

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-512703
(P2022-512703A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783		4 C 0 8 7
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全197頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-520915(P2021-520915)	(71)出願人	518196169		
(86)(22)出願日	令和1年10月15日(2019.10.15)		インテリア セラピューティクス, イン		
(85)翻訳文提出日	令和3年6月7日(2021.6.7)		コーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2019/056399		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0		
(87)国際公開番号	WO2020/081613		2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー スト		
(87)国際公開日	令和2年4月23日(2020.4.23)		リート 4 0, スイート 1 3 0		
(31)優先権主張番号	62/746,522	(74)代理人	100092783		
(32)優先日	平成30年10月16日(2018.10.16)		弁理士 小林 浩		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100093676		
(31)優先権主張番号	62/747,037		弁理士 小林 純子		
(32)優先日	平成30年10月17日(2018.10.17)	(74)代理人	100120134		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 大森 規雄		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100196966		
	最終頁に続く		弁理士 植田 渉		
		(74)代理人	100104282		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫療法のための組成物および方法

(57)【要約】

T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／またはT R A C 遺伝子内のD N A 配列を編集、例えば改変するための組成物および方法が提供される。
例えば、免疫療法のための組成物および方法が提供される。
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T R B C 1 遺伝子および／または T R B C 2 遺伝子内の D N A 配列を改変する方法であって、

組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

(a) 以下から選択される配列を含むガイド R N A :

i . 配列番号 1 ～ 8 9 から選択されるガイド配列 ;

i i . 配列番号 1 ～ 8 9 から選択される配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、または少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチド ;

i i i . 配列番号 1 ～ 8 9 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 1 %、または少なくとも 9 0 % の同一性を有するガイド配列 ;

i v . 配列番号 1 ～ 2 4 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; および

v . 配列番号 1 ～ 6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; または

(b) (a) のガイド R N A をコードする核酸 ; 並びに、所望により

(c) R N A ガイド型 D N A 結合剤または R N A ガイド型 D N A 結合剤をコードする核酸、

を含む、方法。

【請求項 2】

D N A 配列を改変する方法であって、

組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

(a) 以下から選択される配列を含むガイド R N A :

i . 配列番号 1 ～ 8 9 および配列番号 1 7 9 ～ 1 8 4 についての、表 1 および／または表 3 のいずれかに記載されたゲノムコーディネートの 1 5 個の連続ヌクレオチド ± 1 0 個のヌクレオチドを含む配列 ;

i i . (i) からの配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、または少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチド ;

i i i . (i) から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 1 %、または少なくとも 9 0 % の同一性を有するガイド配列 ;

(b) (a) のガイド R N A をコードする核酸 ; 並びに、所望により

(c) R N A ガイド型 D N A 結合剤または R N A ガイド型 D N A 結合剤をコードする核酸、

を含む、方法。

【請求項 3】

T R B C 1 遺伝子および／または T R B C 2 遺伝子の発現を減少させる方法であって、

組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

a . 以下から選択される配列を含むガイド R N A :

i . 配列番号 1 ～ 8 9 から選択されるガイド配列 ;

i i . 配列番号 1 ～ 8 9 から選択される配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、または少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチド ;

i i i . 配列番号 1 ～ 8 9 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 1 %、または少なくとも 9 0 % の同一性を有するガイド配列 ;

- i v . 配列番号 1 ～ 2 4 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および
- v . 配列番号 1 ～ 6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または
- b . (a) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により
- c . RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含む、方法。

【請求項 4】

免疫療法の方法であって、
組成物を対象、その自己細胞、および／または同種細胞に投与することを含み、
前記組成物が、

- a . 以下から選択される配列を含むガイド RNA：
 - i . 配列番号 1 ～ 8 9 から選択されるガイド配列；
 - i i . 配列番号 1 ～ 8 9 から選択される配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、または少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチド；
 - i i i . 配列番号 1 ～ 8 9 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 1 %、または少なくとも 9 0 % の同一性を有するガイド配列；
 - i v . 配列番号 1 ～ 2 4 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および
 - v . 配列番号 1 ～ 6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または
 - b . (a) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により
 - c . RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含む、方法。

【請求項 5】

T R A C 遺伝子内の DNA 配列を改変する方法であって、
組成物を細胞に送達することを含み、
前記組成物は、

- a . 以下から選択される配列を含むガイド RNA：
 - i . 配列番号 9 0 ～ 1 7 8、配列番号 1 8 5、および配列番号 2 1 3 ～ 2 1 8 から選択されるガイド配列；
 - i i . 配列番号 9 0 ～ 1 7 8、配列番号 1 8 5、および配列番号 2 1 3 ～ 2 1 8 から選択される配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、または少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチド；
 - i i i . 配列番号 9 0 ～ 1 7 8、配列番号 1 8 5、および配列番号 2 1 3 ～ 2 1 8 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 1 %、または少なくとも 9 0 % の同一性を有するガイド配列；
 - i v . 配列番号 9 0 ～ 1 1 3、配列番号 1 8 5、および配列番号 2 1 3 ～ 2 1 8 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；並びに
 - v . 配列番号 9 0 ～ 9 5 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または
 - b . (a) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により
 - c . RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含む、方法。

【請求項 6】

DNA 配列を改変する方法であって、
組成物を細胞に送達することを含み、
前記組成物は、

- (a) 以下から選択される配列を含むガイド RNA：
 - i . 配列番号 9 0 ～ 2 1 8 についての、表 2 および／または 3 のいずれかに記載されたゲノムコーディネートの 1 5 個の連続ヌクレオチド ± 1 0 個のヌクレオチドを含む配列；
 - i i . (i) からの配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、ま

たは少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

i i i. (i) から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列；

(b) (a) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により

(c) RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含む、方法。

【請求項 7】

10

TRAC 遺伝子の発現を減少させる方法であって、
組成物を細胞に送達することを含み、
前記組成物は、

a. 以下から選択される配列を含むガイド RNA：

i. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択されるガイド配列；

i i. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

i i i. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列；

20

i v. 配列番号 90～113、配列番号 185、および配列番号 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；並びに

v. 配列番号 90～95 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または

b. (a) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により

c. RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含む、方法。

【請求項 8】

30

免疫療法の方法であって、
組成物を対象、その自己細胞、および／または同種細胞に投与することを含み、
前記組成物が、

a. 以下から選択される配列を含むガイド RNA：

i. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択されるガイド配列；

i i. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

i i i. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列；

40

i v. 配列番号 90～113、配列番号 185、および配列番号 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；並びに

v. 配列番号 90～95 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または

b. (a.) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により

c. RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含む、方法。

【請求項 9】

50

TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／または TRAC 遺伝子内の DNA 配列を改変する方法であって、

細胞に、第一ガイド RNA と、第二ガイド RNA と、所望により、RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸と、を送達することを含み、前記第一ガイド RNA が、

i. 配列番号 1～89 から選択されるガイド配列；
ii. 配列番号 1～89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

iii. 配列番号 1～89 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；

iv. 配列番号 1～24 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および

v. 配列番号 1～6 のいずれか 1 つを含むガイド配列、
から選択される配列を含み、

前記第二ガイド RNA が、

vi. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択されるガイド配列；

vii. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

viii. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；

ix. 配列番号 90～113、配列番号 185、および配列番号 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；並びに

x. 配列番号 90～95 のいずれか 1 つを含むガイド配列、
から選択される配列を含む、方法。

【請求項 10】

TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／または TRAC 遺伝子の発現を減少させる方法であって、

細胞に、第一ガイド RNA と、第二ガイド RNA と、所望により、RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸と、を送達することを含み、前記第一ガイド RNA が、

i. 配列番号 1～89 から選択されるガイド配列；

ii. 配列番号 1～89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

iii. 配列番号 1～89 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；

iv. 配列番号 1～24 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および

v. 配列番号 1～6 のいずれか 1 つを含むガイド配列、
から選択される配列を含み、

前記第二ガイド RNA が、

i. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択されるガイド配列；

ii. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくと

10

20

30

40

50

も 20 個の連続ヌクレオチド；

i i i . 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列；

i v . 配列番号 90～113、配列番号 185、および配列番号 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；並びに

v . 配列番号 90～95 のいずれか 1 つを含むガイド配列、
から選択される配列を含む、方法。

【請求項 11】

免疫療法の方法であって、

組成物を対象、その自己細胞、または同種細胞に投与することを含み、

前記組成物は、第一ガイド RNA と、第二ガイド RNA と、所望により、RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸とを含み、

前記第一ガイド RNA が、

i . 配列番号 1～89 から選択されるガイド配列；

i i . 配列番号 1～89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

i i i . 配列番号 1～89 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列；

i v . 配列番号 1～24 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および

v . 配列番号 1～6 のいずれか 1 つを含むガイド配列、

から選択される配列を含み、

前記第二ガイド RNA が、

v i . 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択されるガイド配列；

v i i . 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

v i i i . 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列；

i x . 配列番号 90～113、配列番号 185、および配列番号 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；並びに

x . 配列番号 90～95 のいずれか 1 つを含むガイド配列、

から選択される配列を含む、方法。

【請求項 12】

TRAC 遺伝子座における遺伝子座内挿入を介して異種免疫受容体を発現させる方法であって、

細胞に、第一ガイド RNA と、第二ガイド RNA と、RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸と、を送達することを含み、

前記第一ガイド RNA が、

i . 配列番号 1～89 から選択されるガイド配列；

i i . 配列番号 1～89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

i i i . 配列番号 1～89 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少

10

20

30

40

50

なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；

i v . 配列番号 1、2、3、5、6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および

v . 配列番号 2、3、5、6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列、

から選択される配列を含み、

前記第二ガイド RNA が、

v i . 配列番号 90、95、97、98、185、214、218 から選択されるガイド配列；

v i i . 配列番号 90、95、97、98、185、214、および 218 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

v i i i . 配列番号 90、95、97、98、185、214、および 218 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；

i x . 配列番号 90、95、97、185、および 214 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；

x . 配列番号 90、95、および 185 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；並びに

x i . 配列番号 90 または 214 を含むガイド配列、

から選択される配列を含む、方法。

【請求項 13】

前記第一ガイド RNA が配列番号 2 の配列を含み、前記第二ガイド RNA が配列番号 90 の配列を含む、請求項 9～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記第一ガイド RNA が配列番号 180 の配列を含み、前記第二ガイド RNA が配列番号 186 の配列を含む、請求項 9～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記第一ガイド RNA が配列番号 1、2、3、5、6 のうちのいずれか 1 つの配列を含み、前記第二ガイド RNA が配列番号 90 の配列を含む、請求項 9～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記第一ガイド RNA が配列番号 1、2、3、5、6 のうちのいずれか 1 つの配列を含み、前記第二ガイド RNA が配列番号 214 の配列を含む、請求項 9～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記第一ガイド RNA、第二ガイド RNA、および RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸が実質的に同時に投与される、請求項 9～16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／または TRAC 遺伝子内の DNA 配列が同時に改変される、請求項 9～17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸が導入される、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

a . 細胞および／もしくは対象における TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／もしくは TRAC 遺伝子内に二本鎖切断 (DSB) を導入すること；または

b . 細胞および／もしくは対象における TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／もしくは TRAC 遺伝子内に一本鎖切断 (SSB) を導入すること；または

c . 細胞および／もしくは対象における TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／も

10

20

30

40

50

しくはT R A C 遺伝子の発現を減少させること、
をさらに含む、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

目的ポリペプチドをコードする核酸配列を導入することをさらに含み、所望により、

- a. 前記1または複数の目的ポリペプチドが受容体を含む；
 - b. 前記1または複数の目的ポリペプチドが免疫受容体を含む；
 - c. 前記1または複数の目的ポリペプチドがT細胞受容体を含み、さらに所望により、前記T細胞受容体ががん抗原を認識する；
 - d. 前記1または複数の目的ポリペプチドがW T 1 特異的なT細胞受容体を含み、前記T細胞受容体がW T 1 またはその断片を認識する；
 - e. 前記1または複数の目的ポリペプチドがキメラ抗原受容体を含み、さらに所望により、前記キメラ抗原受容体ががん抗原を認識する；または
 - f. 前記1または複数の目的ポリペプチドがW T 1 特異的なキメラ抗原受容体を含み、前記キメラ抗原受容体がW T 1 またはその断片を認識する、
- 請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項22】

- a. T C R α 鎖およびT C R β 鎖を導入すること；
 - b. T C R α 鎖およびT C R β 鎖をコードする1または複数の核酸配列を導入すること；
 - c. W T 1 特異的なT C R のα 鎖およびβ 鎖を導入すること；
 - d. W T 1 特異的なT C R のα 鎖およびβ 鎖をコードする1または複数の核酸配列を導入すること；
 - e. 以下から選択される第一T C R 配列を導入すること：（i）配列番号501または配列番号504；（ii）配列番号501または配列番号504に対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも70%、または（of）少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列；および、（iii）配列番号501または配列番号504の少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、または少なくとも250個のアミノ酸の連続的な部分配列、
- 並びに、

20

- 以下から選択される第二T C R 配列を導入すること：（i）配列番号502または配列番号505；（ii）配列番号502または配列番号505に対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも70%、または（of）少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列；および、（iii）配列番号502または配列番号505の少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、少なくとも250個、または少なくとも300個のアミノ酸の連続的な部分配列、
 - f. 以下から選択される第一T C R 配列を導入すること：（i）配列番号501または配列番号513；（ii）配列番号510または配列番号513に対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも70%、または（of）少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列；および、（iii）配列番号510または配列番号513の少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、または少なくとも250個のアミノ酸の連続的な部分配列、
- 並びに、

30

- 以下から選択される第二T C R 配列を導入すること：（i）配列番号511または配列番号514；（ii）配列番号511または配列番号514に対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも

40

50

70%、または (o f) 少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列；および、(i i i) 配列番号511または配列番号514の少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、少なくとも250個、または少なくとも300個のアミノ酸の連続的な部分配列、g. (e) または (f) の第一TCR配列をコードする配列を含む核酸配列を導入すること；

h. (e) または (f) の第二TCR配列をコードする配列を含む核酸配列を導入すること；

i. (g) および (h) の核酸配列を含む核酸配列を導入すること；

j. 配列番号500、503、506、509、512、515、518、もしくは521から選択されるポリペプチド、またはそれに対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を導入すること、所望により、それをコードする核酸配列を導入することにより導入すること；

k. 以下の (i) ~ (v i i) から選択されるTCR α 鎖ポリペプチドおよびTCR β 鎖ポリペプチド、または、それに対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を導入すること；

i) 配列番号501および配列番号502；

i i) 配列番号504および配列番号505；

i i i) 配列番号507および配列番号508；

i v) 配列番号510および配列番号511；

v) 配列番号513および配列番号514；

v i) 配列番号516および配列番号517；

v i i) 配列番号519および配列番号520；

l. (k) のTCR α 鎖ポリペプチドおよびTCR β 鎖ポリペプチドをコードする核酸配列を導入すること、

をさらに含む、請求項1~20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記第一核酸配列が第一標的遺伝子座に対して相同な配列に隣接している、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記第二核酸配列が第二標的遺伝子座に対して相同な配列に隣接している、請求項22に記載の方法。

