)、2'-7'-ジメトキシ-4'-5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン (JOE)、ローダミン、6-カルボキシローダミン (R6G)、N, N, N', N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン (TAMRA)、6-カルボキシ-X-ローダミン (ROX)、4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ) 安息香酸 (DABCYL)、カスケードブルー、オレゴングリーン、テキサスレッド、シアニン及び 5-(2'-アミノエチル) アミノナフタレン-1-スルホン酸 (EDANS) を含むが、これらに限定されない。蛍光標識されたヌクレオチドの具体的な例としては、Perkin Elmer、Foster City、Calif から入手可能な $[R6G]$ dUTP、 $[TAMRA]$ dUTP、 $[R110]$ dCTP、 $[R6G]$ dCTP、 $[TAMRA]$ dCTP、 $[JOE]$ ddATP、 $[R6G]$ ddATP、 $[FAM]$ ddCTP、 $[R110]$ ddCTP、 $[TAMRA]$ ddGTP、 $[ROX]$ ddTTP、 $[dR6G]$ ddATP、 $[dR110]$ ddCTP、 $[dTAMRA]$ ddGTP、及び $[dROX]$ ddTTP; Amersham、Arlington Heights、Ill. から入手可能なフルオロ結合デオキシヌクレオチド、フルオロ結合 Cy3-dCTP、フルオロ結合 Cy5-dCTP、フルオロ結合フルオロ X-dCTP、フルオロ結合 Cy3-dUTP、及びフルオロ結合 Cy5-dUTP; Boehringer Mannheim、Indianapolis、Ind. から入手可能なフルオレセイン-15-dATP、フルオレセイン-12-dUTP、テトラメチル-ローダミン-6-dUTP、IR770-9-dATP、フルオレセイン-12-ddUTP、フルオレセイン-12-UTP、及びフルオレセイン-15-2'-dATP; 並びに Molecular Probes、Eugene、Oreg から入手可能な染色体標識ヌクレオチド、BODIPY-FL-14-UTP、BODIPY-FL-4-UTP、BODIPY-TMR-14-UTP、BODIPY-TMR-14-dUTP、BODIPY-TR-14-UTP、BODIPY-TR-14-dUTP、カスケードブルー-7-UTP、カスケードブルー-7-dUTP、フルオレセイン-12-UTP、フルオレセイン-

10

20

30

40

50

12-dUTP、オレゴングリーン488-5-dUTP、ローダミンググリーン-5-UTP、ローダミンググリーン-5-dUTP、テトラメチルローダミン-6-UTP、テトラメチルローダミン-6-dUTP、テキサスレッド-5-UTP、テキサスレッド-5-dUTP、及びテキサスレッド-12-dUTPを挙げることができる。ヌクレオチドはまた、化学修飾によって標識又は印付けられてもよい。化学修飾された単一ヌクレオチドは、ビオチン-dNTPであり得る。ビオチン化dNTPのいくつかの非限定的な例としては、ビオチン-dATP（例えば、ビオ-N6-ddATP、ビオチン-14-dATP）、ビオチン-dCTP（例えば、ビオチン-11-dCTP、ビオチン-14-dCTP）、及びビオチン-dUTP（例えば、ビオチン-11-dUTP、ビオチン-16-dUTP、ビオチン-20-dUTP）が挙げられる。ヌクレオチドは、ヌクレオチドアナログを含んでもよい。一部の実施形態では、ヌクレオチドアナログは、ヌクレオチドのある特定の化学特性を変化させるが、ヌクレオチドアナログがその意図された機能（例えば、RNA又はDNA中の他のヌクレオチドへのハイブリダイゼーション）を行う能力を保持するように、任意の位置で修飾される天然ヌクレオチドの構造を含んでもよい。誘導体化され得るヌクレオチドの位置の例としては、5位、例えば、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-プロモウリジン、5-プロピンウリジン、5-プロペニルウリジンなど；6位、例えば、6-(2-アミノ)プロピルウリジン；アデノシン及び／又はグアノシンについては8位、例えば、8-プロモグアノシン、8-クロログアノシン、8-フルオログアノシンなどが挙げられる。ヌクレオチドアナログはまた、デアザヌクレオチド、例えば、7-デアザ-アデノシン：O-及びN-修飾（例えば、アルキル化、例えば、N6-メチルアデノシン、又は別の方法で適切に修飾された）ヌクレオチド、並びにHerdewijn, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 2000 Aug. 10 (4): 297-310に記載されるものなどの他の複素環修飾されたヌクレオチドアナログを含む。ヌクレオチドアナログはまた、ヌクレオチドの糖部分に対する修飾を含んでもよい。例えば、2' OH基は、H、OR、R、F、Cl、Br、I、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、COOR、又はORから選択される基によって置き換えられてもよく、式中、Rは、置換又は非置換のC₁-C₆アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールなどである。他の可能な修飾としては、米国特許第5,858,988号及び同第6,291,438号に記載されるものが挙げられる。誘導体化され得るヌクレオチドの位置の例としては、5位、例えば、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-プロモウリジン、5-プロピンウリジン、5-プロペニルウリジンなど；6位、例えば、6-(2-アミノ)プロピルウリジン；アデノシン及び／又はグアノシンについては8位、例えば、8-プロモグアノシン、8-クロログアノシン、8-フルオログアノシンなどが挙げられる。ヌクレオチドアナログはまた、デアザヌクレオチド、例えば、7-デアザ-アデノシン：O-及びN-修飾（例えば、アルキル化、例えば、N6-メチルアデノシン、又は別の方法で適切に修飾された）ヌクレオチド、並びにHerdewijn, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 2000 Aug. 10 (4): 297-310に記載されるものなどの他の複素環修飾されたヌクレオチドアナログを含む。ヌクレオチドアナログはまた、ヌクレオチドの糖部分に対する修飾を含んでもよい。例えば、2' OH基は、H、OR、R、F、Cl、Br、I、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、COOR、又はORから選択される基によって置き換えられてもよく、式中、Rは、置換又は非置換のC₁-C₆アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールなどである。他の可能な修飾としては、米国特許第5,858,988号及び同第6,291,438号に記載されるものが挙げられる。

【0027】

用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、及び「核酸」は、概して、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又はそのアナログのいずれかを、一本鎖、二本鎖、又は多本鎖の形態で、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指すように互換的に使用される。ポリヌクレオチドは、細胞にとって外因性又は内因性であってもよい。ポリヌクレオチドは、無細胞環境に存在してもよい。ポリヌクレオチドは、遺伝子

10

20

30

40

50

又はその断片であってもよい。ポリヌクレオチドは、DNAであってもよい。ポリヌクレオチドは、RNAであってもよい。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有してもよく、任意の機能を発揮してもよい。ポリヌクレオチドは、1つ以上のアナログ（例えば、改変された骨格、糖、又は核酸塩基）を含んでもよい。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーのアセンブリの前又は後に付与されてもよい。アナログのいくつかの非限定的な例としては、5-ブロモウラシル、ペプチド核酸、異種核酸、モルホリノ、ロックド核酸、グリコール核酸、トレオース核酸、ジデオキシヌクレオチド、コーディセピン、7-デアザ-GTP、フルオロフォア（例えば、糖に結合したローダミン又はフルオレセイン）、チオール含有ヌクレオチド、ビオチン結合ヌクレオチド、蛍光塩基アナログ、CpGアイランド、メチル-7-グアノシン、メチル化ヌクレオチド、イノシン、チオウリジン、シュドウリジン、ジヒドロウリジン、クエオシン、及びワイオシンが挙げられる。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、遺伝子又は遺伝子断片のコード又は非コード領域、結合解析から定義した遺伝子座（遺伝子座）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、リボソームRNA（rRNA）、短い干渉RNA（siRNA）、短いヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、細胞を含まないDNA（cfDNA）及び細胞を含まないRNA（cfRNA）を含む細胞を含まないポリヌクレオチド、核酸プローブ、並びにプライマーが挙げられる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、自然界に見られるヌクレオチド及びヌクレオチドアナログ（例えば、合成ヌクレオチドアナログ）の混合物を含んでもよい。

10

20

【0028】

用語「トランスフェクション」又は「トランスフェクトされた」は、概して、非ウイルス又はウイルスベースの方法による細胞内への核酸の導入を指す。核酸分子は、完全なタンパク質又はその機能的部分をコードする遺伝子配列であってもよい。例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 18.1-18.88（参照により本明細書に完全に組み込まれる）を参照のこと。

【0029】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書において互換的に使用され、概して、ペプチド結合によって結合された少なくとも2つのアミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、ポリマーの特定の長さを意味しておらず、ペプチドが組換え技術、化学若しくは酵素合成を使用して産生されるか、又は天然に存在するかを暗示又は区別することを意図するものではない。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマー並びに少なくとも1つの修飾アミノ酸を含むアミノ酸ポリマーに適用する。場合によっては、ポリマーは、非アミノ酸によって中断されてもよい。用語は、全長タンパク質、及び2次及び／又は3次構造を有するか又は有さないタンパク質（例えば、ドメイン）を含む、任意の長さのアミノ酸鎖を含む。用語はまた、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質形成、アセチル化、リン酸化、酸化、及び標識成分とのコンジュゲーションなどの任意の他の操作によって修飾されたアミノ酸ポリマーを包含する。本明細書で 사용되는場合、「アミノ酸」及び「複数のアミノ酸」という用語は、概して、修飾アミノ酸及びアミノ酸アナログを含むが、これに限定されない天然及び非天然アミノ酸を指す。修飾アミノ酸は、天然アミノ酸及び非天然アミノ酸を含んでもよく、これは、アミノ酸上に天然に存在しない基又は化学的部分を含むように化学的に修飾されている。アミノ酸アナログは、アミノ酸誘導体を指す場合がある。用語「アミノ酸」は、D-アミノ酸とL-アミノ酸の両方を含む。

30

40

【0030】

本明細書で 사용되는場合、「非天然」は、概して、天然の核酸又はタンパク質に存在しない核酸又はポリペプチド配列を指すことができる。非天然は、親和性タグを指しても

50

よい。非天然は、融合物を指してもよい。非天然は、変異、挿入、及び／又は欠失を含む、天然に存在する核酸又はポリペプチド配列を指してもよい。非天然配列は、非天然配列が融合される核酸配列及び／又はポリペプチド配列によっても呈され得る活性（例えば、酵素活性、メチルトランスフェラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性など）を示し得、かつ／又はコードし得る。非天然核酸又はポリペプチド配列を、遺伝子操作によって天然に生じる核酸及び／又はポリペプチド配列（若しくはそのバリエーション）に連結して、キメラ核酸又はポリペプチドをコードするキメラ核酸及び／又はポリペプチド配列を生成してもよい。

【0031】

本明細書で使用される場合、用語「プロモーター」は、概して、遺伝子の転写又は発現を制御し、RNA転写が開始されるヌクレオチドのヌクレオチド又はヌクレオチドの領域に隣接するか、又は重複して位置し得る調節DNA領域を指す。プロモーターは、しばしば転写因子と呼ばれるタンパク質因子に結合する特定のDNA配列を含有してもよく、これは、RNAポリメラーゼのDNAへの結合を促進し、これにより、遺伝子転写をもたらす。「コアプロモーター」とも呼ばれる「基礎プロモーター」は、概して、作動可能に連結されたポリヌクレオチドの転写発現を促進するための全ての塩基性要素を含有するプロモーターを指してもよい。真核生物の基礎プロモーターは、必ずしもではないが典型的には、TATAボックス及び／又はCAATボックスを含む。

【0032】

本明細書で使用される場合、用語「発現」は、概して、核酸配列若しくはポリヌクレオチドがDNA鋳型から（例えば、mRNA若しくは他のRNA転写物に）転写されるプロセス、及び／又は転写mRNAが続いてペプチド、ポリペプチド、若しくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。転写物及びコードされたポリペプチドは、「遺伝子産物」と総称され得る。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核生物の細胞におけるmRNAのスプライシングを含む。

【0033】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」、「作動可能な連結」、「作動可能に連結された」、又はその文法的な均等物は、概して、遺伝子エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化配列などの並列化を指し、ここで、エレメントは、それらが予期される様式で作動することを可能にする関係にある。例えば、プロモーター配列及び／又はエンハンサー配列を含み得る、調節エレメントは、調節エレメントが、コード配列の転写を開始するのを助ける場合、コード領域に作動可能に連結される。この機能的関係が維持される限り、制御エレメントとコード領域との間に介在する残基があってもよい。

【0034】

本明細書で使用される場合、「ベクター」は、概して、ポリヌクレオチドを含むか、又はポリヌクレオチドと会合し、ポリヌクレオチドの細胞への送達を媒介するために使用され得る高分子又は高分子の会合を指す。ベクターの例としては、プラスミド、ウイルスベクター、リボソーム、及び他の遺伝子送達ビヒクルが挙げられる。ベクターは、概して、標的中の遺伝子の発現を促進するために遺伝子に作動可能に連結された、遺伝子エレメント、例えば、制御エレメントを含む。

【0035】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」及び「核酸カセット」は、又は発現のために作動可能に連結される核酸配列又はエレメントの組み合わせを指すために概して互換的に使用される。場合によっては、発現カセットは、発現のために作動可能に連結されている制御エレメントと遺伝子又は複数の遺伝子との組み合わせを指す。

【0036】

本明細書で使用される場合、「操作された」対象は、概して、対象がヒトの介入によって修飾されたことを示す。非限定的な実施例によれば、核酸は、その配列を、天然では生じない配列に改変することによって修飾されてもよく、核酸は、ライゲーションされた産

10

20

30

40

50

物が、オリジナルの核酸に存在しない機能を有するように、天然では関連しない核酸にライゲーションすることによって修飾されてもよく、操作された核酸は、天然では存在しない配列を用いてインビトロで合成されてもよく、タンパク質は、天然では存在しない配列にそのアミノ酸配列を変更することによって修飾されてもよく、操作されたタンパク質は、新しい機能又は特性を獲得してもよい。「操作された」システムは、少なくとも1つの操作された構成要素を含む。

【0037】

本明細書で使用される場合、「合成」及び「人工」は一般に、天然に存在するヒトタンパク質と低い配列同一性（例えば、50%未満の配列同一性、25%未満の配列同一性、10%未満の配列同一性、5%未満の配列同一性、1%未満の配列同一性）を有するタン

10

【0038】

本明細書で使用される場合、用語「Cas12a」は概して、クラス2、タイプV-A Cas エンドヌクレアーゼであり、(a) CRISPR アレイからの転写後にヌクレアーゼ自体によって処理される比較的小さいガイドRNA（約42~44ヌクレオチド）を使用し、かつ(b)互い違いの切断部位を残すようにDNAを切断する、Cas エンドヌクレアーゼのファミリーを指す。この酵素ファミリーの更なる特徴は、例えば、Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, et al. Nat Biotechnol 2017; 35:31-34、及びZetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cell 2015; 163:759-771に見られ得、これらは、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0039】

本明細書で使用される場合、「ガイド核酸」又はそのバリエーションは、概して、別の核酸にハイブリダイズし得る核酸を指すことができる。ガイド核酸は、RNAであってもよい。ガイド核酸は、DNAであってもよい。ガイド核酸は、部位特異的に核酸の配列に結合するようにプログラムされてもよい。標的化されるべき核酸、又は標的核酸は、ヌクレオチドを含んでもよい。ガイド核酸は、ヌクレオチドを含んでもよい。標的核酸の一部は、ガイド核酸の一部に対して相補的であってもよい。ガイド核酸に相補的であり、ガイド核酸とハイブリダイズする二本鎖標的ポリヌクレオチドの鎖を、相補鎖と呼ぶことができる。相補鎖に相補的であり、それゆえ、ガイド核酸に相補的ではない二本鎖標的ポリヌクレオチドの鎖は、非相補鎖と呼ばれてもよい。ガイド核酸は、ポリヌクレオチド鎖を含んでもよく、また「単一ガイド核酸」と呼ばれ得る。ガイド核酸は、2つのポリヌクレオチド鎖を含んでもよく、また「ダブルガイド核酸」と呼ばれ得る。そうでない場合、用語「ガイド核酸」は、単一ガイド核酸とダブルガイド核酸の両方を指す、包括的であってもよい。ガイド核酸は、「核酸標的化セグメント」又は「核酸標的化配列」又は「スパーサー配列」と称され得るセグメントを含み得る。核酸標的化セグメントは、「タンパク質結合セグメント」又は「タンパク質結合配列」又は「Cas タンパク質結合セグメント」と称され得るサブセグメントを含んでもよい。ガイド核酸は、sgRNAを含み得る。ガイド核酸は、crRNAを含み得る。

30

40

【0040】

2つ以上の核酸又はポリペプチド配列の文脈における用語「配列同一性」又は「パーセント同一性」は、概して、配列比較アルゴリズムを使用して測定された場合、局所比較ウィンドウ又はグローバル比較ウィンドウにわたって最大対応のために比較及び整列されたとき、同一であるか、又は特定のパーセンテージの、同一であるアミノ酸残基又はヌクレオチドを有する、2つ（例えば、ペアワイズアラインメントで）又はそれ以上（例えば、複数の配列アラインメントにおける）の配列を指す。ポリペプチド配列に好適な配列比較アルゴリズムとしては、例えば、3のワード長(W)、10の期待値(E)のパラメーター、及び11の存在、1の延長でギャップコストを設定しているBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用し、かつ30残基より長いポリペプチド配列についての条件付

50

き組成スコアマトリックス調整を使用したBLASTP；2のワード長（W）、1000000の期待値（E）のパラメーター、及びオープンギャップに対して9及び30残基より短い配列についての拡張ギャップに対して1でのPAM30スコアリング設定ギャップコストを使用したBLASTP（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>で入手可能なBLASTにおいてBLASTPについてのデフォルトのパラメーターが存在する）；2の一致、-1のミスマッチ、及び-1のギャップのSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムパラメーターを用いたCLUSTALW；デフォルトパラメーターを用いたMUSCLE；2のリッジー及び1000の最大反復のパラメーターを用いたMAFFT；デフォルトパラメーターを用いたNovafold；デフォルトパラメーターを用いたHMMER `hmmalign`が挙げられる。

10

【0041】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗原受容体」、「CAR」、又は「CAR分子」は概して、少なくとも細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び本明細書に定義される刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む、細胞質シグナル伝達ドメイン（本明細書では、「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも称される）を含む、組換えポリペプチド構築物を指す。一部の実施形態では、刺激分子は、T細胞受容体複合体又はNKGDのシグナル伝達ドメインに関連したゼータ鎖である。一部の実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、以下に定義される少なくとも1つの共刺激分子に由来する1つ以上の機能的シグナル伝達ドメインを更に含む。一部の実施形態では、共刺激分子は、4-1BB（すなわち、CD137）、CD27、及び／又はCD28から選択される。一部の実施形態では、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、及び刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメインを含む、キメラ融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、並びに共刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメイン、及び刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメインを含む、キメラ融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、並びに1つ以上の共刺激分子に由来する2つの機能的シグナル伝達ドメイン、及び刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、キメラ融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、並びに1つ以上の共刺激分子に由来する少なくとも2つの機能的シグナル伝達ドメイン、及び刺激分子に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、キメラ融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、CARは、CAR融合タンパク質のアミノ末端（N末端）に任意のリーダー配列を含む。一部の実施形態では、CARは、細胞外抗原認識ドメインのN末端にリーダー配列を更に含み、リーダー配列は、細胞プロセッシング及びCARの細胞膜への局在化の最中、抗原認識ドメイン、例えばscFv）から任意選択的に切断される。

20

30

【0042】

用語「シグナル伝達ドメイン」は概して、細胞内の情報を伝達することによって作用して、第2のメッセンジャーを生成することによって、又はかかるメッセンジャーに応答することによってエフェクターとして機能することによって、定義されたシグナル伝達経路を介して細胞活性を調節する、タンパク質の機能的部分を指す。

40

【0043】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は概して、例えば、非共有結合的に、可逆的に、及び特定の様式で抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子に由来するタンパク質又はポリペプチド配列を指す。抗体は、ポリクローナル又はモノクローナル、複数鎖又は一本鎖、又はインタクトな免疫グロブリンであってもよく、天然源又は組換え源に由来してもよい。抗体は、免疫グロブリン分子の四量体であってもよい。例えば、天然に存在するIgG抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重鎖（H）及び2つの軽鎖（L）を含む四量体である。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略される）及び重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、CH1、CH2、及びC

50

H3の3つのドメインで構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではV_Lと略される）及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C_Lで構成される。V_H領域及びV_L領域は、フレームワーク領域（F_R）と呼ばれる、より保存された領域が散在する、相補性決定領域（C_DR）と呼ばれる、超変動性の領域に更に細分され得る。各V_H及びV_Lは、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端に配列された3つのC_DR及び4つのF_Rで構成される：F_R1、C_DR1、F_R2、C_DR2、F_R3、C_DR3、及びF_R4。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫システムの様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的補体システムの第1の構成要素（C1q）を含む、宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。用語「抗体」は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ抗体、及びキメラ抗体を含むが、これらに限定されない。抗体は、任意のアイソタイプ／クラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY）、又はサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）のものであってもよい。

10

【0044】

用語「抗体断片」は、インタクトな抗体又はその組換えバリエーションの少なくとも一部分を指し、抗原結合ドメイン、例えば、抗体断片の認識及び抗原などの標的への特異的結合を付与するのに十分である、インタクトな抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片、一本鎖又は「scFv」抗体断片、線状抗体、sdAb（V_L又はV_Hのいずれか）などの単ドメイン抗体、ラクダV_HHドメイン、及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。用語「scFv」は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体断片、及び重鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体断片を含む、融合タンパク質を指し、軽鎖及び重鎖の可変領域は、短い可動性ポリペプチドリンカーを介して連続的に連結され、単鎖ポリペプチドとして発現することができ、scFvは、それが由来するインタクトな抗体の特異性を保持する。本明細書で使用される場合、指定されない限り、scFvは、V_L及びV_H可変領域を、例えば、ポリペプチドのN末端及びC末端に関して、いずれかの順序で有してもよく、scFvは、V_L－リンカー－V_Hを含んでもよい、又はV_H－リンカー－V_Lを含んでもよい。

20

【0045】

抗体又はその抗体断片を含むCAR組成物の部分は、様々な形態で存在し得、そこで、抗原結合ドメインは、例えば、単ドメイン抗体断片（sdAb）、一本鎖抗体（scFv）、及びヒト化抗体を含む、連続ポリペプチド鎖の一部として発現される（Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242: 423-426）。一部の実施形態では、本発明のCAR組成物の抗原結合ドメインは、抗体断片を含む。一部の実施形態では、CARは、scFvを含む抗体断片を含む。

30

40

【0046】

1つ以上の保存的アミノ酸置換を有する本明細書に記載される酵素のうちのいずれかのバリエーションが、本開示に含まれる。こうした保存的置換は、ポリペプチドの三次元構造又は機能を破壊することなく、ポリペプチドのアミノ酸配列においてなされ得る。保存的置換は、アミノ酸を、互いに同様の疎水性、極性、及びR鎖長で置換することによって達成することができる。加えて、又は代わりに、異なる種由来の相同なタンパク質のアラインされた配列を比較することによって、保存的置換は、コードされたタンパク質の基本的な機能を変化させることなく、種間で変異したアミノ酸残基（例えば、非保存残基）を見つ

50

けることによって特定され得る。このような保存的置換されたバリエーションは、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼタンパク質配列のうちのいずれか1つに対して少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の同一性を有するバリエーションを含んでもよい。一部の実施形態では、このような保存的に置換されたバリエーションは、機能的バリエーションである。こうした機能的バリエーションは、エンドヌクレアーゼの1つ以上の重要な活性部位残基又はガイドRNA結合残基の活性が破壊されないように、置換を有する配列を包含することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載されるタンパク質のうちのいずれかの機能的バリエーションは、Casエンドヌクレアーゼの特徴である保存された残基又は機能的残基のうちの少なくとも1つの置換を欠く。一部の実施形態では、本明細書に記載されるタンパク質のうちのいずれかの機能的バリエーションは、Casエンドヌクレアーゼの特徴である保存された残基又は機能的残基の全ての置換を欠く。

10

【0047】

また、本開示には、酵素の活性を減少させる又は排除するための1つ以上の触媒残基の置換を有する、本明細書に記載される酵素のうちのいずれかのバリエーション（例えば、活性低下バリエーション）も含まれる。一部の実施形態では、本明細書に記載されるタンパク質としての活性低下バリエーションは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全てのRuvC触媒残基の破壊的置換を含む。

20

【0048】

機能的に類似したアミノ酸をもたらす保存的置換表は、様々な参考文献から入手可能である（例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993) を参照のこと）。以下の8つの群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する：

30

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)、
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)、
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)、
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)、
- 7) セリン (S)、スレオニン (T)、及び
- 8) システイン (C)、メチオニン (M)。

【0049】

概要

固有の機能性及び構造を有する新しいCas酵素の発見は、デオキシリボ核酸 (DNA) 編集テクノロジーを更に破壊し、速度、特異性、機能性、及び使いやすさを改善する可能性を付与する可能性がある。微生物におけるクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (CRISPR) システムの予測される保有率及び微生物種の純多様性と比較して、比較的少数の機能的に特徴付けられたCRISPR/Cas酵素が、文献に存在する。これは、一部、実験室条件下では、膨大な数の微生物種が容易には培養されないためである。多数の微生物種を含有する天然の環境ニッチからのメタゲノムシーケンシングは、文書化された新しいCRISPR/Casシステムの数に劇的に増加させ、新しいオリゴヌクレオチド編集機能の発見を早める可能性を付与する可能性がある。このようなアプローチの実りのある最近の例は、天然微生物群集のメタゲノム解析からのCasX/CasY CRISPRシステムの2016年の発見によって示される。

40

50

【0050】

CRISPR/Casシステムは、微生物における適応免疫システムとして機能すると記載されているRNA指向ヌクレアーゼ複合体である。それらの自然な状況では、CRISPR/Casシステムは、CRISPR（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）オペロン又は遺伝子座において生じ、これは概して、2つの部分：（i）RNAベースの標的化エレメントをコードする、同等に短いスペーサー配列によって分けられた短い反復配列（30～40bp）のアレイ；及び（ii）アクセサリタンパク質／酵素と並んだRNAベースの標的化エレメントによって指示されるヌクレアーゼポリペプチドをコードするCasをコードするORFを含む。特定の標的核酸配列の効率的なヌクレアーゼ標的化は、概して、（i）標的（標的シード）の最初の6～8個の核酸とcrRNAガイドとの間の相補的なハイブリダイゼーション；及び（ii）標的シードの画定された近傍内のプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列の存在の両方を必要とする（PAMは、通常、宿主ゲノム内に一般的に表されない配列である）。システムの正確な機能及び構成に応じて、CRISPR-Casシステムは、共有された機能的特徴及び進化的類似性に基づき、2つのクラス、5つのタイプ、及び16のサブタイプに一般的に構成されている（図1を参照されたい）。

10

【0051】

クラスI CRISPR-Casシステムは、大型の複数サブユニットエフェクター複合体を有し、タイプI、III、及びIVを含む。クラスII CRISPR-Casシステムは、概して、単一ポリペプチド複数ドメインヌクレアーゼエフェクターを有し、タイプII、V及びVIを含む。

20

【0052】

タイプII CRISPR-Casシステムは、構成要素の点で最も単純なものとみなされる。タイプII CRISPR-Casシステムでは、CRISPRアレイを成熟crRNAにプロセッシングすることは、特別なエンドヌクレアーゼサブユニットの存在を必要としないが、むしろ、アレイリピート配列に相補的な領域を有する小さなトランスコードcrRNA（tracrRNA）であり、tracrRNAは、その対応するエフェクターヌクレアーゼ（例えば、Cas9）及びリピート配列の両方と相互作用して、前駆dsRNA構造を形成し、tracrRNAとcrRNAの両方を負荷した成熟エフェクター酵素を生成するために、内因性RNase IIIによって切断される。Cas IIヌクレアーゼは、DNAヌクレアーゼとして特定される。タイプ2エフェクターは、概して、RuvC様ヌクレアーゼドメインのフォールドに挿入された無関係なHNHヌクレアーゼドメインを有するRNase Hフォールドに適合するRuvC様エンドヌクレアーゼドメインを含む構造を呈する。RuvC様ドメインは、標的（例えば、crRNA相補的）DNA鎖の切断に関与し、一方、HNHドメインは、置換DNA鎖の切断に関与する。

30

【0053】

タイプV CRISPR-Casシステムは、RuvC様ドメインを含む、タイプIIエフェクターの構造と類似したヌクレアーゼエフェクター（例えば、Cas12）構造によって特徴付けられる。タイプIIと同様に、ほとんどの（全てではない）タイプV CRISPRシステムは、tracrRNAを使用して、プレcrRNAを成熟crRNAに処理するが、プレcrRNAを複数のcrRNAに切断するためのRNase IIIを必要とするタイプIIシステムとは異なり、タイプVシステムは、エフェクターヌクレアーゼ自体を使用してプレcrRNAを切断することができる。タイプII CRISPR-Casシステムと同様に、タイプV CRISPR-Casシステムの場合もやはり、DNAヌクレアーゼとして特定される。タイプII CRISPR-Casシステムとは異なり、一部のタイプV酵素（例えば、Cas12a）は、二本鎖標的配列の第1のcrRNA指向切断によって活性化される、強固な一本鎖非特異的デオキシリボヌクレアーゼ活性を有するようである。

40

【0054】

50

C R I S P R - C a s システムは、近年、その標的性及び使いやすさから、遺伝子編集技術として浮上している。最も一般的に使用されるシステムは、クラス2タイプII S p C a s 9 及びクラス2タイプV - A C a s 1 2 a (以前は C p f 1) である。具体的に、タイプV - A システムは、細胞におけるその報告された特異性が、他のヌクレアーゼよりも高く、オフターゲット効果がより少ないか又は全くないため、より広く使用されるようになってきている。V - A システムはまた、ガイドRNAが小さく、(S p C a s 9 についての約100ntと比較して42~44ヌクレオチド)、C R I S P R アレイからの転写後にヌクレアーゼ自体によって処理され、複数の遺伝子編集を伴う多重化アプリケーションを簡素化するという点で有利である。更に、V - A システムは、互い違いの切断部位を有し、これは、マイクロホモロジー依存的標的組み込み(M I T I) などの指向型修復経路を容易にし得る。

10

【0055】

最も一般的に使用されるタイプV - A 酵素は、選択された標的部位の隣に5'プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を必要とする: L a c h n o s p i r a c e a e 細菌 N D 2 0 0 6 L b C a s 1 2 a 及び A c i d a m i n o c o c c u s 種 A s C a s 1 2 a に対して5'-TTTV-3'; 及び F r a n c i s e l l a n o v i c i d a F n C a s 1 2 a に対して5'-TTV-3'。オルソログの最近の調査は、例えばYTV、YYN、又はTTNなどの哺乳動物細胞培養においても活性である、制限のより少ないPAM配列を有するタンパク質を明らかにした。しかしながら、これらの酵素は、V - A の生物多様性及び標的性を完全に包含するものではなく、全ての可能な活性及びPAM配列要件を表すものではない可能性がある。ここで、タイプV - A ヌクレアーゼについて、多数のメタゲノムから数千のゲノム断片を引き出した。文書化されたV - A 酵素の多様性は拡大されている可能性があり、新規システムは、高度に標的化可能で、コンパクト、かつ正確な遺伝子編集剤へと開発されている可能性がある。