【請求項25】

前記第一標的遺伝子座がTRAC遺伝子、TRBC1遺伝子、またはTRBC2遺伝子であり、例えば、TRAC遺伝子である、請求項23~24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記第二標的遺伝子座がTRAC遺伝子、TRBC1遺伝子、またはTRBC2遺伝子であり、例えば、TRBC1遺伝子またはTRBC2遺伝子である、請求項24~25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

前記隣接配列が少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、または少なくとも40ヌクレオチド長の配列である、請求項23~26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記導入核酸配列、または前記第一核酸配列および第二核酸配列が、プロモーターを含まない、請求項22~27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

前記導入核酸配列、または前記第一核酸配列および第二核酸配列が、プロモーターに機能

10

20

30

40

50

的に連結されており、所望により、前記プロモーターが EF-1 α プロモーター（例えば、配列番号 603）である、請求項 22～27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記導入核酸配列、または前記第一核酸配列および第二核酸配列が、ベクター、トランスフェクション、脂質ナノ粒子、またはマイクロインジェクションを介して導入される、請求項 22～29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記ベクターがウイルスベクターであり、さらに、所望により、前記ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルスベクターである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

TCR（WT1 特異的な TCR など）の遺伝子座内挿入法であって、（i）配列番号 90、95、97、98、185、214、および 218 から選択されるガイド配列を含む TCR を挿入するための第一ガイド RNA、（ii）RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸；並びに、（iii）TCR（WT1 特異的な TCR など）をコードするドナー核酸分子、を送達することを含む、方法。

【請求項 33】

配列番号 1～89 から選択される配列を含む第二ガイド RNA を送達することをさらに含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記第二ガイド RNA が配列番号 179～184 から選択される配列を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記 TCR が、

（a）配列番号 500、503、506、509、512、515、518、もしくは 521 から選択されるポリペプチド、またはそれに対して少なくとも 99%、少なくとも 95%、少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列；または

（b）以下の（i）～（viii）から選択される TCR α 鎖ポリペプチドおよび TCR β 鎖ポリペプチド、または、それに対して少なくとも 99%、少なくとも 95%、少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列：

- i）配列番号 501 および配列番号 502；
- ii）配列番号 504 および配列番号 505；
- iii）配列番号 507 および配列番号 508；
- iv）配列番号 510 および配列番号 511；
- v）配列番号 513 および配列番号 514；
- vi）配列番号 516 および配列番号 517；
- vii）配列番号 519 および配列番号 520；
- viii）配列番号 522 および配列番号 523、

を含む WT1 特異的な TCR である、請求項 32～34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

a．以下を含むガイド RNA：

i．配列番号 1～89 から選択されるガイド配列；または

ii．配列番号 1～89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；または

iii．配列番号 1～89 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；または

iv．配列番号 1～24 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または

v．配列番号 1～6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および、所望により

b．RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、

10

20

30

40

50

を含む、組成物。

【請求項 37】

細胞における T R B C 1 遺伝子および／または T R B C 2 遺伝子内の D N A 配列を改変する際に使用される、請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 38】

細胞における T R B C 1 遺伝子および／または T R B C 2 遺伝子の発現を導入する際に使用される、請求項 36 または請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 39】

前記ガイド R N A が配列番号 196～200 のいずれかから選択される配列を含む、請求項 36～38 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 40】

a. 以下を含むガイド R N A :

i. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択されるガイド配列；または

ii. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；または

iii. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；または

iv. 配列番号 90～113 および配列番号 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または

v. 配列番号 90～95 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；並びに、所望により

b. R N A ガイド型 D N A 結合剤または R N A ガイド型 D N A 結合剤をコードする核酸、を含む、組成物。

【請求項 41】

細胞における T R A C 遺伝子内の D N A 配列を改変する際に使用される、請求項 40 に記載の組成物。

【請求項 42】

細胞における T R A C 遺伝子の発現を減少させる際に使用される、請求項 40 または請求項 41 に記載の組成物。

【請求項 43】

前記ガイド R N A が配列番号 185～192 および配列番号 201～212 のいずれかから選択される配列を含む、請求項 40～42 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 44】

請求項 1～43 のいずれか一項に記載の方法によって改変された、細胞。

【請求項 45】

生体外で改変された、請求項 44 に記載の細胞。

【請求項 46】

T 細胞である、請求項 44 または請求項 45 に記載の細胞。

【請求項 47】

C D 3 +、C D 4 +、且つ／または C D 8 + T 細胞である、請求項 44～46 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 48】

哺乳類細胞、霊長類細胞、またはヒト細胞である、請求項 44～47 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 49】

内在性 T 細胞受容体を欠損している、非内在性 T 細胞受容体を発現する T 細胞を作製するための、請求項 44～48 のいずれか一項に記載の細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 50】

内在性 T 細胞受容体を欠損している、C A R を発現する T 細胞を作製するための、請求項 44～48 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 51】

改変後に C D 3⁻細胞となる、請求項 44～50 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 52】

改変前は C D 3⁺細胞であり、改変後は C D 3⁻細胞となる、請求項 44～51 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 53】

目的ポリペプチドをコードする 1 または複数の核酸配列をさらに含み、所望により、

- a. 前記 1 または複数の目的ポリペプチドが受容体を含む；
 - b. 前記 1 または複数の目的ポリペプチドが免疫受容体を含む；
 - c. 前記 1 または複数の目的ポリペプチドが T 細胞受容体を含み、さらに所望により、前記 T 細胞受容体が W T 1 に対して特異的である；または
 - d. 前記 1 または複数の目的ポリペプチドがキメラ抗原受容体を含み、さらに所望により、前記キメラ抗原受容体が W T 1 に対して特異的である、
- 請求項 44～52 のいずれか一項に記載の細胞。

10

【請求項 54】

外来性 T 細胞受容体の α 鎖および β 鎖をコードする 1 または複数の核酸配列をさらに含む、請求項 44～53 のいずれか一項に記載の細胞。

20

【請求項 55】

前記外来性 T 細胞受容体の α 鎖および β 鎖をコードする 1 または複数の核酸配列がゲノムの T R A C 遺伝子座内の核酸配列である、請求項 54 に記載の細胞。

【請求項 56】

外来性 T 細胞受容体の γ 鎖および δ 鎖をコードする 1 または複数の核酸配列をさらに含む、請求項 44～55 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 57】

前記外来性 T 細胞受容体の γ 鎖および δ 鎖をコードする 1 または複数の核酸配列がゲノムの T R A C 遺伝子座内の核酸配列である、請求項 56 に記載の細胞。

【請求項 58】

前記 T C R α 鎖の配列が、(i) 配列番号 501 または配列番号 504；(ii) 配列番号 501 または配列番号 504 に対して少なくとも 99%、少なくとも 95%、少なくとも 90%、少なくとも 85%、少なくとも 80%、少なくとも 70%、または (of) 少なくとも 60% の同一性を有する配列；および、配列番号 501 または配列番号 504 の少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 50 個、少なくとも 60 個、少なくとも 70 個、少なくとも 80 個、少なくとも 90 個、少なくとも 100 個、少なくとも 150 個、少なくとも 200 個、または少なくとも 250 個のアミノ酸の連続的な部分配列、から選択され、且つ、

30

前記 T C R β 鎖の配列が、(i) 配列番号 502 または配列番号 505；(ii) 配列番号 502 または配列番号 505 に対して少なくとも 99%、少なくとも 95%、少なくとも 90%、少なくとも 85%、少なくとも 80%、少なくとも 70%、または (of) 少なくとも 60% の同一性を有する配列；および、配列番号 502 または配列番号 505 の少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 50 個、少なくとも 60 個、少なくとも 70 個、少なくとも 80 個、少なくとも 90 個、少なくとも 100 個、少なくとも 150 個、少なくとも 200 個、少なくとも 250 個、または少なくとも 300 個のアミノ酸の連続的な部分配列、から選択される、

40

請求項 54～57 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 59】

前記 T C R α 鎖が配列番号 500、501、503、および 504 のいずれかに記載の核酸配列にコードされており、前記 β T C R 鎖が配列番号 500、502、503、および

50

505のいずれかに記載の核酸配列にコードされている、請求項54～58のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項60】

前記TCR α 鎖の配列が、(i)配列番号513；(ii)配列番号513に対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも70%、または(of)少なくとも60%の同一性を有する配列；および、配列番号513の少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、または少なくとも250個のアミノ酸の連続的な部分配列、から選択され、且つ、

10

前記TCR β 鎖の核酸配列が、(i)配列番号514；(ii)配列番号514に対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも70%、または(of)少なくとも60%の同一性を有する配列；および、配列番号514の少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、少なくとも250個、または少なくとも300個のアミノ酸の連続的な部分配列、から選択される、請求項54～59のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項61】

前記 α TCR鎖が配列番号513であり、前記 β TCR鎖が配列番号514である、請求項54～60のいずれか一項に記載の細胞。

20

【請求項62】

前記1または複数の遺伝子が内在性プロモーターから発現される、請求項44～61のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項63】

前記1または複数の遺伝子が異種プロモーターから発現され、所望により、前記異種プロモーターはEF-1 α プロモーターである、請求項44～62のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項64】

請求項44～63のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞集団であって、改変後集団の約50%超、約55%超、約60%超、約65%超、約70%超、約75%超、約80%超、約85%超、約90%超、約95%超、約98%超、または約99%超がCD3 $^{+}$ 細胞である、細胞集団。

30

【請求項65】

前記集団の約90%超がCD3 $^{+}$ である、請求項64に記載の集団。

【請求項66】

前記集団の約95%超がCD3 $^{+}$ である、請求項64に記載の集団。

【請求項67】

前記集団の約99%超がCD3 $^{+}$ である、請求項64に記載の集団。

【請求項68】

請求項44～63のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞集団であって、集団の約50%超、約55%超、約60%超、約65%超、約70%超、約75%超、約80%超、約85%超、約90%超、約95%超、約98%超、または約99%超が内在性T細胞受容体を欠失している、細胞集団。

40

【請求項69】

集団の約90%超が内在性T細胞受容体を欠失している、請求項68に記載の集団。

【請求項70】

集団の約95%超が内在性T細胞受容体を欠失している、請求項68に記載の集団。

【請求項71】

集団の約99%超が内在性T細胞受容体を欠失している、請求項68に記載の集団。

50

【請求項 7 2】

集団における T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子の発現が、未改変の同一細胞集団と比較して、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % 減少している、請求項 4 4 ～ 6 3 のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞集団。

【請求項 7 3】

T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子の発現の減少が少なくとも約 9 0 % である、請求項 7 2 に記載の集団。

10

【請求項 7 4】

T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子の発現の減少が少なくとも約 9 5 % である、請求項 7 2 に記載の集団。

【請求項 7 5】

T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子の発現の減少が少なくとも約 9 9 % である、請求項 7 2 に記載の集団。

【請求項 7 6】

前記減少が T R B C 1 遺伝子の発現の減少である、請求項 6 4 ～ 7 5 のいずれか一項に記載の集団。

【請求項 7 7】

前記減少が T R B C 2 遺伝子の発現の減少である、請求項 6 4 ～ 7 6 のいずれか一項に記載の集団。

20

【請求項 7 8】

前記減少が T R A C 遺伝子の発現の減少である、請求項 6 4 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の集団。

【請求項 7 9】

請求項 4 4 ～ 7 8 のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞集団であって、前記集団の 1 0 ～ 1 0 0 %、例えば前記集団の 3 0 ～ 9 9 % が、T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子にインデルを有する、細胞集団。

【請求項 8 0】

前記集団の 3 0 ～ 3 5 %、3 5 ～ 4 0 %、4 0 ～ 4 5 %、4 5 ～ 5 0 %、5 0 ～ 5 5 %、5 5 ～ 6 0 %、6 0 ～ 6 5 %、6 5 ～ 7 0 %、7 0 ～ 7 5 %、7 5 ～ 8 0 %、8 0 ～ 8 5 %、8 5 ～ 9 0 %、9 0 ～ 9 5 %、または 9 5 ～ 9 9 % が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子にインデルを有する、請求項 7 9 に記載の集団。

30

【請求項 8 1】

前記インデルまたは挿入が T R B C 1 遺伝子におけるものである、請求項 7 6 または請求項 7 9 に記載の集団。

【請求項 8 2】

前記インデルまたは挿入が T R B C 2 遺伝子におけるものである、請求項 7 7 または請求項 7 9 に記載の集団。

40

【請求項 8 3】

前記インデルまたは挿入が T R A C 遺伝子におけるものである、請求項 7 8 または請求項 7 9 に記載の集団。

【請求項 8 4】

前記組成物が T R B C 1 遺伝子および／または T R B C 2 遺伝子の編集をもたらす、請求項 1 ～ 4 または請求項 9 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 1 ～ 4 または請求項 9 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の用途の組成物。

【請求項 8 5】

前記組成物が T R A C 遺伝子の編集をもたらす、請求項 4 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の用途の組成物。

50

【請求項 86】

前記組成物が T R B C 遺伝子および T R A C 遺伝子の編集をもたらす、請求項 9～43 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 9～43 のいずれか一項に記載の用途の組成物。

【請求項 87】

前記編集が編集された集団の割合として算出される（編集率またはインデル率）、請求項 79～86 のいずれか一項に記載の方法または請求項 79～86 のいずれか一項に記載の用途の組成物。

【請求項 88】

前記編集率が、前記集団の 30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または 95～99% である、請求項 84～87 のいずれか一項に記載の方法または請求項 84～87 のいずれか一項に記載の用途の組成物。

10

【請求項 89】

前記組成物が、

- a. 配列番号 179～184 および配列番号 196～200 のいずれか 1 つ；または
- b. 配列番号 1～89 のうちのいずれか 1 つから選択されるガイド配列；または
- c. 配列番号 1～24 から選択されるガイド配列；または
- d. 配列番号 1～6 から選択されるガイド配列、

20

を含む s g R N A を含む、請求項 4～43 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 90】

前記組成物が、

- a. 配列番号 186～192 および配列番号 201～212 のいずれか 1 つ；または
- b. 配列番号 90～178 および配列番号 213～218 のいずれか 1 つから選択されるガイド配列；または
- c. 配列番号 90～113 および配列番号 213～218 から選択されるガイド配列；または
- d. 配列番号 90～95 から選択されるガイド配列、

を含む s g R N A を含む、請求項 4～43 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

30

【請求項 91】

前記標的配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子の第 1 エクソン、第 2 エクソン、第 3 エクソン、または第 4 エクソン内の配列である、請求項 1～43 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 92】

前記標的配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の第 1 エクソン内の配列である、請求項 91 に記載の方法または組成物。

【請求項 93】

前記標的配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の第 2 エクソン内の配列である、請求項 91 に記載の方法または組成物。

40

【請求項 94】

前記標的配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の第 3 エクソン内の配列である、請求項 91 に記載の方法または組成物。