20

【0056】

例示的な実施形態

一部の態様では、本開示は、細胞内の2つ以上の遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a)クラス2、タイプII C a s エンドヌクレアーゼ複合体であって、(i)クラス2、タイプII C a s エンドヌクレアーゼと、(ii)1つ以上の操作されたガイドRNAであって、クラス2、タイプII C a s エンドヌクレアーゼに結合するように構成されたRNA配列、及び1つ以上の標的遺伝子座の第1のセットにハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、1つ以上の操作されたガイドRNAと、を含む、クラス2、タイプII C a s エンドヌクレアーゼ複合体を接触させるか、又は導入することを含む。一部の実施形態では、方法は、当該細胞に、(b)(i)クラス2、タイプV C a s エンドヌクレアーゼと、(ii)1つ以上の操作されたガイドRNAであって、クラス2、タイプV C a s エンドヌクレアーゼに結合するように構成されたRNA配列、及び1つ以上の標的遺伝子座の第2のセットにハイブリダイズするように構成されたスペーサー配列を含む、1つ以上の操作されたガイドRNAと、を含むクラス2、タイプV C a s エンドヌクレアーゼ複合体を接触させるか、又は導入することを含む。一部の実施形態では、C a s エンドヌクレアーゼは、リボ核タンパク質(RNP)粒子の形態で接触する(例えば、脂質ベース又はエレクトロポレーション/ヌクレオフェクションベースのトランスフェクションの場合)。一部の実施形態では、C a s エンドヌクレアーゼは、当該エンドヌクレアーゼ又は関連ガイドRNAをコードする配列の形態で導入される(例えば、ベクター、又はインビトロ転写されたmRNAの場合)。一部の実施形態では、編集は、インデルの挿入、未成熟終止コドン、ミスセンスコドン、フレームシフト変異、アデニン脱アミノ化、シトシン脱アミノ化、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

30

40

【0057】

C a s エンドヌクレアーゼは、特定のC a s エンドヌクレアーゼであり得るか、特定のパラメーターの下で導入され得るか、又は特定の目標測定基準を達成する様式で導入され

50

得る。一部の実施形態では、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、Cas 9 エンドヌクレアーゼではない。一部の実施形態では、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、Cas 12 a エンドヌクレアーゼである。一部の実施形態では、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号1若しくは4のうちのいずれか1つ、又はそのバリエーションに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼは、配列番号7又はそのバリエーションに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1の操作されたガイドRNA又は当該第2の操作されたガイドRNAは、配列番号3、6、又は9のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該方法は、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、若しくはそれ以上の効率を有する当該第1の遺伝子座、及び／又は少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、若しくはそれ以上の効率を有する当該第2の遺伝子座のゲノム配列を編集する。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、200 pmol以下、100 pmol以下、50 pmol以下、25 pmol以下、5 pmol以下、又は1 pmol以下の濃度で導入される。一部の実施形態では、オフターゲット部位は、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、0.2%未満の頻度で破壊される。一部の実施形態では、オフターゲット部位は、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、0.01%未満の頻度で破壊される。一部の実施形態では、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析は、HTGTSアッセイ（ハイスループット、ゲノムワイドな転座シーケンシング；例えば、Charles et al. Cell. 2011 Sep 30; 147 (1): 107-19. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.049（参照により全ての目的のために本明細書に明示的に組み込まれる）を参照のこと）、LAM-HTGTSアッセイ（線形増幅媒介ハイスループットゲノムワイドシーケンシング；例えば、Hu et al. Nat Protoc. 2016. 11 (5): 853-71. doi: 10.1038/nprot.2016.043（参照により全ての目的のために本明細書に明示的に組み込まれる）を参照のこと）、又はDigenome-Seqアッセイ（インビトロCas-消化全ゲノムシーケンシング；例えば、Kim et al. Nat Methods. 2015. 12 (3): 237-43. doi: 10.1038/nmeth.3284（参照により全ての目的のために本明細書に明示的に組み込まれる）を参照のこと）を含む。

【0058】

標的化遺伝子座は、任意の遺伝子座を含むことができる。標的化された遺伝子座は、T細胞受容体（TCR）遺伝子座（TRAC及びTRBCなどのT細胞の保存された複数のサブタイプである、TCR遺伝子座の定常領域を含む）、グルココルチコイド受容体遺伝子座（別名、GR遺伝子座）、他の核ホルモン受容体をコードする遺伝子座（例えば、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、若しくはアンドロゲン受容体遺伝子座）、又は特定のがん遺伝子若しくは腫瘍抑制因子をコードする遺伝子座など、特定の治療的に興味深い遺伝子座であり得る。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセット、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットは、T細胞受容体（TCR）遺伝子座を含む。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセットにハイブリダイズするように構成された当該スペーサー配列、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットにハイブリダイズするように構成された当該スペーサー配列は、配列番号10～15のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、又は95

10

20

30

40

50

%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセット、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットは、核内受容体サブファミリー3グループCメンバー1（NR3C1）遺伝子座を含む。一部の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子座の当該第1のセットにハイブリダイズするように構成された当該スパーサー配列、又は1つ以上の標的遺伝子座の当該第2のセットにハイブリダイズするように構成された当該スパーサー配列は、配列番号16、20、21、又は22のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する。

【0059】

本明細書で使用される編集方法のうちのいずれかを、ドナー核酸分子と併せて使用して、例えば、Cas酵素又はCas複合体によって標的化される部位のうちの1つでの相同組換えによって、導入遺伝子を導入することができる。一部の実施形態では、方法は、当該細胞に、内在性遺伝子のトランスジェニック型をコードするオープンリーディングフレームを含むドナーDNA配列、内在性遺伝子の遺伝子座内の、当該標的配列の第1の側に位置するDNA配列を含む第1の相同アーム、及び当該第2の標的配列の第2の側に位置するDNA配列を含む第2の相同アームを導入することを更に含む。場合によっては、導入遺伝子は、CAR-T分子であってもよい。一部の実施形態では、方法は、当該細胞に、異種の操作されたT細胞受容体分子をコードするオープンリーディングフレームを含むドナーDNA配列、TCR遺伝子座内の、当該標的配列の第1の側に位置するDNA配列を含む第1の相同アーム、及び当該第2の標的配列の第2の側に位置するDNA配列を含む第2の相同アームを導入することを更に含む。

【0060】

一部の態様では、本開示は、グルココルチコイド抵抗性の操作されたT細胞を作製する方法を提供し、方法は、T細胞又はその前駆体に、(a) T細胞受容体（TCR）遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体であって、(i) 第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ、又は当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼをコードするDNAと、(ii) 第1の操作されたガイドRNAであって、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されたRNA配列、及び当該TCR遺伝子座の少なくとも一部にハイブリダイズするように構成された第1のスパーサー配列を含む、第1の操作されたガイドRNAと、を含む、TCR遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体を導入することを含む。一部の実施形態では、方法は、当該T細胞又はその当該前駆体に、(b) T細胞受容体核内受容体サブファミリー3グループCメンバー1（NR3C1）遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体であって、(i) 第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼと、(ii) 第2の操作されたガイドRNAであって、当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されたRNA配列、及び当該NR3C1遺伝子座の少なくとも一部にハイブリダイズするように構成された第2のスパーサー配列を含む、第2の操作されたガイドRNAと、を含む、T細胞受容体NR3C1遺伝子座を標的化するRNAガイドエンドヌクレアーゼ複合体を導入することを更に含む。一部の実施形態では、当該TCR遺伝子座の当該少なくとも一部は、当該T細胞遺伝子座内にある。一部の実施形態では、方法は、当該細胞に、(b) 異種の操作されたT細胞受容体分子をコードするオープンリーディングフレームを含むドナーDNA配列、TCR遺伝子座内の、当該標的配列の第1の側に位置するDNA配列を含む第1の相同アーム、及び当該第2の標的配列の第2の側に位置するDNA配列を含む第2の相同アームを導入することを更に含む。

【0061】

タイプII又はタイプVエンドヌクレアーゼは、特定のCasエンドヌクレアーゼを含み得る。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII、又はクラス2、タイプV Casエンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼを含み、当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプV Casエンドヌクレ

アーゼを含む。一部の実施形態では、当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼを含み、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、当該クラス2、タイプV Cas エンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号1、4、又は7のうちのいずれか1つに対して少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1の操作されたガイドRNA又は当該第2の操作されたガイドRNAは、配列番号3、6、又は9のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1のRNAガイドエンドヌクレアーゼ又は当該第2のRNAガイドエンドヌクレアーゼは、100 pmol以下、50 pmol以下、25 pmol以下、5 pmol以下、又は1 pmol以下の濃度で存在する。

10

【0062】

本明細書で使用される編集方法のうちのいずれかを、ドナー核酸分子と併せて使用して、例えば、Cas 酵素又はCas 複合体によって標的化される部位のうちの1つでの相同組換えによって、導入遺伝子を導入することができる。一部の実施形態では、当該異種の操作されたT細胞受容体は、CAR 分子である。一部の実施形態では、当該T細胞受容体遺伝子座の当該少なくとも一部は、T細胞受容体アルファ定常 (TRAC) 遺伝子座又はT細胞受容体ベータ定常 (TRBC) 遺伝子座である。一部の実施形態では、当該T細胞受容体遺伝子座の当該少なくとも一部は、TRA V 遺伝子座又はTRA J 遺伝子座である。一部の実施形態では、当該T細胞受容体遺伝子座の当該少なくとも一部は、TRBV 遺伝子座又はTRBJ 遺伝子座である。一部の実施形態では、当該相同アームは、当該T細胞受容体遺伝子座の当該少なくとも一部に近位のTCR 遺伝子座内に、イントロン領域又はエクソン領域を含む。一部の実施形態では、当該T細胞受容体遺伝子座の当該少なくとも一部は、TRAC の第1又は第3のエクソンである。一部の実施形態では、当該方法は、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又はそれ以上の効率で、当該TCR 遺伝子座及び当該NR3C1 遺伝子座のゲノム配列を破壊する。一部の実施形態では、当該効率は、当該TCR 遺伝子座又はNR3C1 遺伝子座から発現されたタンパク質に対するフローサイトメトリーによって決定される。一部の実施形態では、当該NR3C1 遺伝子座の当該少なくとも一部は、エクソン2又はエクソン3である。一部の実施形態では、当該方法は、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又はそれ以上の効率で、CAR 分子に対して陽性、かつNR3C1 に対して陰性の細胞を産生する。いくつかの実施形態では、方法は、(a) ~ (c) を当該T細胞又はその前駆体に同時に導入することを含む。一部の実施形態では、当該T細胞又はその当該前駆体は、T細胞、造血幹細胞 (HSC)、又は末梢血単核細胞 (PBMC) を含む。一部の実施形態では、当該第2のスペーサー配列は、配列番号16、20、21、又は22のうちのいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、当該第1又は当該第2のスペーサー配列は、少なくとも約19~24個のヌクレオチド、少なくとも約19個のヌクレオチド、少なくとも約20個のヌクレオチド、少なくとも約22個のヌクレオチド、又は少なくとも約24個のヌクレオチドを含む。

20

30

40

【0063】

本明細書に記載される方法と併せて使用されるドナー配列は、その方法において様々な形態で提供され得る。一部の実施形態では、ドナー配列は、核酸分子 (例えば、一本鎖DNA 又は二本鎖DNA、又はRNA) の形態で提供される。一部の実施形態では、ドナー配列は、ベクター (例えば、プラスミド、YACmid、BACmid、ファージミド、又はウイルスベクター) 中で提供される。ウイルスベクターの場合、ウイルスベクターは、特定の血清型を有するAAVウイルスを含むことができる。一部の実施形態では、当該

50

ドナーDNA配列は、ウイルスベクター中で送達される。一部の実施形態では、当該ウイルスベクターは、AAVベクター又はAAV-6ベクターである。

【0064】

一部の態様では、本開示は、(a)TCR遺伝子座内の配列番号10～15のうちのいずれか1つのハイブリダイゼーション領域の100、75、50、25、又は10ヌクレオチド内の異種配列を含む、グルコシルチコイド抵抗性CAR-T細胞の集団を提供する。一部の実施形態では、集団は、(b)インデルを含むNR3C1遺伝子座を更に含む。一部の実施形態では、当該異種配列は、インデルである。一部の実施形態では、当該異種配列は、異種T細胞受容体又はCAR分子をコードするヌクレオチド配列を含むオープンリーディングフレームを含む。一部の実施形態では、当該NR3C1遺伝子座は、配列番号16、20、21、又は22のうちのいずれか1つのハイブリダイゼーション領域の100、75、50、25、又は10ヌクレオチド内のインデルを含む。一部の実施形態では、当該集団の細胞の0.2%未満が、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、オフターゲット遺伝子座にインデルを有する。一部の実施形態では、当該集団の細胞の0.01%未満が、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析によって決定される場合、オフターゲット遺伝子座にインデルを有する。一部の実施形態では、ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析は、HTGTSアッセイ（ハイスループット、ゲノムワイドな転座シーケンシング；例えば、Charles et al. Cell. 2011 Sep 30; 147 (1): 107-19. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.049（参照により全ての目的のために本明細書に明示的に組み込まれる）を参照のこと）、LAM-HTGTSアッセイ（線形増幅媒介ハイスループットゲノムワイドシーケンシング；例えば、Hu et al. Nat Protoc. 2016. 11 (5): 853-71. doi: 10.1038/nprot.2016.043（参照により全ての目的のために本明細書に明示的に組み込まれる）を参照のこと）、又はDigenome-Seqアッセイ（インビトロCas-消化全ゲノムシーケンシング；例えば、Kim et al. Nat Methods. 2015. 12 (3): 237-43. doi: 10.1038/nmeth.3284（参照により全ての目的のために本明細書に明示的に組み込まれる）を参照のこと）を含む。一部の実施形態では、当該細胞の集団は、染色体転座を実質的に含まない。

【0065】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載される方法のうちのいずれかによって産生される細胞を提供する。

【0066】

一部の態様では、本開示は、以下の表1に提供されるタンパク質配列又はヌクレオチド配列を提供する。

【0067】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1：本明細書に記載される例示的なタンパク質、ガイドRNA、標的化配列、及び相同アーム

説明	アミノ酸配列又はヌクレオチド配列	配列番号
MG3-6 タンパク質配列 (クラス 2、 タイプ II)	MSADSLNYRIGVDVGDRSVGLAAIELDDDGFLKKLAMVTRHDG GKDPATGKTPKSRKETAGVARRTMRMRRRKKKRLKDLDKKLRDL GYFVPRDEEPQTYEAWSSRARLAESRFEDPHERGEHLVRAVRHMA RHRGWRNPWWFSQLEEASQEPSETFGRILERAQHEWGERVSDNA TLGMLGALAANNNILLRPRRYEHNPKTGKNAEKLNVRGQEPILLD KVRQEDVLAELRRICKVQGIEDQYPELAHAVFTQVRPYVPTERVGK DPLQPMKIRASRASLEFQEFRIRDAVANLRIRVGGSEERRPLTEEEYD RAVDYLMESYDTPPTWGEVADELEIAENTLIAPVIDDVRLNVAPY DRSSAIVEAKLKRKTQARQWWDDANLDLRSQILLLVSDATDDTA RVAENSGLLEVFESWSDEEKQTLQDLKFDSGRAAYSIDTLNKLNAV MHEHRVGLHEARQNVFGVSDTWPRDRLEPTGQPTVDRVLTIV RRFILDCEAWGRPQKIVVEHARTGLMGPSQRADVLKEIARNRNA NERIRQELREGGIEAPNRADIRNSIIQDQESQCLYCGKEIGVLTAE DHIVPRAGGGSSKRENLAAVCRACNASKGSRPFAVWAGPARLERTI QRLRELQAFKTKSKKRTLNAIIRRLKQREEDEPIDERSLASTSYAAT SIRERLEQHFNDLDPGFAPVAVDVYGGSLTRESRRAGGIDKSIML RGQSDKNRFDVRHHAIDAAVMTLLNPSVAVTLEQRRMLKQENDY SSPRGQHDNGWRDFIGRGEASQSKFLHWKKTAVVLADLISEAIEQD TIPVVNPLRLRPQNGSVHKDTVEAVLERTVGDSWTDKQVSRIVDPN TYIAFLSLLGRKKELDADHQRLVSVSAGVKLLADERVQIFPEEAASI LTPRGVVKIGDSIHHARLYGWKNQRGDIQVGMLRVFGAEFPWFMR ESGVKDILRVPIPGSQSYRDLAATTRKFIENGQATEFGWITQNDEI EISAEYYLATDKGDLSDFLGILPEIRWKVTGIEDNRRIRLRPLLSSE AIPNMLNGRLLTQEEHDLIALVINKGVRVVVSTFLALPSTKIIRRN LGIPRWRGNGHLPTSLDIQRAATQALEGRD	1
sgRNA を有する MG3-6 コンセンサス 3'PAM	nnRGRYY	2
MG3-6 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUGAGAAUCGAAAGAUUCU UAAUAAGGCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUU CCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGUUUU	3

【 0 0 6 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

説明	アミノ酸配列又はヌクレオチド配列	配列番号
MG3-8 タンパク質配列 (クラス 2、タイプ II)	MSTDMKNYRIGVDVGDERSVGLAAIEFDDAGFPIQKLALVTFRHDG GLDPTDNPFSRKETRGEARRRMTRRRKQRLRDLDKVLENLGY TVPEGPEPETYEAWTSRALLASIKLASADELNEHLVRAVRHIARHR GWVNPWWSLDQLERASQEPSETFEILARARELFGERV PANPTLGM LGALAANNEVLLRPRAEKKKKTGYVRGTPLLAQVRQIDQVAELR RICEVQGIEEQYETLRNAIFAHKVAYVPTERVGKDPLAPSKNRTIRA SLEFQEFRILDSVANLRVRTDSRAKRELTEGEYDAAVEFLMGYTAK EQPSWADVAAEEIGVPGNRLIAPVLEDVQQKTAPFDRSSAAFEKAMS KRTEARQWWEANDDDQLRSLFIMFLADATNDTEEA AVAGLPEL YMSWPAEEREALSNIDFEKGRVAYSHETLSKLSEYMHEHRVGLHE ARKAVFGVDDTWRPPLAKLEEPTGQPTVDRVLTILRRFVLD CERQ WGRPRAITVEHARIGLVGPAQRQNILKEQEDNRKNNECIRDEL RKS GVENPSRTEVRRHLVVQDQESQCLYCGAVIRTDTS ELDHIVPRAGG GSSRRENLA AVCRYCNSKKDRTLFDWAGSVRLQETIDRVRQLKA FKDSKKAKMFKNQIRRLRQTEADEPIDERSLASTSYAAVAVRERLE QHFNEGLAPDDKNRVVLDVYAGSVTRESRRAGGIDERILLRGERD KNRFDVRHHAIDAAVMTLLNRSVALTLEQRSQLRRAFYEQGLDKL DRDQLKPEEDWRNFIGLSLASQEKFLEWKKVTTVLGDLLAEAIEDD SIAVVSPLRLRPQNGRVHKDTIAAVKKQTLGSAWSADAVKRIVDPE IYLAMKDALGKSKVLPEDSARTLELSDGRYLEADDEVLFPPKNAAS ILTPRGVAEIGGSIHHARLYSWLTKKGELKIGMLRVYGA EFPWLMR ESGSHDVLRMPIHPGSQSFRDMQDTRKAVESSEAVEFAWITQND E LEFEPEDYIAHGGKDEL RQFLEFMPECRWRVDGFKKNYQIRIRPAM LSREQLPSDIQRRLESKTLTENESLLLKALDTGLVVAIGGLLPLGTL KVIRRNNLGFPRWRGNGNLPTSFEVRSSALRALGVEG	4
MG3-8 コンセンサス 3'PAM	nnRGRTY	5
MG3-8 sgRNA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUGAGAAUCGAAAGAUUCU UAAUAAGGCAUCCU UCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGGCUC CUCUUAGGAACGGGCGGUAUGUUUU	6

【 0 0 6 9 】

10

20

30

40

【 0 0 7 0 】

[illegible]

【表 1 - 4】

説明	アミノ酸配列又はヌクレオチド配列	配列番号
MG3-6- TRAC-6-22	5'-CGAATCCTCCTCCTGAAAGTGG-3'	10
SpyCas9 TRAC-1-20	5'-ACAAAACCTGTGCTAGACATG-3'	11
SpyCas9 TRAC-2-20	5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3'	12
SpyCas9 TRAC-3-20	5'-TCTCTCAGCTGGTACACGGC-3'	13
MG29-1- TRAC-19- 22	5'-TTGCTCCAGGCCACAGCACTGT-3'	14
MG29-1- TRAC-35- 22	5'-GAGTCTCTCAGCTGGTACACGG-3'	15
MG29-1- GR-29- 20(NR3C1 標的化)	5'-CAGCTTCCACAAGTTAAGAC-3'	16
MG29-1- ALB-87(ア ルブミン標 的化)	5'-CGCACTAAGGAAAGTGCAAAGT-3'	17
MG29-1- ALB-74(ア ルブミン標 的化)	5'-AATAAAGCATAGTGCAATGGAT-3' -3'	18
MG29-1- ALB-83(ア ルブミン標 的化)	5'-TGAGATCAACAGCACAGGTTTT-3' -3'	19

【 0 0 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

説明	アミノ酸配列又はヌクレオチド配列	配列番号
NR3C1 ス ペーサー標 的配列 MG29-1- GR-13- 20(「標的 B」)	GTCTGTGGTATAACAATTTC	20
NR3C1 ス ペーサー標 的配列 MG29-1- GR-28- 20(「標的 C」)	GGAGGTGGTCCTGTTGTTGC	21
NR3C1 ス ペーサー標 的配列 MG29-1- GR-29- 20(「標的 D」)	CAGCTTCCACAAGTTAAGAC	22
TRAC を標 的化する CAR 5' 相 同アーム	TTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAG CCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTG CTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGT TATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAAT AAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTG GCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTC TTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCA TCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCA TGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCA TCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAA ATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCC AGAACCCTGACC	23

【 0 0 7 2 】

10

20

30

40

【表 1 - 6】

説明	アミノ酸配列又はヌクレオチド配列	配列番号
TRAC を標 的化する CAR 3' 相 同アーム	CTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCT GTCTGCCTATTACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAA AGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGA CATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGA GCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGC ATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAG CTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAG GTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCCTCTGAT TGTTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAACCCTCTTTTAC TAAGAAACAGTGAGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACG GGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGT GGCCCAGCCTCAGT	24
AAVS1 ス ペーサー標 的配列	GGGGCCACTAGGGACAGGAT	41
AAVS1 を 標的化する GR アイソ フォーム 5' 相同ア ーム	CTCCTTCTGGGGCCTGTGCCATCTCTCGTTTCTTAGGATGGCCTT CTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCCTCCCCTTCTTGTAGG CCTGCATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTC TCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCATCCTCTTGCTTTCTTTGCCTGG ACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCTGGGTACCTCTCACTCCTTTCA TTTGGGCAGCTCCCCTACCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAG CTCTTCCAGCCCCCTGTCATGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCT CAGCTAGTCTTCTTCCCTCCAACCCGGGCCCCCTATGTCCACTTCAG GACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTG GGACCACCTTATATTCCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCT GGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCACTAG GGACAG	42

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

説明	アミノ酸配列又はヌクレオチド配列	配列番号
AAVS1 を標的化する GR アイソフォーム 3' 相同アーム	GATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTTAGGCCTCCTCCTTCCTA GTCTCCTGATATTGGGTCTAACCCCCACCTCCTGTTAGGCAGATT CCTTATCTGGTGACACACCCCCATTTCCTGGAGCCATCTCTCTCC TTGCCAGAACCTCTAAGGTTTGCTTACGATGGAGCCAGAGAGGA TCCTGGGAGGGAGAGCTTGGCAGGGGGTGGGAGGGAAGGGGGG GATGCGTGACCTGCCCCGGTTCTCAGTGGCCACCCTGCGCTACCC TCTCCCAGAACCTGAGCTGCTCTGACGCGGCCGTCTGGTGCGTTT CACTGATCCTGGTGCTGCAGCTTCCTTACACTTCCCAAGAGGAG AAGCAGTTTGGA AAAACA AAAATCAGAATAAGTTGGTCCTGAGTT CTAACTTTGGCTCTTCACCTTTCTAGTCCCCAATTTATATTGTTCC TCCGTGCGTCAGTTTTACCTGTGAGATAAGGCCAGTAGCCAGCC CCGTCCTGGCAG	43
TRAC を標的化する MG3-6 sgRNA(MG 3-6-TRAC- 6)	mC*mG*mA*rArUrCrCrUrCrCrUrCrCrUrGrArArArGrUrGrGrUrUrGr ArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCr UrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUr UrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	44
TRBC1/2 を標的化する MG3-6 sgRNA(MG 3-6-TRBC- E2)	mC*mG*mG*rCrGrCrUrGrArCrGrArUrCrUrGrGrGrUrGrGrUrUrGrArGr ArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCr CrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	45
TRAC を標的化する MG29-1 sgRNA(MG 29-1-TRAC- 35)	mU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrU rCrArGrCrUrGrGrUrArCrArCrG*mG	46

【 0 0 7 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

説明	アミノ酸配列又はヌクレオチド配列	配列番号
TRBC1/2 を標的化する MG29-1 sgRNA(MG29-1-TRBC-A1)	mU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrCrCrArUrCrArGrArArGrCrArGrArGrArU*mC	47
TRBC1/2 を標的化する MG29-1 sgRNA(MG29-1-TRBC-G2)	mU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrCrCrCrUrArUrCrUrGrGrGrUrCrCrArCrU*mC	48
B2M を標的化する MG29-1 sgRNA(MG29-1-B2M-H1)	mU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArUrCrUrCrUrUrGrUrArCrUrArCrArCrUrGrArA*mU	49
B2M を標的化する MG29-1 sgRNA(MG29-1-B2M-D2)	mU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrArGrUrGrGrGrGrUrGrGrArArUrUrCrArGrUrGrUrA*mG	50
B2M を標的化する MG29-1 sgRNA(MG29-1-B2M-A3)	mU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrCrArUrUrCrUrCrUrGrCrUrGrGrArUrGrArCrGrUrG*mA	51
TRAC スペーサー標的配列(MG3-6-TRAC-6)	CGAATCCTCCTCCTGAAAGTGG	52

【 0 0 7 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

説明	アミノ酸配列又はヌクレオチド配列	配列番号
AAVS1 ス ペーサー標 的配列 (MG3-6- AAVS1-D2)	TAGGAAGGAGGAGGCCTAAGGA	53
TRAC スペ ーサー標的 配列(MG29- 1-TRAC-35)	GAGTCTCTCAGCTGGTACACGG	54
AAVS1 ス ペーサー標 的配列 (MG29-1- AAVS1-F3)	TCTGTCCCCTCCACCCACAGT	55
AAVS1 ス ペーサー標 的配列 (SpCas9、 Mali et al.AAVS1 T2)	GGGGCCACTAGGGACAGGATTGG	56
TRAC を標 的化する MG3-6 sgRNA(MG 3-6-TRAC- 6)	mC*mG*mA*rArUrCrCrUrCrCrUrCrCrUrGrArArArGrUrGrGrUrUrGr ArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCr UrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUr UrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	57
AAVS1 を 標的化する MG3-6 sgRNA(MG 3-6-AAVS1- D2)	mU*mA*mG*rGrArArGrGrArGrGrArGrGrCrCrUrArArGrGrArGrUrUrG rArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC rUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrU rUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	58

【 0 0 7 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 0】

説明	アミノ酸配列又はヌクレオチド配列	配列番号
TRAC を標的化する MG29-1 sgRNA(MG29-1-TRAC-35)	mU*rArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrU rCrArGrCrUrGrGrUrArCrArCrG*mG	59
AAVS1 を標的化する MG29-1 sgRNA(MG29-1-AAVS1-F3)	/AltR1/rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrGrUrUrGrUrArGrArUrUrCrUrGrUrC rCrCrCrUrCrCrArCrCrCrCrArCrArGrU/AltR2/	60
AAVS1 を標的化する SpCas9 sgRNA(SpCas9、Mali et al.AAVS1 T2)	mG*mG*mG* rGrCrC rArCrU rArGrG rGrArC rArGrG rArUrG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArG rArArA rUrArG rCrArA rGrUrU rArArA rArUrA rArGrG rCrUrA rGrUrC rCrGrU rUrArU rCrArA rCrUrU rGrArA rArArA rGrUrG rGrCrA rCrCrG rArGrU rCrGrG rUrGrC mU*mU*mU* rU	61

【 0 0 7 7 】

【表 1 - 1 1】

MG3-6 スク レーパーゼ (mRNA 配 列)	ATGCATGCGCGGCCGCAAGCTTTAATACGACTCACTATAAGGAA AAGCCAGCTCCAGCAGGCGCTGCTCACTCCTCCCCATCCTCTCCC TCTGTCCCTCTGTCCCTCTGACCCTGCACTGTCCCAGCACCATGG CCCCCAAGAAGAAGCGGAAAGTTGGCGGCGGAGGCAGCAGCAC CGACATGAAGAACTACCGGATCGGCGTGACGTGGGCGATAGA TCTGTTGGACTGGCCGCCATCGAGTTCGACGATGATGGACTGCC CATCCAGAAGCTGGCCCTGGTCACCTTTAGACACGATGGCGGAC TGGACCCACCAAGAACAAGACCCCTATGAGCCGGAAGAGAC ACGGGGAATCGCCAGACGGACCATGCGGATGAACAGAGAGCGG AAGCGGCGGCTGAGAAACCTGGACAACGTGCTGGAAAACCTGG GCTACTCTGTGCCTGAGGGCCCTGAGCCTGAGACATATGAGGCC TGGACAAGCAGAGCCCTGCTGGCCTCTATCAAACCTGGCCTCTGC CGACGAGCTGAACGAACACCTTGTGAGAGCCGTGCGGCACATG GCCAGACATAGAGGATGGGCCAATCCTTGGTGGTCCCTGGACCA GCTGGAAAAGGCCAGCCAAGAGCCTAGCGAGACATTCGAGATC ATCCTGGCCAGAGCCAGAGAGCTGTTGCGCGAGAAGGTGCCCCG CTAATCCTACACTGGGAATGCTGGGAGCCCTGGCCGCTAACAAT GAGGTGCTGCTGAGGCCCAGGGACGAGAAGAAGAGAAAAGACCG GATACGTGCGGGGCACCCCTCTGATGTTTGTCTCAAGTTCGACAG GGCGATCAGCTGGCCGAGCTGCGGAGAATTTGTGAAGTGCAGG GCATCGAGGACCAGTACGAGGCTCTGAGACTGGGCGTGTTGAC CACAAGCACCCCTACGTGCCCCAAAGAAAGAGTGGGCAAAGACC CTCTGAACCCCAGCACCAACAGAACCATCAGAGCCAGCCTGGA ATTTCAAGAGTTCCGCATCCTGGACAGCGTGGCCAATCTGAGAG TGCGGATCGGCAGCAGAGCCAAGAGGGAACTGACAGAGGCCGA GTATGATGCCGCCGTGGAATTCCTGATGGACTACGCCGACAAAG AGCAGCCTAGCTGGGCCGATGTGGCCGAGAAAATTGGCGTGCCC GGCAACAGACTGGTGGCCCCTGTTCTGGAAGATGTGCAGCAGAA AACAGCCCCTTACGACAGAAGCAGCGCCGCCTTTGAGAAGGCC ATGGGCAAGAAAACCGAGGCCAGACAGTGGTGGGAGTCCACCG ATGATGACCAGCTGAGAAGCCTGCTGATTGCCTTCCTGGTGGAC GCCACCAACGACACAGAAGAAGCCGCTGCTGAAGCCGGCCTGA GCGAGCTGTATAAGTCTTGGCCTGCCGAGGAAAGAGAGGCCCTG TCCAACATCGACTTCGAGAAGGGCAGAGTGGCCTACAGCCAAG AAACCCTGAGCAAGCTGAGCGAGTACATGCACGAGTACAGAGT GGGACTGCACGAGGCTAGAAAGGCCGTGTTGCGAGTGGATGAT	62