【請求項 95】

前記標的配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の第 4 エクソン内の配列である、請求項 91 に記載の方法または組成物。

【請求項 96】

前記標的配列がヒト T R B C 1 遺伝子、ヒト T R B C 2 遺伝子および／またはヒト T R A C 遺伝子内の配列である、請求項 91～95 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 97】

50

前記ガイド配列が T R B C 1、T R B C 2、および／または T R A C のプラス鎖内の標的配列に対して相補的である、請求項 1～43 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 98】

前記ガイド配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子のマイナス鎖内の標的配列に対して相補的である、請求項 1～43 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 99】

前記第一ガイド配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子のプラス鎖内の第一標的配列に対して相補的であり、前記組成物は T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子のマイナス鎖内の第二標的配列に対して相補的な第二ガイド配列をさらに含む、請求項 1～43 および請求項 84～98 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

【請求項 100】

前記ガイド RNA が配列番号 1～178 のいずれか 1 つから選択されるガイド配列を含み、且つ、配列番号 400 のヌクレオチド配列をさらに含み、前記配列番号 400 のヌクレオチドは前記ガイド配列の 3' 末端の後に続いている、請求項 1～43 および請求項 84～98 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 101】

前記ガイド RNA が配列番号 1～178 のいずれか 1 つから選択されるガイド配列を含み、且つ、配列番号 401 のヌクレオチド配列をさらに含み、前記配列番号 401 のヌクレオチドは前記ガイド配列の 3' 末端の後に続いている、請求項 1～43 または請求項 84～98 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

20

【請求項 102】

前記ガイド RNA が配列番号 300 のパターンに従って改変されており、N が、まとめて、配列番号 1～89 のガイド配列のいずれか 1 つである、請求項 1～43 または請求項 84～98 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 103】

配列番号 300 内の各 N が任意の天然ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチドであり、前記 N がガイド配列を形成し、前記ガイド配列が C a s 9 を T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子に標的化する、請求項 102 に記載の方法または組成物。

30

【請求項 104】

前記 s g RNA が配列番号 1～89 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列を含む、請求項 100～103 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 105】

前記ガイド RNA がウイルスベクターに含まれている、請求項 1～43 および請求項 84～104 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

40

【請求項 106】

前記ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターである、請求項 105 に記載の方法または組成物。

【請求項 107】

前記ウイルスベクターが、配列番号 613～632 のいずれかの核酸配列、またはそれに対して少なくとも 99%、少なくとも 95%、少なくとも 90%、少なくとも 85%、少なくとも 80%、少なくとも 70%、もしくは (o f) 少なくとも 60% の同一性を有する核酸配列を含む、請求項 105 または請求項 106 に記載の方法または組成物。

【請求項 108】

前記ガイド RNA が少なくとも 1 つの修飾を含む、請求項 1～43 および請求項 84～1

50

07のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項109】

前記少なくとも1つの修飾が2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドを含む、請求項108に記載の方法または組成物。

【請求項110】

ヌクレオチド同士のホスホロチオエート(PS)結合を含む、請求項108または請求項109に記載の方法または組成物。

【請求項111】

2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含む、請求項108～110のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

【請求項112】

前記ガイドRNAの5'末端の最初の5個のヌクレオチドの1または複数に修飾を含む、請求項108～111のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項113】

前記ガイドRNAの3'末端の最後の5個のヌクレオチドの1または複数に修飾を含む、請求項108～112のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項114】

前記ガイドRNAの5'末端の最初の4個のヌクレオチドの間にPS結合を含む、請求項108～113のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項115】

前記ガイドRNAの3'末端の最後の4個のヌクレオチドの間にPS結合を含む、請求項108～114のいずれか一項に記載の方法または組成物。

20

【請求項116】

前記ガイドRNAの5'末端の最初の3個のヌクレオチドに2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む、請求項108～115のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項117】

前記ガイドRNAの3'末端の最後の3個のヌクレオチドに2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む、請求項108～116のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項118】

前記ガイドRNAが配列番号300の修飾ヌクレオチドを含む、請求項108～117のいずれか一項に記載の方法または組成物。

30

【請求項119】

前記組成物が薬剂的に許容できる医薬品添加物をさらに含む、請求項108～118のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項120】

前記組成物がRNAガイド型DNA結合剤をさらに含む、請求項1～43および請求項84～119のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項121】

前記ガイドRNAおよびRNAガイド型DNA結合剤の組成物がリボ核タンパク質(RNP)に含まれている、請求項1～43および請求項84～120のいずれか一項に記載の方法または組成物。

40

【請求項122】

前記組成物がRNAガイド型DNA結合剤をコードするmRNAをさらに含む、請求項1～43および請求項84～120のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項123】

前記RNAガイド型DNA結合剤がCas9である、請求項121または請求項122に記載の方法または組成物。

【請求項124】

前記RNAガイド型DNA結合剤がCas9タンパク質である、請求項123に記載の方法または組成物。

50

【請求項 1 2 5】

前記組成物が医薬製剤であり、薬剤的に許容できる担体をさらに含む、請求項 1 ～ 4 3 および請求項 8 4 ～ 1 2 4 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 1 2 6】

医薬の調製のための、請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の使用。

【請求項 1 2 7】

がんの治療で使用される医薬の調製のための、請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の使用。

【請求項 1 2 8】

対象の免疫療法で使用される医薬の調製のための、請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の使用。

【請求項 1 2 9】

ウィルムス腫瘍抗原（W T 1）を過剰発現する腫瘍の治療で使用される医薬の調製のための、請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の使用。

【請求項 1 3 0】

疾患または障害の治療で使用される、請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞。

【請求項 1 3 1】

免疫療法で使用される、請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞。

【請求項 1 3 2】

がんの治療で使用される、請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞。

【請求項 1 3 3】

ウィルムス腫瘍抗原（W T 1）を過剰発現する腫瘍の治療で使用される、請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞。

【請求項 1 3 4】

請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の投与を含む、ヒトまたは動物の治療方法。

【請求項 1 3 5】

請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の投与を含む、ヒトまたは動物におけるがんの治療方法。

【請求項 1 3 6】

請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の投与を含む、ヒトまたは動物の免疫療法の方法。

【請求項 1 3 7】

請求項 3 6 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の投与を含む、ヒトまたは動物におけるウィルムス腫瘍抗原（W T 1）を過剰発現する腫瘍の治療方法。

【請求項 1 3 8】

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 1 である、請求項 1 ～ 4、9 ～ 3 9、4 4 ～ 7 7、7 9 ～ 8 2、8 4、8 6 ～ 8 9、または 9 1 ～ 1 3 7 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 1 3 9】

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 2 である、請求項 1 ～ 4、9 ～ 3 9、4 4 ～ 7 7、7 9 ～ 8 2、8 4、8 6 ～ 8 9、または 9 1 ～ 1 3 7 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 1 4 0】

10

20

30

40

50

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 3 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 141】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 4 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 142】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 5 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 143】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 6 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 144】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 7 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 145】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 8 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 146】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 9 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 147】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 10 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 148】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 11 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 149】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 12 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 150】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 13 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 151】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 14 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 152】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 15 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 の

10

20

30

40

50

いずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 153】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 16 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 154】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 17 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 155】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 18 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 156】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 19 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 157】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 20 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 158】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 21 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 159】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 22 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 160】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 23 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 161】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 24 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 162】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 25 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 163】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 26 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 164】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 27 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 165】

10

20

30

40

50

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 28 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 166】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 29 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 167】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 30 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 168】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 31 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 169】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 32 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 170】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 33 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 171】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 34 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 172】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 35 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 173】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 36 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 174】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 37 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 175】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 38 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 176】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 39 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 177】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 40 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 の

10

20

30

40

50

いずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 178】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 41 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 179】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 42 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 180】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 43 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 181】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 44 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 182】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 45 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 183】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 46 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 184】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 47 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 185】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 48 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 186】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 49 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 187】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 50 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 188】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 51 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 189】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 52 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 190】

10

20

30

40

50

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 53 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 191】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 54 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 192】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 55 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

10

【請求項 193】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 56 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 194】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 57 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 195】

20

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 58 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 196】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 59 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 197】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 60 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

30

【請求項 198】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 61 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 199】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 62 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 200】

40

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 63 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 201】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 64 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 202】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 65 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 の

50

いずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 203】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 66 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 204】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 67 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 205】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 68 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 206】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 69 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 207】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 70 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 208】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 71 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 209】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 72 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 210】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 73 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 211】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 74 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 212】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 75 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 213】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 76 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 214】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 77 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 215】

10

20

30

40

50

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 78 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 216】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 79 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 217】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 80 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 218】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 81 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 219】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 82 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 220】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 83 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 221】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 84 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 222】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 85 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 223】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 86 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 224】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 87 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 225】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 88 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、集団、または細胞。

【請求項 226】

配列番号 1～89 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 89 である、請求項 1～4、9～39、44～77、79～82、84、86～89、または 91～137 のいずれか一項に記載の方法、使用、組成物、または細胞。

【請求項 227】

配列番号 90～178、185、および 213～218 から選択される前記ガイド RNA の配列が配列番号 185 である、請求項 5～8、9～35、40～75、78～80、8

10

20

30

40

50

3、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項228】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号90である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項229】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号91である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

10

【請求項230】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号92である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項231】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号93である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

20

【請求項232】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号94である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項233】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号95である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

30

【請求項234】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号96である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項235】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号97である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

40

【請求項236】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号98である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項237】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号99である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83

50

、 85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項238】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号100である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項239】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号101である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

10

【請求項240】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号102である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項241】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号103である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

20

【請求項242】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号104である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項243】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号105である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

30

【請求項244】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号106である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項245】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号107である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

40

【請求項246】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号108である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項247】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号109である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、8

50

3、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項248】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号110である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項249】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号111である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

10

【請求項250】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号112である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項251】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号113である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

20

【請求項252】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号114である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項253】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号115である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

30

【請求項254】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号116である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項255】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号117である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

40

【請求項256】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号118である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項257】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号119である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、8

50

3、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項258】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号120である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項259】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号121である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

10

【請求項260】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号122である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項261】

配列番号90～178、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号123である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

20

【請求項262】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号124である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項263】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号125である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

30

【請求項264】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号126である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項265】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号127である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

40

【請求項266】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号128である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項267】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号129である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、8

50

3、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項268】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号130である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項269】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号131である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

10

【請求項270】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号132である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項271】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号133である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

20

【請求項272】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号134である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項273】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号135である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

30

【請求項274】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号136である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項275】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号137である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

40

【請求項276】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号138である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項277】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号139である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、8

50

3、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項278】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号140である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項279】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号141である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

10

【請求項280】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号142である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項281】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号143である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

20

【請求項282】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号144である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項283】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号145である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

30

【請求項284】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号146である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項285】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号147である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

40

【請求項286】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号148である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項287】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号149である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、8

50

3、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項288】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号150である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項289】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号151である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

10

【請求項290】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号152である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項291】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号153である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

20

【請求項292】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号154である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項293】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号155である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

30

【請求項294】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号156である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項295】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号157である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

40

【請求項296】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号158である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項297】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号159である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、8

50

3、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項298】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号160である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項299】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号161である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

10

【請求項300】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号162である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項301】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号163である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

20

【請求項302】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号164である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項303】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号165である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

30

【請求項304】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号166である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項305】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号167である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

40

【請求項306】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号168である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項307】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号169である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、8

50

3、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項308】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号170である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項309】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号171である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

10

【請求項310】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号172である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項311】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号173である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

20

【請求項312】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号174である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項313】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号175である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

30

【請求項314】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号176である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項315】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号177である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

40

【請求項316】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号178である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項317】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号213である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、8

50

3、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項318】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号214である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項319】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号215である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項320】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号216である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項321】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号217である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【請求項322】

配列番号90～178、185、および213～218から選択される前記ガイドRNAの配列が配列番号218である、請求項5～8、9～35、40～75、78～80、83、85～87、または90～137のいずれか一項に記載の方法、使用、集団、細胞、または組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2018年10月16日に提出された米国仮特許出願第62／746，522号、および2018年10月17日に提出された同第62／747，037号に基づく優先権の利益を主張するものであり、これらの米国仮特許出願は参照によって本明細書に援用されたものとする。

【0002】

本願には、ASCII形式の電子ファイルで提出された、配列表が含まれ、その全体が参照によって本明細書に援用されたものとする。2019年10月14日に作成されたASCIIコピーは、Sequence_Listing.txtという名称であり、サイズは272キロバイトである。

【背景技術】

【0003】

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（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats））は、細菌において、ウイルスの攻撃に対抗するための適応免疫系として発達した。ウイルスへの暴露後、ウイルスDNAの短セグメントが、細菌ゲノムのCRISPR遺伝子座に組み込まれる。ウイルス配列を含むCRISPR遺伝子座の部分からRNAが転写される。ウイルスゲノムに相補的な配列を含むこのRNAが、Cas9タンパク質のウイルスゲノム内の配列へのターゲティングを媒介する。Cas9タンパク質が、切断を起こすことで、ウイルス標的を制限する。

【0004】

近年、C R I S P R / C a s 系は真核細胞におけるゲノム編集に応用されている。部位特異的な一本鎖切断（S S B）または二本鎖切断（D S B）の導入は、非相同末端結合（N H E J）または相同組換え修復（H D R）などを介した標的配列変異を可能にする。

【0005】

E y q u e m ら（2017年）、N a t u r e、543巻（7643号）：頁113～117には、C R I S P R - C a s 9系を用いたキメラ抗原受容体（C A R）のT R A C 遺伝子の遺伝子座へのターゲティングが、腫瘍拒絶を増強することが報告されている。加えて、このようなT R A C 遺伝子座へのターゲティングは、トニックなC A R シグナル伝達を防ぎ、抗原への1回または反復暴露後にC A R の効果的なインターナリゼーションおよび再発現を確立するため、エフェクターT細胞の分化および消耗が遅延される。しかし、既存のアプローチでは、目的の標的に対する望ましい活性を持たないT細胞が生成される場合がある（T R A C 遺伝子座からC A R を発現し、C A R と相互作用し、望ましくない反応性を有するT細胞を生じ得る内在性T R B C 遺伝子産物を発現するT細胞の生成を含むが、これに限定はされない）。このように、免疫療法のための組成物および方法の改善が求められている。

10

【0006】

これを受けて、以下の実施形態が提供される。いくつかの実施形態では、本発明は、ガイドRNAを、C R I S P R / C a s 系などのRNAガイド型DNA結合剤と共に用いて、T R B C 遺伝子および／またはT R A C 遺伝子の発現を実質的に減少またはノックアウトすることで、T細胞受容体（別名T C R）のネイティブなαサブユニットおよび／またはβサブユニットの産生を実質的に減少または消失させる、組成物および方法を提供する。