【 0 0 7 8 】

ACCTGGCGGCCTCCTCTGGATAAAGCTGGAAGAACCTACAGGACA GCCTGCCGTGGACAGAGTGCTGACCATCCTGAGAAAGATTCTGTGC TGGACTGCGAGCGGCAATGGGGCAGACCTAGAGCCATCACCGT GGAACACACACGGACAGGCCTGATGGGCCAACACAGAGACAG AAGATCCTGAACGAGCAGAAGAAGAACC GGCCGACAACGAGA GAATCCGGGATGAGCTGAGAGAATCTGGCGTGACAACCCCTCC AGAGCCGAAGTTCGGAGACACCTGATCGTGCAAGAGCAAGAGT GCCAGTGCCTGTACTGCGGCACCATGATCACCACCACCACAAGC GAGCTGGACCACATCGTTCTAGAGCCGGTGGCGGCAGCAGCA GAAGGGAAAATCTGGCCGCTGTGTGCAGAGCCTGCAACGCCAA GAAGAAACGCGAGCTGTTCTACGCCTGGGCTGGCCCAGTGAAGT CCCAAGAGACAATCGAGAGAGTCAGACAGCTGAAGGCCTTTAA GGACAGCAAGAAAGCCAAGATGTTCAAGAACCAGATCCGCCGG CTGAACCAGACCGAGGCCGATGAGCCTATCGACGAAAGAAGCC TGGCCAGCACATCTTACGCCGCTGTGGCCGTTAGAGAGCGGCTG GAACAGCACTTCAACGAAGGCCTGGCACTGGACGACAAGTCCA GAGTGGTGCTGGATGTGTATGCCGGCGCTGTGACCAGAGAGTCT CGTAGAGCTGGCGGCATCGACGAGCGGATTCTGCTGAGAGGCG AGCGGGACAAGAACAGATTTCGATGTGCGGCATCACGCCGTGGA CGCTGCTGTTATGACCCTGCTGAACAGATCCGTGGCTCTGACCCT GGAACAGAGATCACAGCTGCGGCGGACCTTCTACGAGCAAGGA CTGGACAAACTGGACCGGAACCAGCTGAAGCCCGAGGAAGATT GGAGAGACTTCACCGGACTGGCCCCTGCCTCTCAAGAGAAGTTT CTGGAATGGCGGAAGGCCGCCACCATCCTGGGAGATTGCTGGC CGAAGCCATCGAGGATGACTCTATCGCCGTGGTGTCCCCACTGA GACTGAGGCCACAGAATGGCAGCGTGACCTGGAAACAATCAG CGCCGTGAAGAAGCAGACCCTGGGCTCTGATTGGCCAGCCGACG CCGTGAAAAGAATCGTGGAACCCGAGATCTACCTGGCTATGAAG GATGCCCTGGGAAAGCTGAAAGAGCTGCCCCGAGGATAGCGCCA GATCTCTGGAAGTCCCCGACGGCAGATTTCGTGGAAGCCGATGAC GAGGTGCTGTTCTTCCCAGAGAACGCCGCCAGCATTCTGACCCC TAGAGGCGTGGCAGAGATCGGCGGCTCTATTACCATGCCAGAC TGACGGCTGGCTGACCAAAAAGGGCGAGCTGAAAGTGGGCAT GCTGAGAGTGTACGGCGCCGAGTTTCCCTGGCTGATGAGAGAGT CCGGCTCCAGAAACGTGCTGAGCATGCCTATCCACAGAGGCAGC CAGAGCTTCCGGGACATGCAGGACACAACCCGGAAAGCCGTGG
--

10
20
30
40

【 0 0 8 0 】

説明	アミノ酸配列又はヌクレオチド配列	配列番号
	AAAGCGGAGAGGCTGTGGAATTCGCCTGGATCACCCAGAACGA TGAGCTGGAATTCGACCCCGACGACTACATTGCCCCACGGCGGAA AGGACGAACTGAGACAGTTCCTGGGCTTTATGCCCCGAGTGCCGT TGGAGAGTGGACGGCTTCAAGAAGAATTACCAGATCAGAATCA GGCCCCGCCATGCTGAGCAGAGAGCAGCTGCCTAGCGACATCCA GCGGAGACTGGAAAGCAAGACCCTGACCAAGAACGAGTCCCTG CTGCTGAAAGCCCTGGATACAGGACTGGTGGTGGCCATCGGAGG ACTGCTGCCTCTCGAGACACTGAAAGTGATCCGGCGCAACAATC TGGGCTTCCCCAGGTGGCGCGGAAACGGAAATCTGCCCACCAGC TTTGAAGTGCGGAGCAGCGCTCTGAGAGCCCTGGGAGTTGAAGG ATCTGGCGGAAAAAGACCTGCCGCCACAAAGAAAGCCGGACAG GCCAAGAAAAAGAAGTGACCACACCCCCATTCCCCCACTCCAGA TAGAACTTCAGTTATATCTCACGTGTCTGGAGTTGGATCCATGCA TGC	

20

40

50

[illegible]

50

【表 1 - 1 5】

CAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACA TGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGC ATGGACGAGCTGTACAAGGGCAGCGGCGAAGGAAGGGGTCTC TGTTGACTTGCGGGGATGTTGAAGAAAACCCGGGACCAATGCTT CTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGC ATTCTCCTGATCAGGAAGGTGTGCAACGGCATCGGCATCGGCG AGTTCAAGGACAGCCTGAGCATCAACGCCACCAACATCAAGCA CTTCAAGAACTGCACCAGCATCAGCGGCGACCTGCACATCCTGC CCGTGGCCTTCAGGGGCGACAGCTTCACCCACACCCCCCCCCTG GACCCCCAGGAGCTGGACATCCTGAAGACCGTGAAGGAGATCA CCGGCTTCCTGCTGATCCAGGCCTGGCCCCGAGAACAGGACCGAC CTGCACGCCTTCGAGAACCTGGAGATCATCAGGGGCAGGACCA AGCAGCACGGCCAGTTCAGCCTGGCCGTGGTGAGCCTGAACATC ACCAGCCTGGGCCTGAGGAGCCTGAAGGAGATCAGCGACGGCG ACGTGATCATCAGCGGCAACAAGAACCTGTGCTACGCCAACACC ATCAACTGGAAGAAGCTGTTTCGGCACCAGCGGCCAGAAGACCA AGATCATCAGCAACAGGGGCGAGAACAGCTGCAAGGCCACCGG CCAGGTGTGCCACGCCCTGTGCAGCCCCGAGGGCTGCTGGGGCC CCGAGCCCAGGGACTGCGTGAGCTGCAGGAACGTGAGCAGGGG CAGGGAGTGCGTGGAACAAGTGCAACCTGCTGGAGGGCGAGCCC AGGGAGTTTCGTGGAGAACAGCGAGTGATCCAGTGCCACCCCCG AGTGCCTGCCCCAGGCCATGAACATCACCTGCACCGGCAGGGGC CCCGACAACCTGCATCCAGTGCGCCCACTACATCGACGGCCCCCA CTGCGTGAAGACCTGCCCCGCCGGCGTGATGGGCGAGAACAA ACCCTGGTGTGGAAGTACGCCGACGCCGGCCACGTGTGCCACCT GTGCCACCCCAACTGCACCTACGGCTGCACCGGCCCCGGCCTGG AGGGCTGCCCCACCAACGGCCCCAAGATCCCCAGCATCGCCACC GGCATGGTGGGCGCCCTGCTGCTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGG CATCGGCCTGTTTCATGGGCAGCGGCGAAGGAAGGGGTCTCTGT TGACTTGCGGGGATGTTGAAGAAAACCCGGGACCAATGGGGAA TGAAGCAAGTTATCCATTGGAAATGTGTAGCCATTTGATGCTG ATGAAATAAAGAGACTCGGAAAACGATTTAAGAACTCGATCTT GATAATAGTGGATCTCTCTCTGTGCGAAGAATTCATGTCCCTTCT GAACTCCAACAAAATCCACTCGTCCAAAGAGTCATTGATATATT TGATACGGATGGGAATGGTGAAGTCGATTTTAAAGAATTTATTG AAGGGGTTAGTCAATTTCCGTCAAAGGGGATAAAGAACAGAA		10 20 30 40
--	--	---

【0082】

【 0 0 8 3 】

50

[illegible]

50

CAACACCGAGACAAGAGAGCCCGCCTACGCCTACGACTTCCGG GGCAGATTTCGCTTCAGCCTGGAAACCAGCGCCAGCACC GCCTA CCTGCAGATCAACAACCTGAAGTACGAGGACACCGCCACCTACT TTTGCGCCCTGGACTACAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAG GGCACCAGCGTGACCGTGTCCAGCTTCGTGCCCCGTGTTCTCTGCC CGCCAAACCTACCACCACCCCTGCCCCCTAGACCTCCCACCCAG CCCCAACAAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGCGGGCCGAAGCC TGTAGACCTGCTGCCGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGCCTGGA CTTCGCCTGCGACATCTACATCTGGGCCCCCTCTGGCCGGCACCTG TGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTGGTGATCACCTGTACTGCAACC ACCGGAACAGAAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTA CATGAACATGACCCCAAGACGGCCTGGCCCCACCCGGAAGCACT ACCAGCCTTACGCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCTACCGGTCC AGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCGACGCCCCCTGCCTACCAGCA GGGACAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGG GAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCCGGGACCCCG AGATGGGCGGAAAGCCCAGACGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCT GTATAACGAAGTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGC GAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGCGCAAGGGCCACG ATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTAC GACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGAGGATCCGGCGC TACAAATTTTCACTGCTGAAACAGGCGGGTGATGTGGAGGAGA ACCCTGGACCCATGGGTGCTGGCGCAACTGGACGCGCTATGGAT GGACCTCGCTTGCTGCTTCTCTGCTTCTCGGGGTCTCATTGGGT GGTGCTAAGGAAGCATGCCCAACGGGACTTTATACGCATAGCGG AGAGTGTTGCAAAGCTTGTAACCTGGGCGAAGGCGTCGCGCAAC CTTGTTGGTGCAAATCAAACCGTCTGCGAGCCATGTTTGGACTCT GTTACGTTTAGTGACGTAGTATCTGCGACAGAGCCATGCAAGCC TTGTACGGAATGTGTAGGATTGCAGAGCATGTCTGCCCTTGTTG TAGAAGCCGACGATGCAGTTTGCAGGTGCGCGTATGGCTATTAC CAAGACGAAACAACCGGACGATGTGAAGCTTGCCGAGTTTGTG AAGCGGGTTCCGGGCTTGATTCTCATGTGCAGGATAAGCAGAAC ACCGTCTGCGAAGAGTGCCCCGATGGCACCTACAGCGATGAAGC GAACCATGTAGACCCCTGCCTGCCTTGACCGTTTGTGAAGACA CGGAACGACAGTTGCGGGAGTGTACCCGGTGGGCAGACGCCGA GTGCGAAGAGATTCCAGGCCGCTGGATCACGCGAAGTACCCCGC
--

40

10

20

30

40

50

【表 1 - 2 0】

TRAC 遺伝子座で挿入された導入遺伝子 (MG29-1-TRAC-35 の切断部位に対応する相同アームが隣接した、MSCV プロモーター駆動の tLNGFR コード配列)	GCGGCCGCTTAATTAATTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCA	
	TTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTC	
	CAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCC	
	TTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCT	
	ATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTT	
	CAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCA	
	CTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTC	
	CCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTA	10
	TTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGA	
	GCCCCGCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTT	
	GGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCT	
	TGTCACACAGATATCCAGAACCCTGACCTTAATTAATGAATGAA	
	TGAAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTT	
	TTGTGTGATCCTCGAGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTG	
	GCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAATA	
	CATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAGA	
	GAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCA	20
	GTTCCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATG	
	CGGTCCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCC	65
	AGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAA	
	CTAACCAATCAGTTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCT	
	CCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGCGCGC	
	GCCAGTCCGGTACCAGTCGCCACCATGGCCCTGCCTGTGACAGC	
	TCTGCTCCTCCCTCTGGCCCTGCTGCTCCATGCCGCCAGACCCGA	
	CATCGTGCTGACCCAGAGCCCCCCCAGCCTGGCCATGTCTCTGG	
	GCAAGAGAGCCACCATCAGCTGCCGGGCCAGCGAGAGCGTGAC	
	CATCCTGGGCAGCCACCTGATCCACTGGTATCAGCAGAAGCCCCG	30
	GCCAGCCCCCCCACCCTGCTGATCCAGCTCGCCAGCAATGTGCAG	
	ACCGGCGTGCCCGCCAGATTACAGCGGCAGCGGCAGCAGAACCG	
	ACTTACCCCTGACCATCGACCCCGTGGAAGAGGACGACGTGGCC	
	GTGTACTACTGCCTGCAGAGCCGGACCATCCCCGGACCTTTGG	
	CGGAGGCACCAAACCTGGAATCAAGGGCAGCACCAGCGGCTCC	
	GGCAAGCCTGGCTCTGGCGAGGGCAGCACAAAGGGACAGATTC	
	AGCTGGTGCAGAGCGGCCCTGAGCTGAAGAAACCCGGCGAGAC	
	AGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCCGACT	
	ACAGCATCAACTGGGTGAAAAGAGCCCCTGGCAAGGGCCTGAA	40

【 0 0 8 7 】

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

【 0 0 9 0 】

【 表 2 】

表 2 : 本開示に従って C a s エフェクターと共に使用され得る例示的な N L S 配列。

供給源	NLS アミノ酸配列	配列番号
SV40	PKKKRKV	25
ヌクレオプラスミン二分 NLS	KRPAATKKAGQAKKKK	26
c-myc NLS	PAAKRVKLD	27
c-myc NLS	RQRRNELKRSP	28
hRNPA1 M9 NLS	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY	29
インポーチン-アルファ IBB ドメイン	RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV	30
筋腫 T タンパク質	VSRKRPRP	31
筋腫 T タンパク質	PPKKARED	32
p53	PQPKKKPL	33
マウス c-abl IV	SALIKKKKKMAP	34
インフルエンザウイルス NS1	DRLRR	35
インフルエンザウイルス NS1	PKQKKRK	36
肝炎ウイルスデルタ抗原	RKLKKKIKKL	37
マウス Mx1 タンパク質	REKKKFLKRR	38
ヒトポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ	KRKGDEV DGVDEVAKKKSKK	39
ステロイドホルモン受容体(ヒト)グルココルチコイド	RKCLQAGMNLEARKTKK	40

10

20

30

40

50

【 0 0 9 1 】

場合によっては、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼ方法のうちのいずれかは、細胞に、一本鎖又は二本鎖の DNA 修復鋳型を導入することを更に含むことができる。場合によっては、操作されたヌクレアーゼシステムは、一本鎖 DNA 修復鋳型を更に含む。場合によっては、操作されたヌクレアーゼシステムは、二本鎖 DNA 修復鋳型を更に含む。場合によっては、一本鎖又は二本鎖の DNA 修復鋳型は、5' から 3' の方向に、当該標的デオキシリボ核酸に対して 5' の、少なくとも 20 個のヌクレオチドの配列を含む第 1 の相同アーム、少なくとも 10 個のヌクレオチドの合成 DNA 配列、及び当該標的配列に対して 3' の、少なくとも 20 個のヌクレオチドの配列を含む第 2 の相同アームを含んでもよい。

【 0 0 9 2 】

場合によっては、第 1 の相同アームは、少なくとも 40、少なくとも 50、少なくとも 60、少なくとも 70、少なくとも 80、少なくとも 90、少なくとも 100、少なくとも 110、少なくとも 120、少なくとも 130、少なくとも 140、少なくとも 150、少なくとも 175、少なくとも 200、少なくとも 250、少なくとも 300、少なくとも 400、少なくとも 500、少なくとも 750、又は少なくとも 1000 個のヌクレオチドの配列を含む。場合によっては、第 2 の相同アームは、少なくとも 40、少なくとも 50、少なくとも 60、少なくとも 70、少なくとも 80、少なくとも 90、少なくとも 100、少なくとも 110、少なくとも 120、少なくとも 130、少なくとも 140、少なくとも 150、少なくとも 175、少なくとも 200、少なくとも 250、少なくとも 300、少なくとも 400、少なくとも 500、少なくとも 750、又は少なくとも 1000 個のヌクレオチドの配列を含む。

【 0 0 9 3 】

場合によっては、第1及び第2の相同アームは、原核生物のゲノム配列に対して相同である。場合によっては、第1及び第2の相同アームは、細菌のゲノム配列に対して相同である。場合によっては、第1及び第2の相同アームは、真菌のゲノム配列に対して相同である。場合によっては、第1及び第2の相同アームは、真核生物のゲノム配列に対して相同である。

【0094】

場合によっては、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼ方法のうちのいずれかは、細胞にDNA修復鋳型を導入することを更に含むことができる。DNA修復鋳型は、二本鎖DNAセグメントを含んでもよい。二本鎖DNAセグメントには、1つの一本鎖DNAセグメントが隣接していてもよい。二本鎖DNAセグメントには、2つの一本鎖DNAセグメントが隣接していてもよい。場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、二本鎖DNAセグメントの5'末端にコンジュゲートされる。場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、二本鎖DNAセグメントの3'末端にコンジュゲートされる。

【0095】

場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、1～15ヌクレオチド塩基の長さを有する。場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、4～10ヌクレオチド塩基の長さを有する。場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、4ヌクレオチド塩基の長さを有する。場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、5ヌクレオチド塩基の長さを有する。場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、6ヌクレオチド塩基の長さを有する。場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、7ヌクレオチド塩基の長さを有する。場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、8ヌクレオチド塩基の長さを有する。場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、9ヌクレオチド塩基の長さを有する。場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、10ヌクレオチド塩基の長さを有する。

【0096】

場合によっては、一本鎖DNAセグメントは、スペーサー配列内の配列に相補的なヌクレオチド配列を有する。場合によっては、二本鎖DNA配列は、バーコード、オープンリーディングフレーム、エンハンサー、プロモーター、タンパク質コード配列、miRNAコード配列、RNAコード配列、又は導入遺伝子を含む。

【0097】

場合によっては、本明細書に記載される配列同一性は、BLASTP、CLUSTALW、MUSCLE、若しくはMAFFTアルゴリズム、又はSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムパラメーターを用いたCLUSTALWアルゴリズムによって決定され得る。配列同一性は、3のワード長(W)、10の期待値(E)のパラメーター、及び11の存在、1の延長でギャップコストを設定しているBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用し、条件付き組成スコアマトリックス調整を使用した、当該BLASTP相同性検索アルゴリズムによって決定され得る。

【0098】

本開示のシステム又は方法は、例えば、核酸分子に結合する(例えば、配列特異的結合)、核酸編集(例えば、遺伝子編集)などの様々な用途に使用され得る。このようなシステム又は方法は、例えば、対象において疾患を引き起こす可能性のある遺伝的に受け継がれた突然変異に対処する(例えば、除去又は置換する)ため、細胞におけるその機能を確認するために遺伝子を不活性化するため、疾患を引き起こす遺伝子エレメントを検出する診断ツールとして(例えば、逆転写されたウイルスRNA若しくは疾患を引き起こす突然変異をコードする増幅されたDNA配列の切断を介して)、特定のヌクレオチド配列(例えば、細菌内の抗生物質耐性をコードする配列)を標的化するためのプローブと組み合わせた不活性化した酵素として、ウイルスゲノムを標的化することによってウイルスを不活性化するか、若しくは宿主細胞に感染できないようにするため、価値ある低分子、高分子、若しくは二次代謝産物を生じるように生物を操作するための遺伝子を加えるか、若しくは代謝経路を修正するため、進化的選択のための遺伝子駆動エレメントを確立するため、バイオセンサーとして外来低分子及びヌクレオチドによる細胞の摂動を検出するため使用

され得る。

【実施例】

【0099】

実施例1—TCAR遺伝子座での編集

本明細書に記載されるヌクレアーゼを使用して、CAR-T細胞（及び異種T細胞受容体を担持する他のT細胞様細胞）を産生するためのワークフローを開発した（図1）。したがって、T細胞受容体遺伝子座（例えば、TRAC遺伝子座）を標的化するためのヌクレアーゼ複合体を開発した。スパーサー配列（配列番号10～15）を、クラス2タイプIIエンドヌクレアーゼMG3-6（配列番号1）、又はSpCas9、又はクラス2、タイプVのエンドヌクレアーゼMG29-1（配列番号7）と組み合わせてTRAC遺伝子を標的化するために開発し、各酵素の対応するsgRNAに導入した（表1を参照のこと）。各TRAC標的化sgRNAを含有するRNP複合体を集合させ、（Stemcell Technologies Human T cell Isolation Kit #17951）を使用した負の選択によるPBMCからの精製、及びCD2/3/28ビーズ（Miltenyi T cell Activation/Expansion Kit #130-091-441）による活性化の後、4日間培養したヒトT細胞にヌクレオフェクトした（プログラムEO-115及びP3緩衝液を使用して、Lonza 4-D Nucleofectorを用いて、200,000個のT細胞）。TRAC遺伝子におけるインデル形成に対する次世代シーケンシング（NGS）（図2左）によって、かつ偽トランスフェクトされたT細胞と共にTCR発現に対するフローサイトメトリー（図2右）によって、細胞を解析した。NGS及びフローサイトメトリーの両方による解析は、インデル形成又はトランスフェクトされたT細胞におけるT細胞受容体発現の破壊の誘導について、MG3-6及びMG29-1がSpCas9と同等又はより良好であったことを示した。

【0100】

次に、TRAC遺伝子座へのCAR-T分子の標的組み込みを促進するための、上記のRNP複合体を使用した編集能力を試験した。TRAC遺伝子を標的化する5'及び3'相同アーム（例えば、配列番号23～24）が隣接したCAR-T分子を含む、ヌクレオチド配列を含むAAV-6ベクターを開発した。上記のMG29-1 RNPを使用したTRAC標的化を実施したが、次いで、トランスフェクション後にAAV-6ベクターの100,000個のベクターゲノム（vg）をT細胞に添加した。細胞を、TCR受容体について、及びCAR抗原結合ドメインの発現について、フローサイトメトリーを使用して解析した（図3）。フローサイトメトリーは、AAV-エンドヌクレアーゼの組み合わせで処置されたT細胞の約60%が、CAR抗原結合ドメインを発現したことを示した。AAV-6/CAR-T組み込み構築物と、TRACを標的化するMG3-6及びMG3-8 RNPを組み合わせた実験で、同様の結果を得た。

【0101】

実施例2—TCR様細胞におけるマルチプレックス編集

TRAC遺伝子座の修飾（例えば、CAR-T組み込み）と組み合わせて、他の遺伝子を修飾することが有利であり得る。したがって、本明細書に記載されるヌクレアーゼ複合体が、TRAC及び追加の遺伝子座を標的化する能力を決定した。1つのかかる遺伝子座は、NR3C1（別名、GR、又はグルココルチコイド受容体）遺伝子座であり、これは、グルココルチコイド薬剤に対する非応答性をCAR-T細胞に付与するように破壊するのに有利であり得る（例えば、グルココルチコイドで同時に治療されているがん患者の場合、又はグルココルチコイド維持を必要とする自己免疫障害を有するがん患者の場合）。3つのMG29-1適合性標的化配列（標的B-D；配列番号20、21、22）を、NR3C1遺伝子を標的化するように設計し、MG29-1ガイドRNAに組み入れた。これらのガイドRNAを有するMG29-1を含むRNP複合体を集合させた。上記のMG29-1/NR3C1 gRNA RNP複合体及びMG3-6/TRAC RNPの様々な組み合わせを用いたヌクレオフェクションによって、T細胞を処理した（図4）。ヌ

クレオフェクション後にNGSを使用して細胞を解析して、各遺伝子座におけるインデル形成を評価した。結果は、異なるガイドRNAが、NR3C1を標的化する異なる効率を有した一方で（「MG29-1 GR-13」、「MG29-1 GR-28」、「MG29-1 GR-29」を参照のこと）、TRACを標的化するMG3-6複合体及びNR3C1を標的化するMG29-1複合体の組み合わせが、両方の遺伝子におけるインデル形成を効率的に誘導することができたことを示した（図4の右端の3つの条件を参照のこと）。

【0102】

本明細書に記載されるヌクレアーゼ複合体を使用して2つの異なる遺伝子座を標的化する能力を確立した後、3つの遺伝子座（例えば、TRAC、遺伝子座B-29／配列番号16、遺伝子座C-87／配列番号17、遺伝子座C-74／配列番号18、又は遺伝子座C-83／配列番号19から選択される）を標的化する能力を、遺伝子座の各々に対応するRNPを単独で、及び3つを組み合わせ、上記のように、T細胞にヌクレオフェクトし、NGSによってインデル形成を評価することによって評価した（図5を参照のこと）。この実験の結果は、異なる遺伝子座を標的化する3つの異なるRNPを組み合わせた条件でさえ、3つ全ての遺伝子座におけるインデルが、かなりの量で産生されたことを示した。

10

【0103】

実施例3-多重遺伝子置換を伴うマルチプレックス編集

複数の遺伝子座を編集し、導入遺伝子を少なくとも1つの遺伝子座に組み込む能力を確立した後、2つ以上の遺伝子座を同時に編集し、両方の遺伝子座における遺伝子を同時に組み込む能力を、T細胞内の2つの異なる遺伝子座を編集し、2つの異なる遺伝子座を標的化する2つの異なるドナーDNA鋳型を提供することによって試験した。上記のAAVS1（セーフハーバー）遺伝子座及びTRAC遺伝子座を標的部位として選択した。実施例1及び2にあるように調製された初代T細胞（ 2×10^5 ）を、（a）SpCas9（12 pmol）、及びAAVS1遺伝子座を標的化する適合性sgRNA（60 pmol、配列番号41はスペーサー配列を示す）、並びに（b）MG3-6（52 pmol）、及び適合性TRAC3-6 sgRNA（60 pmol、配列番号10）の組み合わせでヌクレオフェクトした。ヌクレオフェクション後、細胞を、2つの異なるAAV-6ベクター：（a）AAVS1遺伝子座を標的化する5'及び3'相同アーム（配列番号42及び43）が隣接した、GRの4つの異なるアイソフォーム（GR-アルファ、GR-ベータ、GR-アルファD3、及びGR-ベータD3）の各々を含む導入遺伝子を担持するもの、並びに（b）TRAC遺伝子座を標的化する5'及び3'相同アーム（配列番号23〜24）が隣接した、CARを担持するものと、各々50,000の多重感染度（MOI）でインキュベートした。4日間のインキュベーション後、T細胞を、（a）AAVS1遺伝子座でのGR導入遺伝子の存在に対するPCR（PCRの設計及び結果については図6を参照のこと）、又は（b）TRAC遺伝子座でのCARの組み込みを評価するための、CAR抗原結合ドメイン及びT細胞受容体に対するフローサイトメトリーによって解析した（図7）。PCR及びフローサイトメトリー実験からのデータは、両方の導入遺伝子（GR及びCAR）が、性能の大幅な喪失なしに同時に挿入され得ることを示し、二重AAVS1／TCR標的化条件下でのGR導入遺伝子に対するPCR（中央の4つのレーン、図6B）は、AAVS1標的化単独（最後の4つのレーン、図7B又は中央の4つのレーン、図7C）と類似した組み込み結果を示したが、TCRに対するフローサイトメトリー（図7A、7B、7C、7D）は、AAVS1が同時に標的化された場合でさえ、CARの高い組み込み及びTCRの喪失を示した。

20

30

40

【0104】

実施例4-ゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析による特異性解析

MG3-6、MG3-8、及びMG29-1の標的特異性を、SpCas9（「Cas9」）と共にゲノムワイドなオフターゲット二本鎖切断解析を介して評価した。結果を図8に示す。結果は、MG3-6、MG3-8、及びMG29-1が、Cas9よりも低い

50

レベルのオフターゲット編集を有したことを示した。

【0105】

実施例5-T細胞におけるマルチプレックス編集

組換えTCRベースのT細胞生成物を作製することは、TCRの新しく、望ましいアルファ鎖及びベータ鎖をT細胞のプールに導入することを必要とし、これは、a/b鎖が、抗原特異的認識を与えるTCRのサブユニットであるためである。これらの新しいa/b鎖は、次いで、デルタ/ガンマ/イプシロン鎖と集合して、活性で完全なTCRを作製することができる(図9を参照のこと)。残念なことに、この単純な場合、既存のa/b鎖は、レシピエント細胞においてまだ発現されている。これは、既存のアルファが新しいベータと対形成することができ、新しいアルファが既存のベータと対形成することができるという望ましくない可能性を持ち込み、例えば、新しく、望ましいTCR a/b鎖は、それらが一緒に対形成すること「ことになっている」ことを知らない。更なる作用なしに、T細胞はここで、4つの異なるTCR(a/b、a'/b、a/b'、a'/b')を発現し、1つは、操作された特異性を有する。これは、2つの問題を引き起こす:i)新しく、望ましいTCRの発現を4倍低減する、ii)2つのハイブリッドa/b対(a'/b及びa/b')は、予測不可能な、潜在的に自己反応性の様式で抗原を認識するため、自己免疫のリスクをもたらす。

【0106】

この実験では、CD2/3/28ビーズで増殖した一次T細胞を、Lonza 4Dエレクトロポレーター及び溶液P3を使用して、1条件当たり200K細胞を使用してヌクレオフェクトし、104pmolのMG3-6タンパク質及び128pmolのガイドRNA、又は同量のタイプV酵素MG29-1、又はMG3-6及びMG29-1の両方を送達した。使用したMG3-6ガイドは、MG3-6-TRAC-6(配列番号44)及びMG3-6-TRBC(配列番号45)であり、長さは、22ntである。ゲノムDNAを、これらの細胞から3日後に回収し、NGSによって解析した(図10を参照のこと)。インデルを有する標的部位での配列の割合を示す図10の結果は、両方の部位を標的化するRNPが同時に細胞に導入される場合に、これらの細胞において二重TRAC/TRBCノックアウトがあることを実証する。