20

【発明の概要】

【0007】

本明細書に記載の発明は、改変T細胞療法（例えば、がん免疫（i m m u n o o n c o l o g y）および自己免疫低減）のための組成物および方法に関し、例えば、ゲノム内の特定の標的配列において改変された細胞（上記標的配列を標的とするgRNA分子を含むC R I S P R系の導入によって改変されたような細胞を含む）、並びに、それを作製する方法およびそれを使用する方法に関する。例えば、本開示は、細胞、例えばT細胞、例えば内在性T細胞受容体発現を欠失しているように操作されたT細胞、例えば目的コード配列を挿入するさらなる操作に好適なT細胞、例えば改変型T細胞受容体または変異型T細胞受容体などのT細胞受容体を発現するようにさらに操作されたT細胞、のゲノム編集に有用であり、且つ、免疫療法に有用である、gRNA分子、C R I S P R系、細胞、および方法に関するものであり、本開示によりこれらが提供される。

30

【0008】

第一の態様において、本発明は、t r a c r R N A と c r R N A とを含むgRNA分子であって、上記c r R N A がT細胞の標的配列に結合するターゲティングドメインを含む、gRNA分子を提供する。1つの実施形態において、上記ターゲティングドメインはT細胞の標的配列と相補的である。上記T細胞は自己T細胞であっても同種T細胞であってもよい。上記T細胞は、C D 3 + T細胞、C D 4 + T細胞、および／またはC D 8 + T細胞であり得る。本発明は特許請求の範囲に提供された通りのものであるが、さらなる実施形態を以下に示す。

40

【0009】

本発明は、T R B C 1 遺伝子および／またはT R B C 2 遺伝子内のDNA配列を改変する方法であって、

組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

（a）以下から選択される配列を含むガイドRNA：

i . 配列番号1～89から選択されるガイド配列；

i i . 配列番号1～89から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド；

50

i i i . 配列番号 1 ~ 8 9 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 1 %、または少なくとも 9 0 % の同一性を有するガイド配列；

i v . 配列番号 1 ~ 2 4 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および

v . 配列番号 1 ~ 6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または

(b) (a) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により

(c) RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、

を含む、方法を提供する。

10

【0010】

本発明はさらに、DNA 配列を改変する方法であって、

組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

(a) 以下から選択される配列を含むガイド RNA：

i . 配列番号 1 ~ 8 9 および配列番号 1 7 9 ~ 1 8 4 についての、表 1 および / または表 3 のいずれかに記載されたゲノムコーディネートの 1 5 個の連続ヌクレオチド ± 1 0 個のヌクレオチドを含む配列；

i i . (i) からの配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、または少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチド；

20

i i i . (i) から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 1 %、または少なくとも 9 0 % の同一性を有するガイド配列；

(b) (a) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により

(c) RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、

を含む、方法を提供する。

【0011】

本発明はさらにまた、TRBC1 遺伝子および / または TRBC2 遺伝子の発現を減少させる方法であって、

30

組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

(a) 以下から選択される配列を含むガイド RNA：

i) 配列番号 1 ~ 8 9 から選択されるガイド配列；

i i) 配列番号 1 ~ 8 9 から選択される配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、または少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチド；

i i i) 配列番号 1 ~ 8 9 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 1 %、または少なくとも 9 0 % の同一性を有するガイド配列；

40

i v) 配列番号 1 ~ 2 4 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および

v) 配列番号 1 ~ 6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または

(b) (a) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により

(c) RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、

を含む、方法を提供する。

【0012】

本発明はさらに、免疫療法の方法であって、

組成物を対象、その自己細胞、および / または同種細胞に投与することを含み、

50

前記組成物が、

(a) 以下から選択される配列を含むガイドRNA：

i) 配列番号1～89から選択されるガイド配列；

ii) 配列番号1～89から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド；

iii) 配列番号1～89から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列；

iv) 配列番号1～24のうちのいずれか1つを含むガイド配列；および

v) 配列番号1～6のうちのいずれか1つを含むガイド配列；または

(b) (a) のガイドRNAをコードする核酸；並びに、所望により

(c) RNAガイド型DNA結合剤またはRNAガイド型DNA結合剤をコードする核酸、を含む、方法を提供する。

【0013】

本発明はさらにまた、TRAC遺伝子内のDNA配列を改変する方法であって、組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

(a) 以下から選択される配列を含むガイドRNA：

i) 配列番号90～178、配列番号185、および配列番号213～218から選択されるガイド配列；

ii) 配列番号90～178、配列番号185、および配列番号213～218から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド；

iii) 配列番号90～178、配列番号185、および配列番号213～218から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列；

iv) 配列番号90～113および配列番号213～218のうちのいずれか1つを含むガイド配列；および

v) 配列番号90～95のうちのいずれか1つを含むガイド配列；または

(b) (a) のガイドRNAをコードする核酸；並びに、所望により

(c) RNAガイド型DNA結合剤またはRNAガイド型DNA結合剤をコードする核酸、を含む、方法を提供する。

【0014】

本発明はさらに、TRAC遺伝子の発現を減少させる方法であって、組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

(a) 以下から選択される配列を含むガイドRNA：

i) 配列番号90～178、配列番号185、および配列番号213～218から選択されるガイド配列；

ii) 配列番号90～178、配列番号185、および配列番号213～218から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド；

iii) 配列番号90～178、配列番号185、および配列番号213～218から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列；

i v) 配列番号 90～113 および 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；並びに

v) 配列番号 90～95 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または

(b) (a) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により

(c) RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸を含む、方法を提供する。

【0015】

本発明はさらにまた、免疫療法の方法であって、

組成物を対象、その自己細胞、および／または同種細胞に投与することを含み、

前記組成物が、

(a) 以下から選択される配列を含むガイド RNA：

i) 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択されるガイド配列；

ii) 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

iii) 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；

iv) 配列番号 90～113 および配列番号 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および

v) 配列番号 90～95 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または

(b) (a.) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により

(c) RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸を含む、方法を提供する。

【0016】

本発明はさらに、DNA 配列を改変する方法であって、

組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

(a) 以下から選択される配列を含むガイド RNA：

i. 配列番号 90～218 についての、表 2 および／または表 3 のいずれかに記載されたゲノムコーディネートの 15 個の連続ヌクレオチド ± 10 個のヌクレオチドを含む配列；

ii. (i) からの配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

iii. (i) から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；

(b) (a) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により

(c) RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸を含む、方法を提供する。

【0017】

本発明はさらにまた、TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／または TRAC 遺伝子内の DNA 配列を改変する方法であって、

細胞に、第一ガイド RNA と、第二ガイド RNA と、所望により、RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸と、を送達することを含み、前記第一ガイド RNA が、

10

20

30

40

50

- i) 配列番号 1～89 から選択されるガイド配列；
 - ii) 配列番号 1～89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；
 - iii) 配列番号 1～89 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；
 - iv) 配列番号 1～24 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および
 - v) 配列番号 1～6 のいずれか 1 つを含むガイド配列、
- から選択される配列を含み、
- 前記第二ガイド RNA が、
- i. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択されるガイド配列；
 - ii. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；
 - iii. 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；
 - iv. 配列番号 90～113 および配列番号 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および
 - v. 配列番号 90～95 のいずれか 1 つを含むガイド配列、
- から選択される配列を含む、方法を提供する。

【0018】

本発明はさらにまた、TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／または TRAC 遺伝子の発現を減少させる方法であって、細胞に、第一ガイド RNA と、第二ガイド RNA と、所望により、RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸と、を送達することを含み、前記第一ガイド RNA が、

- i) 配列番号 1～89 から選択されるガイド配列；
 - ii) 配列番号 1～89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；
 - iii) 配列番号 1～89 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；
 - iv) 配列番号 1～24 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および
 - v) 配列番号 1～6 のいずれか 1 つを含むガイド配列、
- から選択される配列を含み、
- 前記第二ガイド RNA が、
- i) 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択されるガイド配列；
 - ii) 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；
 - iii) 配列番号 90～178、配列番号 185、および配列番号 213～218 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；

i v) 配列番号 90～113 および 配列番号 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および

v) 配列番号 90～95 のいずれか 1 つを含むガイド配列、
から選択される配列を含む、方法を提供する。

【0019】

本発明はさらに、組成物を対象、その自己細胞、または同種細胞に投与することを含む免疫療法の方法であって、

前記組成物は、第一ガイドRNAと、第二ガイドRNAと、所望により、RNAガイド型DNA結合剤またはRNAガイド型DNA結合剤をコードする核酸とを含み、

前記第一ガイドRNAが、

i) 配列番号 1～89 から選択されるガイド配列；

ii) 配列番号 1～89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

iii) 配列番号 1～89 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；

iv) 配列番号 1～24 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および

v) 配列番号 1～6 のいずれか 1 つを含むガイド配列、

から選択される配列を含み、

前記第二ガイドRNAが、

i. 配列番号 90～178、配列番号 185、および 配列番号 213～218 から選択されるガイド配列；

ii. 配列番号 90～178、配列番号 185、および 配列番号 213～218 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

iii. 配列番号 90～178、配列番号 185、および 配列番号 213～218 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；

iv. 配列番号 90～113 および 配列番号 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および

v. 配列番号 90～95 のいずれか 1 つを含むガイド配列、

から選択される配列を含む、方法を提供する。

【0020】

理論に拘束されることを望むものではないが、TRAC/TRBC二重変異体（例えば、ノックアウト変異体）の使用は、細胞表面に達する操作／導入されたTCRの割合がより大きくなるため、本発明の範疇においては、いくつかの実施形態で有利である。

【0021】

いくつかの実施形態では、操作された細胞における外来性TCRの、TRACノックインと組み合わせたTRBCノックアウトは、操作された細胞において活性がより大きな外来性TCRを得る際に有利である。

【0022】

いくつかの実施形態では、操作された細胞における外来性TCRの、TRACノックインと組み合わせたTRBCノックアウトは、操作された細胞において選択性がより大きな外来性TCRを得る際に有利である。

【0023】

加えて、いくつかの実施形態では、操作された細胞における外来性TCRの、TRACノックインと組み合わせたTRBCノックアウトは、カスパーゼアッセイなどで測定された場合でより大きな細胞死滅を達成する際に有利になり得る。

10

20

30

40

50

【0024】

いくつかの実施形態では、操作された細胞における外来性TCRの、TRACノックインと組み合わせたTRBCノックアウトは、誘導性ペプチド（例えばウィルムス腫瘍遺伝子（WT1）抗原）に対する反応などにおいて、より大きなIFN- γ 分泌を達成する際に有利である。

【0025】

さらに、いくつかの実施形態では、上記TCRを用いた、TRAC/TRBCダブルノックアウトは、CD4+細胞などにおいて、より大きなIFN- γ 分泌を達成する際に有利である。

【0026】

加えて、有利なことに、いくつかの実施形態では、インターフェロン反応（IFN γ および／またはTNF α ）は、挿入されたドナーコンストラクトの転写がTRACの内在性プロモーターによって促進される、編集を受けた細胞において、増大する。

【0027】

さらに、いくつかの実施形態では、これらの特定のTCRを用いた、TRAC/TRBCダブルノックアウトは、CD4+細胞において、より大きなIFN- γ 分泌を達成する際に有利である。理論に束縛されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では、HLAクラスI上に提示されたペプチドに対する反応性とは通常強く結びつかないCD4+細胞において、このような活性が確認されることはまれである。

【0028】

加えて、いくつかの実施形態では、これらの特定のTCRを用いた、TRAC/TRBCダブルノックアウトは、脱顆粒アッセイなどで、CD4+細胞においてより大きな反応を達成する際に有利である。繰り返しになるが、理論に束縛されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では、HLAクラスI上に提示されたペプチドに対する反応性とは通常強く結びつかないCD4+細胞において、このような活性が確認されることはまれである。

【0029】

加えて、いくつかの実施形態では、TRAC/TRBCダブルノックアウト変異体は、混合リンパ球培養反応などで試験した場合に、TRACシングルノックアウト変異体と比較して、より程度の小さなアロ反応性を達成する際に有利である。

【0030】

本発明はさらに、TRAC遺伝子座における遺伝子座内挿入を介して異種免疫受容体を発現させる方法であって、

細胞に、第一ガイドRNAと、第二ガイドRNAと、RNAガイド型DNA結合剤またはRNAガイド型DNA結合剤をコードする核酸と、を送達することを含み、

前記第一ガイドRNAが、

i) 配列番号1～89から選択されるガイド配列；

ii) 配列番号1～89から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド；

iii) 配列番号1～89から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列；

iv) 配列番号1、2、3、5、6のうちのいずれか1つを含むガイド配列；並びに

v) 配列番号2、3、5、6のうちのいずれか1つを含むガイド配列、

から選択される配列を含み、

前記第二ガイドRNAが、

i) 配列番号90、95、97、98、185、214、218から選択されるガイド配列；

ii) 配列番号90、95、97、98、185、214、および218から選択される

10

20

30

40

50

配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド；

i i i) 配列番号 90、95、97、98、185、214、および 218 から選択される配列に対して少なくとも 99%、少なくとも 98%、少なくとも 97%、少なくとも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90% の同一性を有するガイド配列；

i v) 配列番号 90、95、97、185、および 214 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；

v) 配列番号 90、95、および 185 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；並びに

v i) 配列番号 90 または 214 を含むガイド配列、

から選択される配列を含む、方法を提供する。

10

【0031】

単一の切断および／または編集事象により、内在性 TRAC 遺伝子の「ノックアウト」が可能であり得る。さらなる利点として、編集プロセス中に鑄型を導入または供給する場合、目的の外來性ポリペプチドを編集事象の標的遺伝子座に挿入できる。この利点は特に、配列番号 90、95、97、185、203、204、205、206、210、211、および／または 214 を有するガイド RNA の使用から生じる。これらのガイド RNA は、TRBC 遺伝子の 1 または複数の遺伝子座を標的とする gRNA と併せて導入することもできる。

【0032】

第一ガイド RNA は配列番号 2 の配列を含み、第二ガイド RNA は配列番号 90 の配列を含み得る。

20

【0033】

第一ガイド RNA は配列番号 180 の配列を含み、第二ガイド RNA は配列番号 186 の配列を含み得る。

【0034】

第一ガイド RNA は配列番号 1、2、3、5、6 のいずれか 1 つの配列を含み、第二ガイド RNA は配列番号 90 の配列を含み得る。

【0035】

第一ガイド RNA は配列番号 1、2、3、5、6 のいずれか 1 つの配列を含み、第二ガイド RNA は配列番号 214 の配列を含み得る。

30

【0036】

第一ガイド RNA、第二ガイド RNA、および RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸は、実質的に同時に導入または投与され得る。

【0037】

TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子、および／または TRAC 遺伝子内の DNA 配列は、同時に改変され得る。

【0038】

RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸は、改変方法の一部として導入または投与され得る。

40

【0039】

上記方法は、

(a) 細胞および／もしくは対象における TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／もしくは TRAC 遺伝子内に二本鎖切断 (DSB) を導入すること；または

(b) 細胞および／もしくは対象における TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／もしくは TRAC 遺伝子内に一本鎖切断 (SSB) を導入すること；または