【0107】

実施例6-単一遺伝子ノックアウトに対するフローサイトメトリーによる遺伝子編集結果

初代T細胞を、製造元の推奨に従って、負の選択キット(Miltenyi)を使用して、PBMC(末梢血単核細胞)から精製した。Lonza 4Dエレクトロポレーターを使用して、RNP(100pmolのタンパク質/150pmolのガイドRNA)のT細胞(200,000)へのヌクレオフェクションを実施した。フローサイトメトリーによる解析のために、ヌクレオフェクションの3日後、100,000個のT細胞を抗CD3及び抗B2M抗体で4℃において30分間染色し、Attune NxTフローサイトメーターで解析した(図11)。TCR及びB2Mのノックアウトを評価する、4つの表現型の各々を含有する解析された細胞の割合を示す図11は、(a)TCR標的化条件の全てが、TCRノックアウトを効率的にもたらし、MG3-6 TRAC6及びMG3-6 TRBC E2 sgRNAが、最も効率的なTCRノックアウトをもたらしたこと、並びに(b)B2M標的化条件の全てが、B2Mノックアウトをもたらし、B2MH1及びB2MD2が、最も効率的なB2Mノックアウトをもたらしたことを示す。

【0108】

実施例7-二重遺伝子ノックアウトに対するフローサイトメトリーによる遺伝子編集結果

実施例6において単独でTCR/B2M標的化条件の性能を評価した後、条件の組み合わせを使用した同時二重切断も、TRAC及びB2M標的化について試験した(図12)。初代T細胞を、製造元の推奨に従って、負の選択キット(Miltenyi)を使用してPBMCから精製した。Lonza 4Dエレクトロポレーターを使用して、RNP(

100 pmolのタンパク質／150 pmolのガイドRNA)のT細胞(200,000)へのヌクレオフェクションを実施した。フローサイトメトリーによる解析のために、ヌクレオフェクションの3日後、100,000個のT細胞を抗CD3及び抗B2M抗体で4℃において30分間染色し、Attune NxTフローサイトメーターで解析した(図12)。TCR及びB2Mのノックアウトを評価する、4つの表現型の各々を含有する解析された細胞の割合を示す図12は、最も効率的な二重標的化条件が、MG29-1 B2M H1、D2、又はA3条件と共にMG3-6 TRAC6条件を伴う、A4、B4、及びC4であったことを示す。最も効率的な二重標的化条件は、MG3-6 TRAC6 sgRNA及びMG29-1 B2M D2 sgRNAを使用したB4であるように見えた。

10

【0109】

実施例8-三重遺伝子ノックアウトに対するフローサイトメトリーによる遺伝子編集結果。

実施例6及びにおいて単独で、及び実施例7において二重で、TCR／B2M標的化条件の性能を評価した後、条件の組み合わせを使用した同時二重切断も、同時のTRAC、TRBC、及びB2M標的化について試験した。初代T細胞を、製造元の推奨に従って、負の選択キット(Miltenyi)を使用してPBMCから精製した。Lonza 4DEレクトロポレーターを使用して、RNP(100 pmolのタンパク質／150 pmolのガイドRNA)のT細胞(200,000)へのヌクレオフェクションを実施した。フローサイトメトリーによる解析のために、ヌクレオフェクションの3日後、100,000個のT細胞を抗CD3及び抗B2M抗体で4℃において30分間染色し、Attune NxTフローサイトメーターで解析した(図13)。フローサイトメトリーの結果は、条件B2、E1、及びF1が、ノックアウトのための最も効率的な三重標的化条件であったことを示す。

20

【0110】

細胞を回収し、トランスフェクションの5日後にゲノムDNAを調製した。NGSベースのDNAシーケンシングでの使用に適したPCRプライマーを作製し、最適化し、各ガイドRNAの個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンをIllumina MiSeqマシン上で配列決定し、独自のPythonスクリプトを用いて解析して、遺伝子編集を測定した(図14)。ここでのシーケンシング結果は、インデルが必ずしも遺伝子の機能的破壊を反映しない可能性があるため(フローサイトメトリーによって測定されるように)、図13の結果と矛盾した。

30

【0111】

40

50

【表 3】

表 3：実施例 8 で使用した gRNA の組み合わせ

名称	gRNA の組み合わせ
A1	MG3-6 TRAC 6 MG3-6 TRBC E2 MG29-1 B2M H1
B1	MG3-6 TRAC 6 MG3-6 TRBC E2 MG29-1 B2M D2
C1	MG3-6 TRAC 6 MG3-6 TRBC E2 MG29-1 B2M A3
A3	MG3-6 TRAC 6 MG29-1 TRBC G2 MG29-1 B2M H1
B3	MG3-6 TRAC 6 MG29-1 TRBC G2 MG29-1 B2M D2
C3	MG3-6 TRAC 6 MG29-1 TRBC G2 MG29-1 B2M A3
D1	MG29-1 TRAC 35 MG3-6 TRBC E2 MG29-1 B2M H1
E1	MG29-1 TRAC 35 MG3-6 TRBC E2 MG29-1 B2M D2
F1	MG29-1 TRAC 35 MG3-6 TRBC E2 MG29-1 B2M A3
D3	MG29-1 TRAC 35 MG29-1 TRBC G2 MG29-1 B2M H1
E3	MG29-1 TRAC 35 MG29-1 TRBC G2 MG29-1 B2M D2
F3	MG29-1 TRAC 35 MG29-1 TRBC G2 MG29-1 B2M A3
A2	MG3-6 TRAC 6 MG29-1 TRBC A1 MG29-1 B2M H1
B2	MG3-6 TRAC 6 MG29-1 TRBC A1 MG29-1 B2M D2
C2	MG3-6 TRAC 6 MG29-1 TRBC A1 MG29-1 B2M A3
A4	MG3-6 TRAC 6 MG29-1 B2M H1
B4	MG3-6 TRAC 6 MG29-1 B2M D2
C4	MG3-6 TRAC 6 MG29-1 B2M A3
D2	MG29-1 TRAC 35 MG29-1 TRBC A1 MG29-1 B2M H1
E2	MG29-1 TRAC 35 MG29-1 TRBC A1 MG29-1 B2M D2
F2	MG29-1 TRAC 35 MG29-1 TRBC A1 MG29-1 B2M A3
D4	MG29-1 TRAC 35 MG29-1 B2M H1
E4	MG29-1 TRAC 35 MG29-1 B2M D2
F4	MG29-1 TRAC 35 MG29-1 B2M A3

【0112】

したがって、シーケンシングによって三重ノックアウト細胞の生成を検証するために、追加の解析を実施した（図 15 を参照のこと）。三重ノックアウト細胞の生成が成功したことを実証するデータを図 15 に示す。「編集」列のデータは、図 14 から取得され、「野生型」列のデータは、100%から編集の割合を引いたものである。二重及び三重ノックアウトの最小（Min.）頻度を、個々の細胞における編集事象間の最小の重複を仮定して計算する。したがって、TRBC と B2M との間の最小の二重ノックアウト頻度は、100%から、TRBC についての野生型の細胞の割合及び B2M についての野生型の細胞の割合を引いたものである。したがって、最小の三重ノックアウト頻度は、100%から、二重ノックアウトを含有しない可能性がある細胞の割合から、TRAC についての野生型の細胞の割合を引いたものである。観察された高い編集頻度は、編集事象の全てが別々の細胞において生じた可能性を除外する。したがって、図 15 のデータは、三重ノックアウト TRAC / TRBC / B2M 細胞の作製に成功したことを実証する。

【0113】

実施例 9－編集された T 細胞における GFP マーカー及び表面マーカーの発現

初代ヒト T 細胞を、製造元の推奨に従って、負の選択キット (Milt eny i) を使用して P B M C から精製した。L o n z a 4 D エレクトロポレーターを使用して、M G 3－6 m R N A (5 0 0 n g / 1 5 0 p m o l ガイド)、M G 2 9－1 R N P (1 0 0 p m o l / 1 5 0 p m o l ガイド)、及び／又は S p C a s 9 R N P (1 2 p m o l / 6 0 p m o l ガイド) の T 細胞 (2 0 0, 0 0 0) へのヌクレオフェクションを実施した。ヌクレオフェクション後、A A V－6 を含有する培地中で細胞を直ちに回収した (5 0, 0 0 0 M O I)。使用した A A V ベクターには、(a) M G 3－6－T R A C－6 (配列番号 6 4) 又は M G 2 9－1－T R A C－3 5 (配列番号 6 5) の切断部位に対応する相同アームが隣接した、M S C V プロモーター駆動の短縮型低親和性神経成長因子受容体 (t L N G F R) コード配列を送達する A A V ベクター、及び (b) M a l i e t a l. A A V S 1 T 2 (配列番号 6 3) の切断部位に対応する相同アームが隣接した、上皮成長因子受容体の短縮型 (t E G F R) と共に、G F P をコードする M N D プロモーター駆動の多シストロン性構築物を送達する A A V ベクターが含まれる。トランスフェクションの 4 日後、生存率 (L i v e / D e a d F i x a b l e A q u a C e l l S t a i n K i t ; T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c)、並びに t L N G F R (C D 2 7 1) (V i o B l u e R E A f i n i t y (商標)、クローン R E A 8 4 4 ; M i l t e n y i B i o t e c h)、t E G F R (C e t u x i m a b B i o s i m i l a r、A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7、クローン H u 1 ; R & D S y s t e m s)、及び T C R a / b (B r i l l i a n t V i o l e t 7 8 5、クローン I P 2 6 ; B i o L e g e n d) の発現について、1 0 0, 0 0 0 個の細胞を染色した。細胞を 4℃で 3 0 分間染色し、A t t u n e N x T フローサイトメーターでデータを取得した。t L N G F R、G F P、t E G F R、及び／又は T C R a / b を発現する細胞を、単一の生細胞上でゲーティングした (図 1 6)。

10

20

【0114】

実施例 10－編集された T 細胞における A A V S 1 部位でのインデル解析

初代 T 細胞を、製造元の推奨に従って、負の選択キット (Milt eny i) を使用して P B M C から精製した。L o n z a 4 D エレクトロポレーターを使用して、M G 3－6 m R N A (5 0 0 n g / 1 5 0 p m o l ガイド)、M G 2 9－1 R N P (1 0 0 p m o l / 1 5 0 p m o l ガイド)、及び／又は S p C a s 9 R N P (1 2 p m o l / 6 0 p m o l ガイド) の T 細胞 (2 0 0, 0 0 0) へのヌクレオフェクションを実施した。ヌクレオフェクション後、A A V－6 を含有する培地中で細胞を直ちに回収した (5 0, 0 0 0 M O I)。使用した A A V ベクターには、M G 3－6－T R A C－6 又は M G 2 9－1－T R A C－3 5 の切断部位に対応する相同アームが隣接した、M S C V プロモーター駆動の短縮型低親和性神経成長因子受容体 (t L N G F R) コード配列、G F P をコードする M N D プロモーター駆動の多シストロン性構築物、及び M a l i e t a l. A A V S 1 T 2 の切断部位に対応する相同アームが隣接した、上皮成長因子受容体の短縮型 (t E G F R) が含まれる。細胞を回収し、トランスフェクションの 4 日後にゲノム DNA を調製した。N G S ベースの DNA シーケンシングでの使用に適した P C R プライマーを生成し、最適化し、これらの実験で使用した異なる A A V S 1 部位特異的 R N A ガイドの標的部位を含む領域を増幅するために使用した。アンプリコンを I l l u m i n a M i S e q マシン上で配列決定し、独自の P y t h o n スクリプトを用いて解析して、遺伝子編集を測定した (図 1 7)。結果は、T R A C 及び A A V S 1 の最も効率的な二重標的化条件が、s g R N A F 3 を有する M G 2 9－1 及び s g R N A T R A C 3－6 # 6 を有する M G 3－6 を伴う条件であったことを示した。

30

40

【0115】

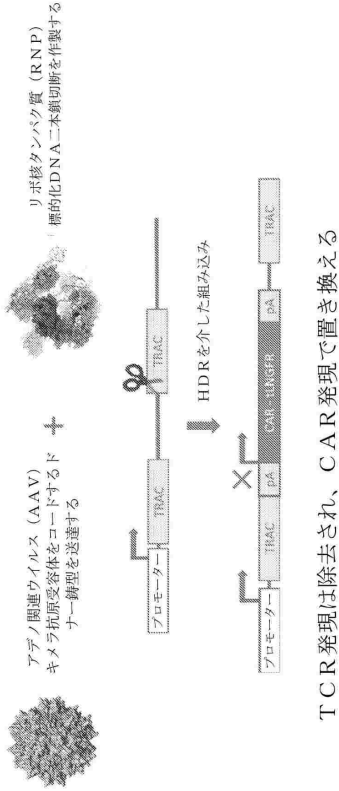
本発明の好ましい実施形態は本明細書に示され、記載されるが、このような実施形態が、例示の目的でのみ提供されることは、当業者には明らかであろう。本発明は、本明細書内で提供される特定の実施例によって限定されることは意図されていない。本発明は前述の説明を参照して記載されているが、本明細書の実施形態の記載及び説明は、限定された

50

意味で解釈されることを意図していない。多数の変形、変更、及び置換は、ここで、本発明から逸脱することなく、当業者にとって生じるであろう。更に、本発明の全ての態様は、様々な条件及び変数に依存する、本明細書に記載される特定の描写、構成又は相対的割合に限定されないことが理解されよう。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替が、本発明の実施に用いられ得ることは、理解されるべきである。したがって、本発明は、こうした任意の代替、修正、変形、又は均等物も包含することが企図される。以下の特許請求の範囲は、本発明の範囲、及びそれによって包含されるこれらの請求の範囲及びそれらの均等物内のその方法及び構造を定義することが意図される。