(c) 細胞および／もしくは対象における TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／もしくは TRAC 遺伝子の発現を減少させること、

をさらに含み得る。

【0040】

50

上記方法は、目的ポリペプチドをコードする核酸配列を導入することをさらに含み得るが、所望により、

- (a) 上記 1 または複数の目的ポリペプチドは受容体を含む；
- (b) 上記 1 または複数の目的ポリペプチドは免疫受容体を含む；
- (c) 上記 1 または複数の目的ポリペプチドは T 細胞受容体を含み、さらに所望により、上記 T 細胞受容体はがん抗原を認識する；
- (d) 上記 1 または複数の目的ポリペプチドは W T 1 特異的な T 細胞受容体を含み、前記 T 細胞受容体は W T 1 またはその断片を認識する；
- (e) 上記 1 または複数の目的ポリペプチドはキメラ抗原受容体を含み、さらに所望により、上記キメラ抗原受容体はがん抗原を認識する；あるいは、
- (f) 上記 1 または複数の目的ポリペプチドは W T 1 特異的なキメラ抗原受容体を含み、上記キメラ抗原受容体は W T 1 またはその断片を認識する。

10

【 0 0 4 1 】

上記方法は、以下をさらに含み得る：

- a. T C R α 鎖および T C R β 鎖を導入すること；
- b. T C R α 鎖および T C R β 鎖をコードする 1 または複数の核酸配列を導入すること；
- c. W T 1 特異的な T C R の α 鎖および β 鎖を導入すること；
- d. W T 1 特異的な T C R の α 鎖および β 鎖をコードする 1 または複数の核酸配列を導入すること；
- e. 以下から選択される第一 T C R 配列を導入すること：(i) 配列番号 5 0 1 または配列番号 5 0 4；(i i) 配列番号 5 0 1 または配列番号 5 0 4 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 7 0 %、または少なくとも 6 0 % の同一性を有するアミノ酸配列；および、(i i i) 配列番号 5 0 1 または配列番号 5 0 4 の少なくとも 2 0 個、少なくとも 3 0 個、少なくとも 4 0 個、少なくとも 5 0 個、少なくとも 6 0 個、少なくとも 7 0 個、少なくとも 8 0 個、少なくとも 9 0 個、少なくとも 1 0 0 個、少なくとも 1 5 0 個、少なくとも 2 0 0 個、または少なくとも 2 5 0 個のアミノ酸の連続的な部分配列、

20

並びに、

- 以下から選択される第二 T C R 配列を導入すること：(i) 配列番号 5 0 2 または配列番号 5 0 5；(i i) 配列番号 5 0 2 または配列番号 5 0 5 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 7 0 %、または (o f) 少なくとも 6 0 % の同一性を有するアミノ酸配列；および、(i i i) 配列番号 5 0 2 または配列番号 5 0 5 の少なくとも 2 0 個、少なくとも 3 0 個、少なくとも 4 0 個、少なくとも 5 0 個、少なくとも 6 0 個、少なくとも 7 0 個、少なくとも 8 0 個、少なくとも 9 0 個、少なくとも 1 0 0 個、少なくとも 1 5 0 個、少なくとも 2 0 0 個、少なくとも 2 5 0 個、または少なくとも 3 0 0 個のアミノ酸の連続的な部分配列、
- f. 以下から選択される第一 T C R 配列を導入すること：(i) 配列番号 5 0 1 または配列番号 5 1 3；(i i) 配列番号 5 1 0 または配列番号 5 1 3 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 7 0 %、または (o f) 少なくとも 6 0 % の同一性を有するアミノ酸配列；および、(i i i) 配列番号 5 1 0 または配列番号 5 1 3 の少なくとも 2 0 個、少なくとも 3 0 個、少なくとも 4 0 個、少なくとも 5 0 個、少なくとも 6 0 個、少なくとも 7 0 個、少なくとも 8 0 個、少なくとも 9 0 個、少なくとも 1 0 0 個、少なくとも 1 5 0 個、少なくとも 2 0 0 個、または少なくとも 2 5 0 個のアミノ酸の連続的な部分配列、

30

40

並びに、

- 以下から選択される第二 T C R 配列を導入すること：(i) 配列番号 5 1 1 または配列番号 5 1 4；(i i) 配列番号 5 1 1 または配列番号 5 1 4 に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 7 0 %、または (o f) 少なくとも 6 0 % の同一性を有するアミノ酸配列；および、(i i i) 配列番号 5 1 1 または配列番号 5 1 4 の少なくとも 2 0 個、少なくとも 3 0 個、少

50

なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、少なくとも250個、または少なくとも300個のアミノ酸の連続的な部分配列、g. (e) または (f) の第一TCR配列をコードする配列を含む核酸配列を導入すること；

h. (e) ~ (f) の第二TCR配列をコードする配列を含む核酸配列を導入すること；

i. (g) および (h) の核酸配列を含む核酸配列を導入すること；

j. 配列番号500、503、506、509、512、515、518、もしくは521から選択されるポリペプチド、またはそれに対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を導入すること、所望により、それをコードする核酸配列を導入することにより導入すること；

k. 以下の (i) ~ (vii) から選択されるTCR α 鎖ポリペプチドおよびTCR β 鎖ポリペプチド、または、それに対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を導入すること；

i) 配列番号501および配列番号502；

ii) 配列番号504および配列番号505；

iii) 配列番号507および配列番号508；

iv) 配列番号510および配列番号511；

v) 配列番号513および配列番号514；

vi) 配列番号516および配列番号517；

vii) 配列番号519および配列番号520；

l. (k) のTCR α 鎖ポリペプチドおよびTCR β 鎖ポリペプチドをコードする核酸配列を導入すること。

【0042】

第一核酸配列は第一標的遺伝子座に対して相同な配列に隣接していてもよい。第二核酸配列は第二標的遺伝子座に対して相同な配列に隣接していてもよい。隣接配列は少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、または少なくとも40ヌクレオチド長の配列であり得る。

【0043】

第一標的遺伝子座は、TRAC遺伝子、TRBC1遺伝子、またはTRBC2遺伝子としてもよく、例えばTRAC遺伝子である。第二標的遺伝子座は、TRAC遺伝子、TRBC1遺伝子、またはTRBC2遺伝子としてもよく、例えば、TRBC1遺伝子またはTRBC2遺伝子のいずれかである。

【0044】

導入された核酸配列、または第一核酸配列および第二核酸配列は、プロモーター領域なしで構成されていてもよく、すなわち、上記核酸は「プロモーターレス」であってもよい。

【0045】

導入核酸配列、または前記第一核酸配列および第二核酸配列は、プロモーターに機能的に連結されていてもよく、所望により、上記プロモーターはEF-1 α プロモーター（配列番号603）である。

【0046】

導入核酸配列、または前記第一核酸配列および第二核酸配列は、ベクター、トランスフェクション、脂質ナノ粒子、またはマイクロインジェクションを介して導入されてもよい。

【0047】

上記ベクターはウイルスベクターであってもよく、さらに、所望により、上記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルスベクターである。

【0048】

本発明はまた、TCR (WT1特異的なTCRなど) の遺伝子座内挿入法であって、配列番号90、95、97、98、185、214、および218から選択されるガイド配列

10

20

30

40

50

を含むTCRを挿入するための第一ガイドRNA、並びに、所望により、(i) RNAガイド型DNA結合剤またはRNAガイド型DNA結合剤をコードする核酸；並びに／または、(ii) TCR (WT1特異的なTCRなど) をコードするドナー核酸分子、を送達することを含む、方法を提供する。上記方法は、配列番号1～89から選択される配列を含む第二ガイドRNAを送達することをさらに含む。上記方法は、配列番号179～184から選択される配列を含む第二ガイドRNAを送達することをさらに含む。

【0049】

TCRは、以下を含むWT1特異的なTCRであってもよい：

i) 配列番号500、503、506、509、512、515、518、もしくは521から選択されるポリペプチド、またはそれに対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列；または

ii) 以下の(i)～(viii)から選択されるTCRα鎖ポリペプチドおよびTCRβ鎖ポリペプチド、または、それに対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列：

i) 配列番号502および配列番号503；

ii) 配列番号504および配列番号505；

iii) 配列番号507および配列番号508；

iv) 配列番号510および配列番号511；

v) 配列番号513および配列番号514；

vi) 配列番号516および配列番号517；

vii) 配列番号519および配列番号520；

viii) 配列番号522および配列番号523。

【0050】

本発明はまた、以下を含む組成物を提供する：

a. 以下を含むガイドRNA：

i. 配列番号1～89から選択されるガイド配列；または

ii. 配列番号1～89から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド；または

iii. 配列番号1～89から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列；または

iv. 配列番号1～24のうちのいずれか1つを含むガイド配列；または

v. 配列番号1～6のうちのいずれか1つを含むガイド配列；および、所望により

b. RNAガイド型DNA結合剤またはRNAガイド型DNA結合剤をコードする核酸。

【0051】

上記組成物は、細胞におけるTRBC1遺伝子および／またはTRBC2遺伝子内のDNA配列を改変する際に使用され得る。上記組成物は、細胞におけるTRBC1遺伝子および／またはTRBC2遺伝子の発現を導入する際に使用され得る。上記組成物中のガイドRNAは、配列番号196～200のいずれかから選択される配列を含んでいてもよい。

【0052】

本発明はまた、以下を含む組成物を提供する：

a. 以下を含むガイドRNA：

i. 配列番号90～178、配列番号185、および配列番号213～218から選択されるガイド配列；または

ii. 配列番号90～178、配列番号185、および配列番号213～218から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド；または

iii. 配列番号90～178、配列番号185、および配列番号213～218から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なく

10

20

30

40

50

とも 96%、少なくとも 95%、少なくとも 94%、少なくとも 93%、少なくとも 92%、少なくとも 91%、または少なくとも 90%の同一性を有するガイド配列；または i v . 配列番号 90～113 および配列番号 213～218 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または

v . 配列番号 90～95 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および、所望により b . RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸。

【0053】

上記組成物は、細胞における TRAC 遺伝子内の DNA 配列を改変する際に使用されるものであり得る。上記組成物は、細胞における TRAC 遺伝子の発現を減少させる際に使用されるものであり得る。ガイド RNA は、配列番号 185～192 および配列番号 201～212 のいずれかから選択されるものであり得る。

10

【0054】

本発明はまた、本明細書に記載の方法によって改変された、細胞を提供する。上記細胞はエキソビボで改変されたものであり得る。

【0055】

上記細胞は T 細胞であり得る。上記細胞は、CD3+T 細胞、CD4+T 細胞、および／または CD8+T 細胞であり得る。上記細胞は、哺乳類細胞、霊長類細胞、またはヒト細胞であり得る。

【0056】

上記細胞は、内在性 T 細胞受容体を欠失したものであり得る。上記細胞は、非内在性 T 細胞受容体を発現する T 細胞の作製に好適なものであり得る。よって、上記細胞は、CAR を発現する T 細胞の作製に使用され得る。

20

【0057】

本明細書に記載されたように改変された細胞は、CD3-細胞であり得る。上記細胞は、改変前は CD3+細胞であり得る。

【0058】

上記細胞は、目的ポリペプチドをコードする 1 または複数の核酸配列をさらに含み得るが、所望により、

(a) 上記 1 または複数の目的ポリペプチドは受容体を含む；

(b) 上記 1 または複数の目的ポリペプチドは免疫受容体を含む；

30

(c) 上記 1 または複数の目的ポリペプチドは T 細胞受容体を含み、さらに所望により、上記 T 細胞受容体は WT1 に対して特異的である；あるいは、

(d) 上記 1 または複数の目的ポリペプチドはキメラ抗原受容体を含み、さらに所望により、上記キメラ抗原受容体は WT1 に対して特異的である。

【0059】

上記細胞は、外来性 T 細胞受容体の α 鎖および β 鎖をコードする 1 または複数の核酸配列をさらに含み得る。上記細胞は、外来性 T 細胞受容体の γ 鎖および δ 鎖をコードする 1 または複数の核酸配列をさらに含み得る。

【0060】

本明細書に記載の細胞の外来性 T 細胞受容体の α 鎖および β 鎖をコードする 1 または複数の核酸配列は、ゲノムの TRAC 遺伝子座内のものであり得る。本明細書に記載の細胞の外来性 T 細胞受容体の γ 鎖および δ 鎖をコードする 1 または複数の核酸配列は、ゲノムの TRAC 遺伝子座内のものであり得る。

40

【0061】

上記 TCR α 鎖の配列は、(i) 配列番号 501 または配列番号 504；(ii) 配列番号 501 または配列番号 504 に対して少なくとも 99%、少なくとも 95%、少なくとも 90%、少なくとも 85%、少なくとも 80%、少なくとも 70%、または (of) 少なくとも 60%の同一性を有する配列；および、配列番号 501 または配列番号 504 の少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 50 個、少なくとも 60 個、少なくとも 70 個、少なくとも 80 個、少なくとも 90 個、少なくとも 100

50

個、少なくとも150個、少なくとも200個、または少なくとも250個のアミノ酸の連続的な部分配列、から選択され得て；

上記TCRβ鎖の配列は、(i)配列番号502または配列番号505；(ii)配列番号502または配列番号505に対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも70%、または(of)少なくとも60%の同一性を有する配列；および、配列番号502または配列番号505の少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、少なくとも250個、または少なくとも300個のアミノ酸の連続的な部分配列、から選択され得る。

10

【0062】

上記TCRα鎖は、配列番号500、501、503、および504のいずれかに記載の核酸配列にコードされたものであり得て、上記βTCR鎖は、配列番号500、502、503、および505のいずれかに記載の核酸配列にコードされたものであり得る。

【0063】

上記TCRα鎖の配列は、(i)配列番号513；(ii)配列番号513に対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも70%、または(of)少なくとも60%の同一性を有する配列；および、配列番号513の少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、少なくとも250個、少なくとも300個、少なくとも350個、少なくとも400個、少なくとも500個、少なくとも600個、少なくとも700個、または少なくとも800個のアミノ酸の連続的な部分配列、から選択され得て、

20

上記TCRβ鎖の配列は、(i)配列番号514；(ii)配列番号514に対して少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも70%、または(of)少なくとも60%の同一性を有する配列；および、配列番号514の少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、少なくとも250個、少なくとも300個、少なくとも350個、少なくとも400個、少なくとも500個、少なくとも600個、少なくとも700個、または少なくとも800個のアミノ酸の連続的な部分配列、から選択され得る。

30

【0064】

上記αTCR鎖は配列番号513であり得て、上記TCRβ鎖は配列番号514であり得る。

【0065】

本明細書で開示される細胞の1または複数の遺伝子は、内在性プロモーターから発現され得る。

【0066】

本明細書で開示される細胞の1または複数の遺伝子は、異種プロモーターから発現され得て、所望により、上記異種プロモーターはEF-1αプロモーターである。

40

【0067】

改変された細胞は、外来性T細胞受容体のα鎖およびβ鎖をコードする遺伝子、並びに／または、外来性T細胞受容体のγ鎖およびδ鎖をコードする遺伝子を含み得る。好適なα鎖、β鎖、γ鎖、およびδ鎖は、当該技術分野において公知である。例えば、国際公開第2018/197492号を参照されたい。

【0068】

外来性T細胞受容体のα鎖およびβ鎖は、ゲノムのTRAC遺伝子座に存在し得る。外来性T細胞受容体のα鎖およびβ鎖は、転写物内で提供され、P2Aまたは他の切断配列に

50

よって隔てられている。

【0069】

本発明はまた、本明細書で開示される細胞を含む細胞集団であって、改変後集団の約50%超、約55%超、約60%超、約65%超、約70%超、約75%超、約80%超、約85%超、約90%超、約95%超、約98%超、または約99%超がCD3⁺細胞である、細胞集団を提供する。

【0070】

本発明はまた、本明細書で開示される細胞を含む細胞集団であって、改変後集団の約50%超、約55%超、約60%超、約65%超、約70%超、約75%超、約80%超、約85%超、約90%超、約95%超、約98%超、または約99%超が内在性T細胞受容体を欠失している、細胞集団を提供する。

10

【0071】

本発明はまた、本明細書で開示される細胞を含む細胞集団であって、集団におけるTRBC1遺伝子、TRBC2遺伝子、および／またはTRAC遺伝子の発現が、未改変の同一細胞集団と比較して、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95%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%減少している、細胞集団を提供する。

【0072】

上記の発現減少はTRBC1遺伝子の発現減少であり得る。上記の発現減少はTRBC2遺伝子の発現減少であり得る。上記の発現減少はTRAC遺伝子の発現減少であり得る。

20

【0073】

上記細胞集団の10～100%、例えば集団の30～99%が、TRBC1遺伝子、TRBC2遺伝子、および／またはTRAC遺伝子にインデルを有し得る。

【0074】

さらに、前記集団の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%が、TRBC1遺伝子、TRBC2遺伝子、および／またはTRAC遺伝子にインデルを有し得る。

【0075】

インデルまたは挿入は、TRBC1遺伝子におけるものであり得る。インデルまたは挿入は、TRBC2遺伝子におけるものであり得る。インデルまたは挿入は、TRAC遺伝子におけるものであり得る。

30

【0076】

本明細書に記載の方法、または本明細書に記載の用途の組成物は、TRBC1遺伝子および／またはTRBC2遺伝子の編集をもたらし得る。本明細書に記載の方法、または本明細書に記載の用途の組成物は、TRAC遺伝子の編集をもたらし得る。本明細書に記載の方法、または本明細書に記載の用途の組成物は、TRBC遺伝子およびTRAC遺伝子の編集をもたらし得る。

【0077】

編集は、編集を受けた集団の割合（編集率またはインデル率）として算出され得る。編集率は、集団の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%であり得る。

40

【0078】

本明細書に記載の組成物は、以下を含むsgRNAを含み得る：

- (e) 配列番号179～184および配列番号196～200のいずれか1つ；または
- (f) 配列番号1～89のうちのいずれか1つから選択されるガイド配列；または
- (g) 配列番号1～24から選択されるガイド配列；または
- (h) 配列番号1～6から選択されるガイド配列。

50

【0079】

本明細書に記載の組成物は、以下を含む s g R N A を含み得る：

- (i) 配列番号 1 8 6 ～ 1 9 2 および配列番号 2 0 1 ～ 2 1 2 のいずれか 1 つ；または
- (j) 配列番号 9 0 ～ 1 7 8、配列番号 1 8 5、および配列番号 2 1 3 ～ 2 1 8 のいずれか 1 つから選択されるガイド配列；または
- (k) 配列番号 9 0 ～ 1 1 3 および配列番号 2 1 3 ～ 2 1 8 から選択されるガイド配列；または
- (l) 配列番号 9 0 ～ 9 5 から選択されるガイド配列。

【0080】

標的配列は、T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の、第 1 エクソン、第 2 エクソン、第 3 エクソン、または第 4 エクソンに存在し得る。標的配列は、ヒト T R B C 1 遺伝子、ヒト T R B C 2 遺伝子、および／またはヒト T R A C 遺伝子に存在し得る。

10

【0081】

標的配列は、T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の、第 1 エクソンに存在し得る。標的配列は、T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の、第 2 エクソンに存在し得る。標的配列は、T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の、第 3 エクソンに存在し得る。標的配列は、T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の、第 4 エクソンに存在し得る。

20

【0082】

ガイド配列は、T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子のプラス鎖における標的配列に対し相補的であり得る。ガイド配列は、T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子のマイナス鎖における標的配列に対し相補的であり得る。

【0083】

第一ガイド配列は T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子のプラス鎖内の第一標的配列に対して相補的であり得て、且つ、上記組成物は T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子のマイナス鎖内の第二標的配列に対して相補的な第二ガイド配列をさらに含む。

30

【0084】

ガイド R N A は配列番号 1 ～ 1 7 8 のいずれか 1 つから選択されるガイド配列を含み、且つ、配列番号 4 0 0 のヌクレオチド配列をさらに含み得て、配列番号 4 0 0 のヌクレオチドはガイド配列の 3 ' 末端の後に続いている。

【0085】

ガイド R N A は配列番号 1 ～ 1 7 8 のいずれか 1 つから選択されるガイド配列を含み、且つ、配列番号 4 0 1 のヌクレオチド配列をさらに含み得て、配列番号 4 0 1 のヌクレオチドはガイド配列の 3 ' 末端の後に続いている。

【0086】

ガイド R N A は、配列番号 3 0 0 のパターンに従って改変されたものであり得て、N は、まとめて、配列番号 1 ～ 8 9 のガイド配列のいずれか 1 つである。配列番号 3 0 0 内の各 N は任意の天然ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチドであり得て、上記 N はガイド配列を形成し、上記ガイド配列は C a s 9 を T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子に標的化する。

40

【0087】

第一ガイド R N A は配列番号 2 の配列を含み、第二ガイド R N A は配列番号 9 0 の配列を含み得る。

【0088】

上記方法のいずれかは、以下をさらに含み得る：

- (a) 以下から選択される核酸配列を含む第一核酸配列を導入すること：(i) 配列番号

50

250 ; (i i) 配列番号 250 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 95 %、少なくとも 90 %、少なくとも 85 %、少なくとも 80 %、少なくとも 70 %、または (o f) 少なくとも 60 % の同一性を有する配列 ; および、(i i i) 配列番号 250 の少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 50 個、少なくとも 60 個、少なくとも 70 個、少なくとも 80 個、少なくとも 90 個、少なくとも 100 個、少なくとも 150 個、少なくとも 200 個、少なくとも 250 個、少なくとも 300 個、少なくとも 350 個、少なくとも 400 個、少なくとも 500 個、少なくとも 600 個、少なくとも 700 個、または少なくとも 800 個のヌクレオチドの連続的な部分配列、並びに、

以下から選択される核酸配列を含む第二核酸配列を導入すること : (i) 配列番号 252 ; (i i) 配列番号 252 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 95 %、少なくとも 90 %、少なくとも 85 %、少なくとも 80 %、少なくとも 70 %、または (o f) 少なくとも 60 % の同一性を有する配列 ; および、(i i i) 配列番号 252 の少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 50 個、少なくとも 60 個、少なくとも 70 個、少なくとも 80 個、少なくとも 90 個、少なくとも 100 個、少なくとも 150 個、少なくとも 200 個、少なくとも 250 個、少なくとも 300 個、少なくとも 350 個、少なくとも 400 個、少なくとも 500 個、少なくとも 600 個、少なくとも 700 個、少なくとも 800 個、または少なくとも 900 個のヌクレオチドの連続的な部分配列、

(b) 以下から選択される核酸配列を含む第一核酸配列を導入すること : (i) 配列番号 513 ; (i i) 配列番号 513 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 95 %、少なくとも 90 %、少なくとも 85 %、少なくとも 80 %、少なくとも 70 %、または (o f) 少なくとも 60 % の同一性を有する配列 ; および、(i i i) 配列番号 513 の少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 50 個、少なくとも 60 個、少なくとも 70 個、少なくとも 80 個、少なくとも 90 個、少なくとも 100 個、少なくとも 150 個、少なくとも 200 個、少なくとも 250 個、少なくとも 300 個、少なくとも 350 個、少なくとも 400 個、少なくとも 500 個、少なくとも 600 個、少なくとも 700 個、または少なくとも 800 個のヌクレオチドの連続的な部分配列、並びに、

以下から選択される核酸配列を含む第二核酸配列を導入すること : (i) 配列番号 514 ; (i i) 配列番号 514 に対して少なくとも 99 %、少なくとも 95 %、少なくとも 90 %、少なくとも 85 %、少なくとも 80 %、少なくとも 70 %、または (o f) 少なくとも 60 % の同一性を有する配列 ; および、(i i i) 配列番号 514 の少なくとも 20 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 50 個、少なくとも 60 個、少なくとも 70 個、少なくとも 80 個、少なくとも 90 個、少なくとも 100 個、少なくとも 150 個、少なくとも 200 個、少なくとも 250 個、少なくとも 300 個、少なくとも 350 個、少なくとも 400 個、少なくとも 500 個、少なくとも 600 個、少なくとも 700 個、少なくとも 800 個、または少なくとも 900 個のヌクレオチドの連続的な部分配列、

(c) (a) の第一核酸配列と、(a) の第二核酸配列と、を含む核酸配列を導入すること ; または

(d) (b) の第一核酸配列と、(b) の第二核酸配列と、を含む核酸配列を導入すること。

【 0089 】

s g R N A は、配列番号 1 ~ 89 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列を含み得る。

【 0090 】

ガイド R N A は化学合成されたものであり得る。ガイド R N A は R N P に含まれたもので

あり得る。鋳型核酸はウイルスベクターに含まれたものであり得る。鋳型核酸は非ウイルス性送達コンストラクトに含まれたものであり得る。好適なウイルスベクターは、当該技術分野において公知のものであり、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、およびこれらのハイブリッドである。ウイルスベクターは、レンチウイルス（LV）ベクターまたはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターであり得る。

【0091】

ガイドRNAは、所望により、以下の修飾のうちの1または複数を含み得る：

- i) 2'-O-メチル（2'-O-Me）修飾ヌクレオチド、
- ii) ヌクレオチド間のホスホロチオエート（PS）結合、
- iii) 2'-フルオロ（2'-F）修飾ヌクレオチド、
- iv) ガイドRNAの5'末端の最初の5個のヌクレオチドの1または複数における修飾、
- v) ガイドRNAの3'末端の最後の5個のヌクレオチドの1または複数における修飾、
- vi) ガイドRNAの5'末端の最初の4個のヌクレオチド間のPS結合、
- vii) ガイドRNAの3'末端の最後の4個のヌクレオチド間のPS結合、
- viii) ガイドRNAの5'末端の最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチド、
- ix) ガイドRNAの3'末端の最後の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチド。

【0092】

ガイドRNAは、上記の修飾を有する配列番号300のヌクレオチドを含み得る。

【0093】

上記組成物は、薬剂的に許容できる医薬品添加物をさらに含み得る。

【0094】

LNPは、生分解性のイオン性脂質を含み得て、例えば、イオン性脂質は、（9Z，12Z）-3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9，12-ジエノアート、別名3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（9Z，12Z）-オクタデカ-9，12-ジエノアートである。

【0095】

LNPは、中性脂質を含み得て、例えば、中性脂質はDSPCである。

【0096】

LNPは、ヘルパー脂質を含み得て、例えば、ヘルパー脂質はコレステロールである。

【0097】

LNPはステルス脂質（stealth lipid）を含み得て、例えば、ステルス脂質はPEG2k-DMGである。

【0098】

上記組成物はRNAガイド型DNA結合剤をさらに含み得る。ガイドRNAおよびRNAガイド型DNA結合剤の組成物は、リボ核タンパク質（RNP）に含まれたものであり得る。

【0099】

上記組成物は、RNAガイド型DNA結合剤、例えばCas9、またはRNAガイド型DNA結合剤をコードするmRNAを含み得て、例えば、RNAガイド型DNA結合剤は、Cas9遺伝子にコードされたものであってもよいし、あるいは、Cas9タンパク質であってもよい。

【0100】

上記組成物は、医薬製剤であり得て、薬剂的に許容できる担体をさらに含み得る。

【0101】

本発明はまた、医薬の調製における、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞

10

20

30

40

50

の使用を提供する。

【0102】

本発明はまた、がんの治療における、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の使用を提供する。

【0103】

本発明はまた、対象の免疫療法における、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の使用を提供する。

【0104】

本発明はまた、ウィルムス腫瘍抗原（WT1）を過剰発現する腫瘍の治療における、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の使用を提供する。

【0105】

本発明はまた、疾患または障害の治療で使用される、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞を提供する。

【0106】

本発明はまた、免疫療法で使用される、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞を提供する。

【0107】

本発明はまた、がんの治療で使用される、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞を提供する。

【0108】

本発明はまた、ウィルムス腫瘍抗原（WT1）を過剰発現する腫瘍の治療で使用される、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞を提供する。

【0109】

本発明はまた、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の投与を含むヒトまたは動物の治療方法における、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞を提供する。

【0110】

本発明はまた、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の投与を含むヒトまたは動物におけるがんの治療方法における、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞を提供する。

【0111】

本発明はまた、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の投与を含むヒトまたは動物の免疫療法の方法における、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞を提供する。

【0112】

本発明はまた、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞の投与を含むヒトまたは動物におけるウィルムス腫瘍抗原（WT1）を過剰発現する腫瘍の治療方法における、本明細書に記載の組成物、製剤、集団、または細胞を提供する。

【0113】

ガイドRNAは、配列番号1～89のいずれかから選択される配列を有し得る。

【0114】

ガイドRNAは、配列番号90～178、配列番号185、および配列番号213～218のいずれかから選択される配列を有し得る。

【0115】

また、ガイド配列が、20%以上、30%以上、40%以上、または50%以上の、改変産物中のインデルの頻度が得られる、ガイド配列の群から選択される、実施形態が開示される。

【0116】

また、ガイド配列が、20%以上、30%以上、40%以上、または50%以上の、改変産物中のドナー核酸分子の挿入の頻度が得られる、ガイド配列の群から選択される、実施

10

20

30

40

50

形態が開示される。

【0117】

また、対象を治療するための医薬の調製のための、上記実施形態のいずれかの組成物、製剤、集団、または細胞の使用が開示される。上記対象は、ヒトまたは動物（例えばヒト；カニクイザル）であり得る。いくつかの実施形態では、上記対象はヒトである。

【0118】

また、TRBC1遺伝子、TRBC2遺伝子、およびTRAC遺伝子のうちのいずれか1つまたは複数、の治療に使用される、または、その改変（例えば、それにおけるインデルの形成、またはそれにおけるフレームシフト変異もしくはナンセンス変異の形成）に使用される、上記の組成物または製剤のいずれかが開示される。