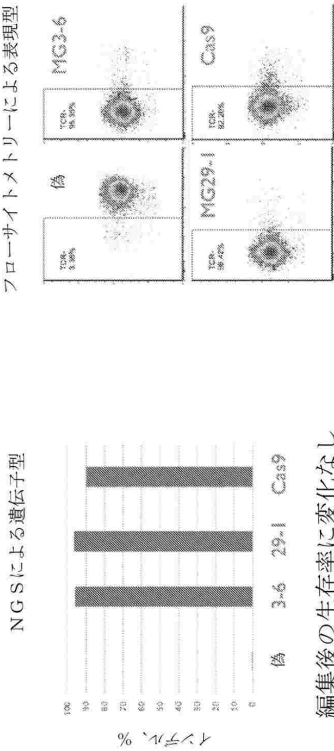
【図面】
【図 1】

同種CAR-T細胞を作製するための遺伝子編集



【図 2】

MGスクレアラゼは、T細胞-TTRACにおいて高度に活性である



10

20

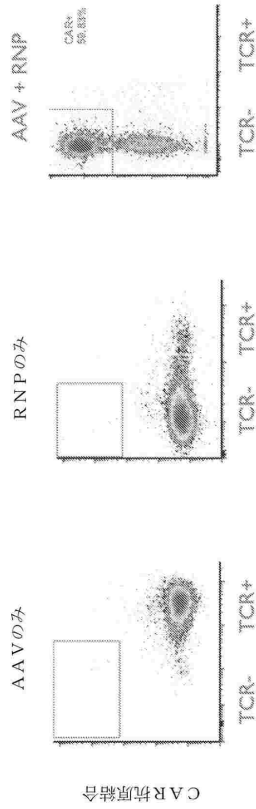
30

40

50

【圖 3】

MG3-6との標的CAR組み込み

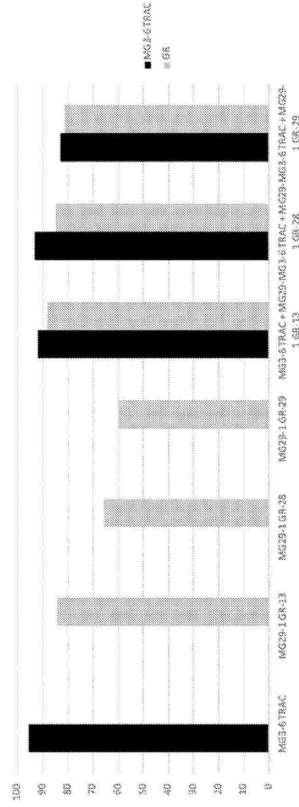


CAR組み込みは、T細胞受容体の発現を破壊する

MG 3-6、MG 3-8、及びMG 29-I
と協働する

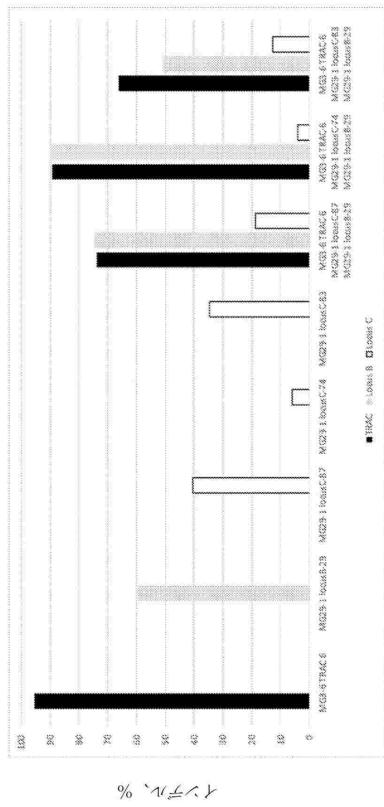
【図 4】

T細胞におけるマルチプレックス遺伝子編集集



【図 5】

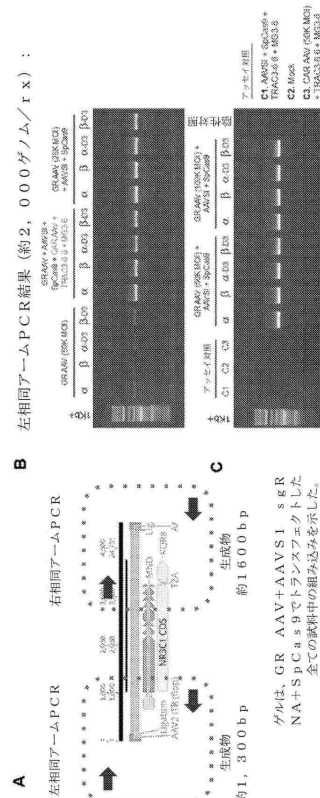
MGシステムにわたるマルチプレックス編集集



【図 6】

結果

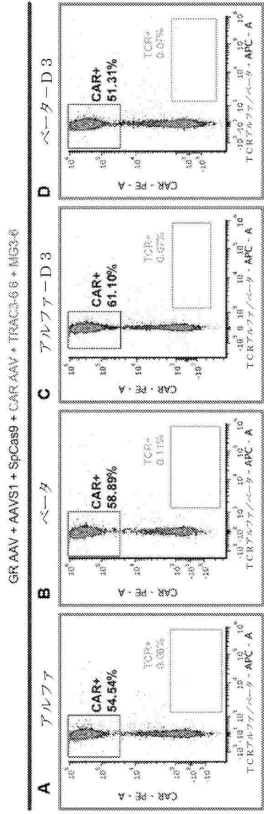
- ・ イン及びアウトPCRは、染色体19のAAVS I部位におけるGR AAVの細み込みを検出する



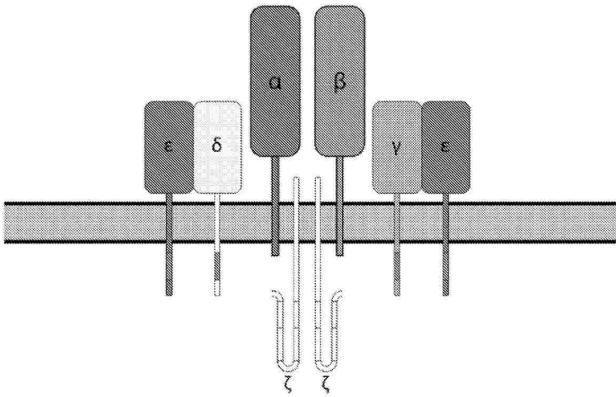
【図 7】

結果-フローサイトメトリー

・ CAR及びTCRアルファ/ベータ受容体に特異的な抗体を使用した、トランスジェクトされたT細胞のフローサイトメトリー

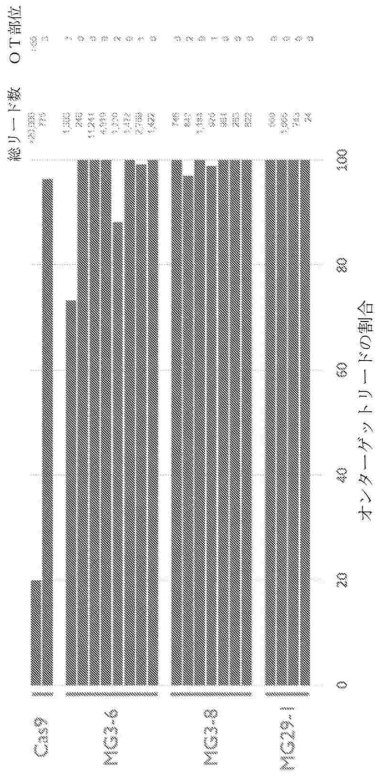


【図 9】

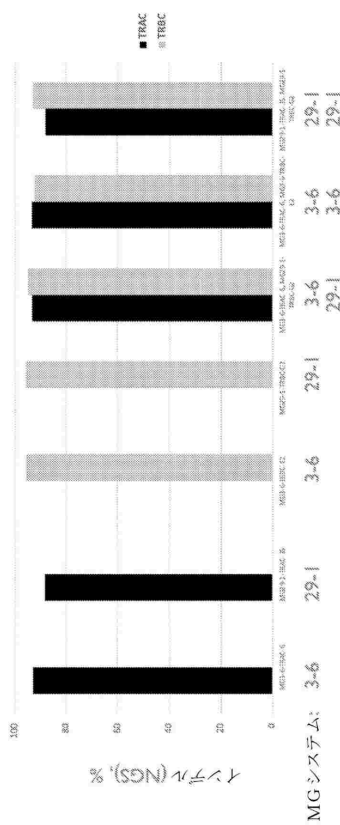


【図 8】

ゲノムワイドなDSB解析による特異性解析



【図 10】



10

20

30

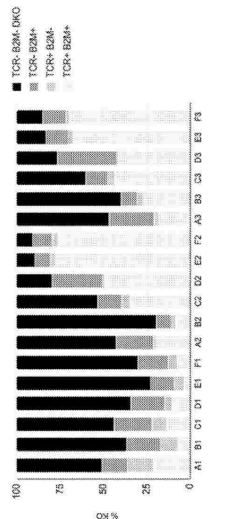
40

50

三重TRAC/TRBC/B2M遺伝子編集－フロー

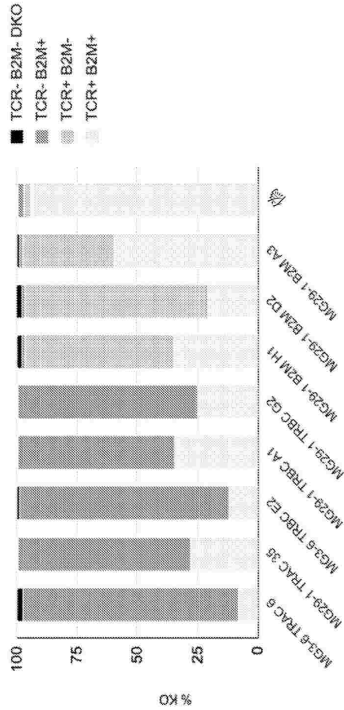
【図 1 3】

使用したガイドRNAの組み合わせ



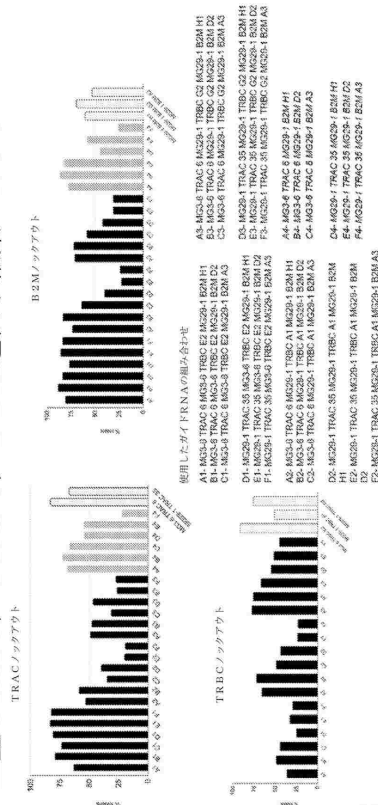
単一遺伝子KO対照

【図 1 1】



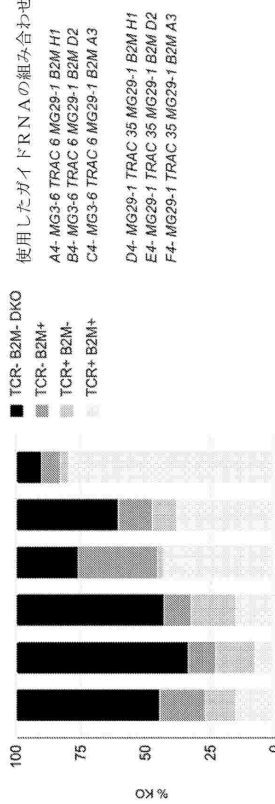
三重TRAC/TRBC/B2M遺伝子編集－NGS

【図 1 4】



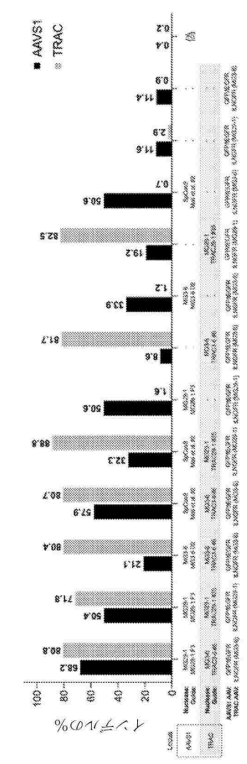
二重TRAC/B2M遺伝子編集

【図 1 2】



【図 1 7】

編集された T 細胞における AAVS 1 部位でのインデル解析



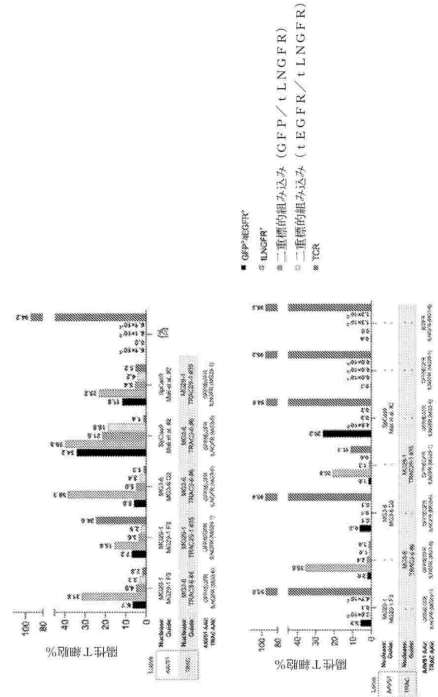
三重TRAC/TRBC/B2M NGS KO解析

【図 1 5】

試料 B 1	編集	野生型	試料 B 2	編集	野生型
TRAC, %	79	21	TRAC, %	59	41
TRBC, %	49	51	TRBC, %	72	28
B2M, %	89	11	B2M, %	84	16
最小, TRBC B2M dKO, %	39	61	最小, TRBC B2M dKO, %	56	44
最小, TRAC TRBC B2M dKO, %	17		最小, TRAC TRBC B2M dKO, %	15	

【図 1 6】

編集された T 細胞における GFP マーカー及び表面マーカーの発現



10

20

30

40

50

【配列表】

2024515936000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/021004
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 9/22(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/10(2006.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 9/22(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/11(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: multiplex editing, type II Cas endonuclease, type V Cas endonuclease, guide RNA, spacer, glucocorticoid-resistant T cell, TCR locus (T-cell receptor locus), NR3C1 locus (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1 locus), CAR (chimeric antigen receptor), CRISPR/Cas		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO 2020-240523 A1 (THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY OF TORONTO) 03 December 2020 (2020-12-03) abstract; claim 1; and paragraphs [0003], [0008], [0010], [0041], [0042], [0098]	1-3,49 50-52 19-21,42-44,47,60-73
Y	US 2020-0332274 A1 (METAGENOMI IP TECHNOLOGIES, LLC) 22 October 2020 (2020-10-22) paragraphs [0004], [0011]	50-52
X Y	NCBI Reference Sequence: GQ380658.1, AAVS1 targeting vector pA1.GFP.A2, complete sequence, 16 September 2009 the whole document	67,70-73 68,69
☒ 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 07 July 2022		Date of mailing of the international search report 07 July 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-5373

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

International application No.

PCT/US2022/021004

Category*

Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to claim No.

Y

MO, FENGZHEN et al., "Nanobody-based chimeric antigen receptor T cells designed by CRISPR/Cas9 technology for solid tumor immunotherapy", *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 25 February 20 21 (Online publication date), Vol. 6, Article No. 80, Internal pages 1-12
abstract; and figure 2

68,69

A

KAUEFERLE, THERESA et al., "CRISPR-Cas9-mediated glucocorticoid resistance in virus-specific T cells for adoptive T cell therapy posttransplantation", *Molecular Therapy*, September 2020, Vol. 28, No. 9 , pages 1965-1973

1-3,19-21,42-44
,47,49-52,60-73

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/021004
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 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).	
2.	☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	
3.	Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/021004
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:	10
2.	☒ Claims Nos.: 10,12,14,16,30,41 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: As claims 10, 12, 14, 16, 30 and 41 refer to one of claims which are not drafted in accordance with PCT Rule 6.4(a), the claims are unclear (PCT Article 6).	
3.	☒ Claims Nos.: 4-9,11,13,15,17,18,22-29,31-40,45,46,48,53-59 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	20
		30
		40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2022/021004

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020-240523	A1	03 December 2020	CA	3142230	A1	03 December 2020
				GB	201907733	D0	17 July 2019
US	2020-0332274	A1	22 October 2020	AU	2020-223370	A1	07 October 2021
				CA	3130135	A1	20 August 2020
				CN	113728098	A	30 November 2021
				EP	3924482	A1	22 December 2021
				GB	202010770	D0	26 August 2020
				GB	2594339	A	27 October 2021
				KR	10-2021-0139254	A	22 November 2021
				US	10913941	B2	09 February 2021
				US	10982200	B2	20 April 2021
				US	2020-0332273	A1	22 October 2020
				US	2022-0033791	A1	03 February 2022
				WO	2020-168291	A1	20 August 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2019)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/48 M	

(32)優先日 令和3年9月8日(2021.9.8)

(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,JM,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. PYTHON

- (72)発明者 デヴォート, オードラ
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5
- (72)発明者 バターフィールド, クリスティーナ
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5
- (72)発明者 アレクサンダー, リサ
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5
- (72)発明者 ゴルツマン, ダニエラ エス., エー.
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5
- (72)発明者 コスト, グレッグ
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5
- (72)発明者 ラモット, レベッカ
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5
- (72)発明者 エスピノサ, ディエゴ
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5
- F ターム (参考) 2G045 AA24 CB01 FA37
4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 CA44