【0119】

上記の細胞の態様および実施形態のいずれかにおいて、第一gRNA分子のターゲティングドメインに対して相補的な標的配列を含む遺伝子、並びに、所望により、第二gRNA分子のターゲティングドメインに対して相補的な標的配列を含む遺伝子、および／または、第三gRNA分子のターゲティングドメインに対して相補的な標的配列を含む遺伝子は、第一gRNA分子のターゲティングドメインに対して相補的な標的配列を含む遺伝子の機能的産物の発現、並びに、所望により、第二gRNA分子のターゲティングドメインに対して相補的な標的配列を含む遺伝子、および／または、第三gRNA分子のターゲティングドメインに対して相補的な標的配列を含む遺伝子の機能的産物が減少または消失するように、改変されている。

【0120】

別の態様では、本発明は、対象において免疫療法を提供する方法であって、本明細書に記載の細胞、例えば上記の細胞の態様および実施形態のいずれかの細胞、の有効量を対照に投与することを含む、方法を提供する。

【0121】

上記方法の各実施形態では、上記方法は、リンパ球除去剤または免疫抑制剤を投与後に、本明細書に記載の細胞、例えば上記の細胞の態様および実施形態のいずれかの細胞、の有効量を対象に投与することを含む。別の態様では、本発明は、細胞（例えば、細胞集団）を調製する方法を提供する。

【0122】

免疫療法は、免疫系を活性化または抑制することによる、疾患の治療である。免疫応答を誘発または増幅するように設計された免疫療法は、活性化免疫療法に分類される。細胞ベースの免疫療法は、いくつかのがんの治療で有効であることが示されている。リンパ球、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、および／または細胞傷害性Tリンパ球（CTL）などの免疫エフェクター細胞は、腫瘍細胞の表面上に発現された異常な抗原に反応して作用するようにプログラムすることができる。よって、がん免疫療法は、免疫系の構成成分に、腫瘍または他のがん性細胞を破壊させるものである。

【0123】

別の態様では、本発明は、免疫療法用の細胞（例えば、細胞集団）を作製する方法であって、（a）例えば、細胞に、gRNA分子（本明細書に記載のgRNA分子）、または本明細書において開示される2以上のgRNA分子を導入することにより、T細胞受容体（TCR）の1または複数または全ての構成成分の発現を減少または消失させることにより、細胞を改変すること；並びに、（b）上記細胞を増殖させること、を含む、方法を提供する。本発明の細胞は、例えば、TCR／CD3ζ鎖シグナル伝達を媒介するポリペプチドをコードする異種配列の導入による、さらなる改変に好適である。いくつかの実施形態では、上記ポリペプチドは野生型TCRまたはバリエーション型TCRである。本発明の細胞はまた、別の抗原結合部分をコードする異種配列の導入による、例えば、別の（非内在性の）T細胞受容体、例えば特定のタンパク質を標的とするように改変されたキメラ抗原受容体（CAR）、をコードする異種配列の導入による、さらなる改変に、好適であり得る。CARは、キメラ免疫受容体、キメラT細胞受容体、または人工T細胞受容体としても

10

20

30

40

50

知られている。

【0124】

別の態様では、本発明は、治療を必要とする対象を治療する方法であって、本明細書に記載の細胞を作製する方法、例えば、上記の細胞を作製する方法の態様および実施形態のいずれかの方法、によって作製された細胞（例えば、細胞集団）を投与することを含む、方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0125】

【図1】HEK-Cas9細胞におけるTRAC編集の程度を示している。

【図2】ヒトCD3+T細胞におけるTRAC編集の程度を示している。

10

【図3】ヒトCD3+T細胞におけるTRAC編集後のTCR発現量を示している。

【図4】HEK-Cas9細胞におけるTRBC編集の程度を示している。図4AはTRBC1における編集を示しており、図4BはTRBC2における編集を示している。

【図5】ヒトCD3+T細胞におけるTRBC編集の程度を示している。

【図6】ヒトCD3+T細胞におけるTRBC編集後のTCR発現量を示している。

【図7】TRBCガイド、TRACガイド、および対照ガイド（配列番号193および配列番号194）の場合の、生化学的オフターゲット解析（潜在的なオフターゲット編集部位の測定）を示している。

【図8】T細胞受容体のノックアウトおよびTCRコンストラクトの挿入による、TCR編集後T細胞を含む細胞の作製を示している。図8Aは、T細胞受容体ノックアウトの効率を示している。図8Bは、TCRコンストラクトのレンチウイルストランスフェクションの効率を示している。図8Cは、編集後T細胞におけるTCRインサートの発現を示している。図8Dは、TCR編集後T細胞の表現型を示している。

20

【図9】TCR挿入を有するT細胞の、初代AML芽球を死滅させる能力を示している。図9A～図9Cは、HLA-A*02:01対立遺伝子を有する3人の異なる患者から得られた初代AML芽球を用いて得られた結果を示している。図9Dは、対照試料（特定のHLA対立遺伝子を有していない初代芽球）を用いて得られた結果を示している。

【図10】複数のデュアルガイドRNAを用いたTRAC遺伝子座およびTRBC遺伝子座の同時編集によって得られた編集頻度を示している。

【図11】組み合わせ編集にTRAC標的crRNAおよびTRBC標的crRNAを用いた場合の結果を示している。図11Aは、T細胞受容体ノックアウトの効率を示している。図11Bは、この細胞における、HD1-TCRコンストラクトのレンチウイルストランスフェクションを示している。図11Cは、編集後T細胞におけるTCRインサートの発現を示している。図11Dは、TCR編集後T細胞の表現型を示している。

30

【図12】複数のシングルガイドRNAを用いたTRAC遺伝子座およびTRBC遺伝子座の同時編集によって得られた編集頻度を示している。図12Aは、TRAC遺伝子座およびTRBC遺伝子座の編集後のCD3-T細胞の表現型割合を示している。図11Bは、ヒトCD3-T細胞のTRAC遺伝子座およびTRBC遺伝子座におけるインデル形成の遺伝子型割合を示している。

【図13】ギャップ入り挿入鑄型を含む、デュアルRNAガイドおよびAAVベクター（AV9）を用いた、TRAC遺伝子座におけるGFP挿入の程度（図13A）、並びに、CD3-であるこれらのデュアルRNAガイドおよびAAVベクターを用いた、TRACノックアウトの程度（図13B）を示している。ギャップ入り挿入鑄型（または、単に、ギャップ入り鑄型）は、「ギャップ」、すなわち、ギャップ入り挿入鑄型には存在しない対応する標的配列内の領域、に隣接した2つの配列を含む。ギャップ入り挿入鑄型は、切断用のギャップ内の部位を標的とするガイドと適合性であり、共にギャップ内の切断部位を標的とする限りにおいて、全く同じ切断部位を標的とするかどうかにかかわらず、このようなガイドを量的に比較する場合に有用である。

40

【図14】sgRNAおよびギャップ入り鑄型AV9を用いた、TRAC遺伝子座におけるGFP挿入の程度（図14A）、並びに、表現型がCD3-である、これらのsgRNA

50

Aおよびギャップ入り鑄型AV9を用いて操作された細胞の割合(図14B)を示している。

【図15】FACS解析時にポジティブ四量体染色(図15A)および平均蛍光強度(MFI)(図15B)で測定された、TCR挿入における、種々のプロモーターおよび逆位末端配列(ITR)の長さの比較である。

【図16】TRAC遺伝子座におけるプロモーターレスGFPコンストラクトのAAV挿入による挿入プロトコルによって操作された細胞における、内在性TRACプロモーターから駆動されたGFP発現の量を示している。図16Aは、モックトランスフェクション対照を示しており、図16BはRNPを示しており、図16CはRNP+AV10-EGFPを示している。X軸：GFP発現；Y軸：CD3e発現；FACSで測定。

【図17】TRAC遺伝子座における、プロモーター配列を有するTCRコンストラクト鑄型およびプロモーター配列を持たないTCRコンストラクト鑄型(PL：プロモーターレス；EF1a：プロモーターEF1アルファまたはEF-1 α)の挿入効率を示している。

【図18】2つの異なるTCRを用いた、プロモーターが形質転換用コンストラクトに含まれる場合および含まれない場合の、挿入形質転換体における脱顆粒を測定している。

【図19】2つの異なるTCRを用いた、プロモーターが形質転換用コンストラクトに含まれる場合および含まれない場合の、挿入形質転換体におけるインターフェロン γ 発現を測定している。

【図20】1つはCys修飾を含み、1つはCys修飾を含んでいない、2つのTCRコンストラクトの表面における存在を示している。

【図21-1】図21A~図21Bは、フローサイトメトリー測定により、挿入されたコンストラクトのTCR鎖および内在性TCR鎖間の誤対合の程度を測定している。図21Aおよび図21BのFACSデータは、トランスジェニックTCRまたは誤対合TCRを発現している操作された細胞の画分を示しており、図21Aおよび図21Bの操作された細胞におけるTCR発現の強度が、それぞれ図21Cおよび図21DでMFIとしてグラフ化されている。

【図21-2】図21-1の続きである。

【図22】フローサイトメトリー測定により、CD8+細胞またはCD4+細胞における、挿入されたコンストラクトのTCR鎖および内在性TCR鎖間の誤対合の程度を測定している。

【図23】TRBCノックアウトを含む、およびそれを含まない、4種の異なるTCR型におけるVLD(ウィルス腫瘍抗原)四量体染色を示しており、WT1-TCR改変CD8+細胞における誤対合の程度が示されている。

【図24】TRBCノックアウトを含む、およびそれを含まない、4種の異なるTCRにおけるVLD(ウィルス腫瘍抗原)四量体染色を示しており、WT1-TCR改変CD4+細胞における誤対合の程度が示されている。

【図25】四量体染色のMFIで測定された、TRBCのノックアウトと共に、4種のTCRコンストラクトをTRAC遺伝子座に挿入した場合の、CD8+細胞におけるTCR発現の強度を示している。

【図26】四量体染色のMFIで測定された、TRBCのノックアウトと共に、4種のTCRコンストラクトをTRAC遺伝子座に挿入した場合の、CD4+細胞におけるTCR発現の強度を示している。

【図27-1】挿入されたトランスジェニックTCR(AV11-TCR-A、AV13-TCR-B、AV12-TCR-Cを含み、且つ、TRAC/TRBCダブルノックアウトまたはTRACシングルノックアウトである、T細胞の細胞毒性を示している。細胞毒性は、6時間後の、カスパーゼ3/7アポトーシス細胞に応答した、アポトーシス細胞からの蛍光を測定することにより測定した。

【図27-2】図27-1の続きである。

【図28-1】挿入されたトランスジェニックTCR(AV11-TCR-A、AV14

10

20

30

40

50

－TCR－F、AV15－TCR－G、AV16－TCR－H）を含み、且つ、TRAC／TRBCダブルノックアウトまたはTRACシングルノックアウトである、T細胞の細胞毒性を示している。細胞毒性は、6時間後の、カスパーゼ3／7アポトーシス細胞に回答した、アポトーシス細胞からの蛍光を測定することにより測定した。

【図28－2】図28－1の続きである。

【図29－1】ELISAによって測定された、挿入されたトランスジェニックTCR（AV11－TCR－A、AV13－TCR－B、AV12－TCR－C、AV14－TCR－F、AV15－TCR－G、AV16－TCR－H）を含み、且つ、TRAC／TRBCダブルノックアウトまたはTRACシングルノックアウトであるT細胞からの、ペプチド特異的IL－2分泌のレベルを示している。

10

【図29－2】図29－1の続きである。

【図29－3】図29－1の続きである。

【図29－4】図29－1の続きである。

【図30】ELISAによって測定された、挿入されたトランスジェニックTCR（AV11－TCR－A、AV14－TCR－F、AV15－TCR－G、AV16－TCR－H）を含み、且つ、TRAC／TRBCダブルノックアウトまたはTRACシングルノックアウトであるT細胞からの、ペプチド特異的IFN－ γ 分泌のレベルを示している。

【図31】挿入されたトランスジェニック（AV11－TCR－A、AV14－TCR－F、AV15－TCR－G、AV16－TCR－H）を含み、且つ、TRAC／TRBCダブルノックアウトまたはTRACシングルノックアウトであるCD4＋T細胞およびCD8＋T細胞における、ペプチド特異的IFN－ γ 染色のレベルを示している。

20

【図32】CD107a脱顆粒アッセイの結果を示しており、TRBCノックアウトの存在下または非存在下において、ネイティブなTRACがノックダウンされたTRAC遺伝子座にトランスジェニックTCR（AV11－TCR－A、AV14－TCR－F、AV15－TCR－G、AV16－TCR－H）を有するCD4＋細胞およびCD8＋細胞のアロ反応性の程度が示されている。図32Aは、CD8＋T細胞中のCD107a＋染色細胞の割合を示している。図31Bは、CD4＋T細胞中のCD107a＋染色細胞の割合を示している。

【図33－1】混合リンパ球培養反応の結果を示しており、TRBCノックアウトの存在下または非存在下において、ネイティブなTRACがノックダウンされたTRAC遺伝子座にトランスジェニックTCRを有するCD4＋細胞およびCD8＋細胞のアロ反応性の程度が示されている。CTV：CellTrace Violet（サーモフィッシャー社）。

30

【図33－2】図33－1の続きである。

【発明を実施するための形態】

【0126】

以下、本発明の特定の実施形態を詳細に言及し、その例を貼付の図面に示す。種々の実施形態と関連させて本教示を説明しているが、本教示をそれらの実施形態に限定する意図はない。その逆に、本教示は、当業者であれば理解できるような、種々の変更形態、変形形態、および均等形態も包含する。

40

【0127】

本教示を詳細に説明する前に、本開示が特定の組成物または工程段階に限定されず、従って変化し得るものであることを理解されたい。なお、本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈によって特に明示されない限り、複数の指示対象（reference）を包含する。すなわち、例えば、「複合体（a conjugate）」という場合、複数の複合体も包含され、「細胞（a cell）」という場合、複数の細胞も包含されるなどである。

【0128】

数値範囲は当該範囲を規定している数を含める。有効数字および測定に伴う誤差を考慮して、測定された値および測定可能な値は近似であると理解される。また、「を含む（co

50

prise)」、「を含む (comprises)」、「を含むこと (comprising)」、「を含有する (contain)」、「を含有する (contains)」、「を含有すること (containing)」、「を包含する (include)」、「を包含する (includes)」、および「を包含すること (including)」の使用は、限定を意図するものではない。上記の概要と、詳細な説明は共に例示と説明のみを目的としており、本教示の限定を意図するものではないことを理解されたい。

【0129】

本明細書において特に記載のない限り、種々の成分「を含む」と述べている本明細書における実施形態は、記載された成分「からなる」または記載された成分「から本質的になる」とも見なされ；種々の成分「からなる」と述べている本明細書における実施形態は、記載された成分「を含む」または記載された成分「から本質的になる」とも見なされ；種々の成分「から本質的になる」と述べている本明細書における実施形態は、記載された成分「を含む」または記載された成分「からなる」とも見なされる（この互換性は請求項におけるこれらの用語の使用には適用されない）。別段の明確な指示がない限り、用語「または」は本明細書においては包含の意味で使用され、すなわち、「および／または」と等価である。用語「約」は、列挙の前に使用されている場合、当該列挙の各構成要素を修飾している。

【0130】

本明細書で使用されている節の見出しは構成のみを目的としており、目的の発明の主題を何ら限定するものではないと解すべきである。参照によって援用された資料が、本明細書で定義された用語や本明細書のその他の明示的な内容と矛盾する場合、本明細書が優先される。

【0131】

I. 定義

特に記載がない限り、本明細書で使用される以下の用語および表現は、以下の意味を有することが意図される。

【0132】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書で使用される場合、骨格に沿って連結し合った窒素含有複素環塩基または塩基類似体を有するヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体を含む多量体化合物を指し、従来のRNA、DNA、混合RNA-DNA、およびその類似体である重合体を包含する。核酸の「骨格」は、糖-ホスホジエステル結合、ペプチド-核酸結合（「ペプチド核酸」またはPNA；国際公開第95/32305号）、ホスホロチオエート結合、メチルホスホン酸結合、またはこれらの組み合わせ、の1または複数を含む種々の結合で構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または置換（例えば、2'メトキシ置換または2'ハロゲン化物置換）を含む類似化合物であり得る。窒素含有塩基は、従来の塩基（A、G、C、T、U）、その類似体（例えば、5-メトキシウリジン、プソイドウリジン、またはN1-メチルプソイドウリジンなどの修飾ウリジンなど）；イノシン；プリン誘導体またはピリミジン誘導体（例えば、N4-メチルデオキシグアノシン、デアザプリンまたはアザプリン、デアザピリミジンまたはアザピリミジン、5位または6位に置換基を有するピリミジン塩基（例えば、5-メチルシトシン）、2位、6位、または8位に置換基を有するプリン塩基、2-アミノ-6-メチルアミノプリン、O6-メチルグアニン、4-チオ-ピリミジン、4-アミノ-ピリミジン、4-ジメチルヒドラジン-ピリミジン、およびO4-アルキル-ピリミジン；米国特許第5,378,825号および国際公開第93/13121号）であり得る。一般的な議論については、The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36、Adamsら（編）、第11版、1992年）を参照されたい。核酸は、当該重合体の各位置において、骨格が窒素含有塩基を含まない場合に、1または複数の「脱塩基」残基を含み得る（米国特許第5,585,481号）。核酸は、従来のRNA糖またはDNA糖、塩基、および結合のみを含むこともあるし、あるいは、従来の成分および置換の両方を含むこともある（例えば、2'メトキシ置換基を有する従来ヌク

10

20

30

40

50

レオシド、または従来ヌクレオシドおよび１もしくは複数のヌクレオシド類似体の両方を含有する重合体)。核酸は、RNAを模した糖コンフォメーションにロックされた１または複数のLNAヌクレオチド単量体と二環式フラノース単位とを含有する類似体である、「ロックド核酸」(LNA)を包含し、LNAは、相補的なRNA配列およびDNA配列に対するハイブリダイゼーション親和性を増強する(VesterおよびWengel、2004年、Biochemistry、43巻(42号):頁13233~41)。RNAとDNAは糖部分が異なり、RNAにおけるウラシルまたはその類似体の存在と、DNAにおけるチミンまたはその類似体の存在とによって異なり得る。

【0133】

「ガイドRNA」、「gRNA」、および単に「ガイド」は、本明細書で使用される場合、同義的に、crRNA(別名、CRISPR RNA)、またはcrRNAおよびtrRNAの組み合わせ(別名、tracrRNA)のいずれかを指す。crRNAおよびtrRNAは、単一のRNA分子として結合する場合もあるし(シングルガイドRNA、sgRNA)、あるいは、2つの別々のRNA分子として結合する場合もある(デュアルガイドRNA、dgRNA)。「ガイドRNA」または「gRNA」はそれぞれの種類を指す。trRNAは、天然起源の配列であってもよいし、あるいは、天然起源の配列と比較して修飾または改変を有するtrRNA配列であってもよい。

10

【0134】

本明細書で使用される場合、「ガイド配列」とは、標的配列に対して相補的であり、且つ、RNAガイド型DNA結合剤による結合または改変(例えば、切断)においてガイドRNAを標的配列に誘導する機能を果たす、ガイドRNA内の配列を指す。「ガイド配列」は「ターゲティング配列」または「スペーサー配列」と称される場合もある。化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)(すなわち、SpyCas9)および関連Cas9ホモログ/オルソログの場合などでは、ガイド配列は20塩基対の長さであり得る。より短い配列またはより長い配列もガイドとして使用でき、例えば、15、16、17、18、19、21、22、23、24、または25ヌクレオチド長などである。例えば、いくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号1~178から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、標的配列は、遺伝子内または染色体上などに存在し、ガイド配列に対して相補的である。いくつかの実施形態では、ガイド配列とその対応標的配列との間の相補性または同一性の程度は、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号1~178から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチドに対して約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列と標的領域は、100%相補的または同一であり得る。他の実施形態では、ガイド配列と標的領域は少なくとも1つのミスマッチを含んでいてもよい。例えば、標的配列の全長が少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、またはそれ以上の塩基対である場合、ガイド配列と標的配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、ガイド配列が少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、少なくとも20個、またはそれ以上のヌクレオチドを含む場合、ガイド配列と標的領域は、1~4個のミスマッチを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、ガイド配列が20個のヌクレオチドを含む場合、ガイド配列と標的領域は1、2、3、または4個のミスマッチを含んでいてもよい。

20

30

40

【0135】

RNAガイド型DNA結合剤に対する核酸基質は二本鎖核酸であるため、RNAガイド型DNA結合剤に対する標的配列は、ゲノムDNAのプラス鎖およびマイナス鎖(すなわち、所与の配列および当該配列の逆相補体(complement))の両方を含む。従っ

50

て、ガイド配列を「標的配列に対して相補的」という場合、当該ガイド配列は標的配列のセンス鎖またはアンチセンス鎖（例えば逆相補体）に結合するようにガイドRNAを誘導し得ることを理解されたい。よって、いくつかの実施形態では、ガイド配列が標的配列の逆相補体と結合する場合、当該ガイド配列のTがUに置換されている以外は、当該ガイド配列は当該標的配列のある特定のヌクレオチド群と同一である（例えば、当該標的配列はPAMを含まない）。

【0136】

本明細書で使用される場合、「RNAガイド型DNA結合剤」は、RNAおよびDNA結合能を有するポリペプチドもしくはポリペプチドの複合体、またはそのような複合体のDNA結合性サブユニットを意味し、このDNA結合能は配列特異的であり、当該RNAの配列に依存する。例示的なRNAガイド型DNA結合剤として、Casクリベース／ニッカーゼおよびこの不活性型（「dCas DNA結合剤」）が挙げられる。「Casヌクレアーゼ」は、本明細書で使用される場合、Casクリベース、Casニッカーゼ、およびdCas DNA結合剤を包含する。いくつかの実施形態では、CasクリベースまたはCasニッカーゼは、FokIドメインとの融合などを介してDNA切断を可能とするように改変されたdCas DNA結合剤を包含する。Casクリベース／ニッカーゼおよびdCas DNA結合剤としては、III型CRISPR系のCsm複合体またはCmr複合体、そのCas10サブユニット、そのCsm1サブユニット、またはそのCmr2サブユニット、I型CRISPR系のカスケード複合体、そのCas3サブユニット、およびクラス2 Casヌクレアーゼが挙げられる。本明細書で使用される場合、「クラス2 Casヌクレアーゼ」は、RNAガイド型DNA結合能を有する一本鎖ポリペプチドである。クラス2 Casヌクレアーゼとしては、RNAガイド型DNAクリベースまたはニッカーゼ活性をさらに有するクラス2 Casクリベース／ニッカーゼ（例えば、H840Aバリエーション、D10Aバリエーション、またはN863Aバリエーション）、および、クリベース／ニッカーゼ活性が不活性化されているクラス2 dCas DNA結合剤が挙げられる。クラス2 Casヌクレアーゼとしては、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9タンパク質（例えば、N497Aバリエーション、R661Aバリエーション、Q695Aバリエーション、Q926Aバリエーション）、HypaCas9タンパク質（例えば、N692Aバリエーション、M694Aバリエーション、Q695Aバリエーション、H698Aバリエーション）、eSPCas9（1.0）タンパク質（例えば、K810Aバリエーション、K1003Aバリエーション、R1060Aバリエーション）、およびeSPCas9（1.1）タンパク質（例えば、K848Aバリエーション、K1003Aバリエーション、R1060Aバリエーション）、並びに、これらの改変物が挙げられる。Cpf1タンパク質（Zetscheら、Cell、163巻：頁1～13（2015年））はCas9と相同であり、RuvC様ヌクレアーゼドメインを含有する。ZetscheのCpf1配列は参照によってその全体が援用されたものとする。例えば、Zetsche、表S1および表S3を参照されたい。例えば、Makarovら、Nat Rev Microbiol、13巻（11号）：頁722～36（2015年）；Shmakovら、Molecular Cell、60巻：頁385～397（2015年）を参照されたい。

【0137】

本明細書で使用される場合、「リボ核タンパク質」（RNP）または「RNP複合体」は、CasヌクレアーゼなどのRNAガイド型DNA結合剤、例えば、Casクリベース、Casニッカーゼ、またはdCas DNA結合剤（例えば、Cas9）と一緒に存在するガイドRNAを指す。いくつかの実施形態では、ガイドRNAがCas9などのRNAガイド型DNA結合剤を標的配列に誘導し、当該ガイドRNAが当該標的配列とハイブリダイズし、当該結合剤が当該標的配列に結合し；当該結合剤がクリベースまたはニッカーゼである場合、結合の後に切断またはニッキングが起こり得る。

【0138】

本明細書で使用される場合、第一配列の第二配列に対する配列比較において、第二配列全体のX%以上の位置が第一配列と一致していることが示された場合、第一配列は、第二配

10

20

30

40

50

列「に対して少なくともX%の同一性を有する配列を含む」と見なされる。例えば、配列AAGAは、配列AAGに対して100%の同一性を有する配列を含むが、これは、第二配列の3つ全ての位置に対する一致があるために、配列比較によって100%の同一性が得られるであろうためである。RNAとDNAとの違い（通常、ウリジンのチミジンとの交換、またはその逆）や修飾ウリジンなどのヌクレオシド類似体の存在は、該当するヌクレオチド（チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンなど）が同一の相補体を有する限り（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンの全ての場合でアデノシン；別の例としてシトシンおよび5-メチルシトシンがあり、これらは共にグアノシンまたは修飾グアノシンを相補体として有する）、ポリヌクレオチド間の同一性または相補性の差には寄与しない。よって、例えば、Xがプソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、または5-メトキシウリジンなどの任意の修飾ウリジンである5'-AXG配列は、両者が同じ配列（5'-CAU）に対して完全に相補的であることから、AUGに対して100%の同一性を有すると見なされる。例示的なアラインメントアルゴリズムとして、スミス-ウォーターマンアルゴリズムおよびニードルマン-ブンシュアルゴリズムがあり、これらは当該技術分野において周知である。アルゴリズムおよびパラメーター設定の何を選べば、所与の配列対のアラインメントに適切であるかは、当業者の理解するところであり；概して同様の長さであり、アミノ酸に関して50%超の同一性が予想される、またはヌクレオチドに関して75%超の同一性が予想される配列の場合、www.ebi.ac.ukウェブサーバーのEBIにより提供されているニードルマン-ブンシュアルゴリズムインターフェイスの初期設定を用いたニードルマン-ブンシュアルゴリズムが、通常は適切である。

10

20

【0139】

「mRNA」は、本明細書で使用される場合、ポリペプチドに翻訳可能な（すなわち、リボソームおよびアミノアシル化tRNAによる翻訳の基質として働くことが可能な）オープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを指す。mRNAは、リボース残基またはその類似体（例えば、2'-メトキシリボース残基）を含むリン酸-糖骨格を含み得る。いくつかの実施形態では、mRNAのリン酸-糖骨格の糖は、リボース残基、2'-メトキシリボース残基、またはこれらの組み合わせから本質的になる。

【0140】

本明細書に記載のガイドRNA組成物および方法において有用な例示的なガイド配列を、表1、表2、および表3、並びに本明細書全体に示す。

30

【0141】

本明細書で使用される場合、「インデル」とは、標的核酸内の二本鎖切断（DSB）部位における、いくつかのヌクレオチドの挿入または欠失からなる、挿入／欠失変異を指す。

【0142】

本明細書で使用される場合、「ノックダウン」とは、特定の遺伝子産物（例えば、タンパク質、mRNA、または両方）の発現の減少を指す。タンパク質のノックダウンは、目的の組織または細胞集団からの、当該タンパク質の総細胞内量（total cellular amount）を検出することにより、測定できる。mRNAのノックダウンを測定するための方法は公知であり、目的の組織または細胞集団から単離されたmRNAの配列決定を含む。フローサイトメトリー解析は、タンパク質発現のノックダウンを測定するための公知の方法である。いくつかの実施形態では、「ノックダウン」は、細胞集団による、特定の遺伝子産物の発現のいくつかの減少、例えば、転写mRNA量の減少または発現タンパク質量の減少、を指し得る。いくつかの実施形態では、「ノックダウン」は、細胞表面における、特定の遺伝子産物、例えば、TRAC遺伝子産物またはTRBC遺伝子産物、の発現のいくつかの減少を指し得る。

40

【0143】

本明細書で使用される場合、「ノックアウト」とは、細胞における特定のタンパク質の発現の減少を指す。ノックアウトは、細胞、組織、または細胞集団におけるタンパク質の総細胞内量（total cellular amount）を検出することにより、測定

50

できる。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、1または複数の細胞における（例えば、細胞集団における）、TRBC1、TRBC2、および／またはTRACを「ノックアウトする」。いくつかの実施形態では、ノックアウトは、細胞におけるT細胞受容体タンパク質成分（例えば、TRBC1、TRBC2、および／またはTRAC）の発現の完全な喪失であり、変異型T細胞受容体タンパク質の形成ではない。

【0144】

本明細書で使用される場合、「TRBC1」および「TRBC2」とは、T細胞受容体β鎖をコードする2つの相同遺伝子を指し、T細胞受容体β鎖はTRBC1遺伝子またはTRBC2遺伝子の遺伝子産物である。

【0145】

「TRBC」は、本明細書で使用される場合、TRBC1およびTRBC2を指す。

【0146】

ヒト野生型TRBC1配列は、NCBI Gene ID: 28639; Ensembl: ENSG00000211751で入手できる。T-cell receptor Beta Constant、V__segment Translation Product、BV05S1J2.2、TCRBC1、およびTCRBは、TRBC1遺伝子の別名である。

【0147】

ヒト野生型TRBC2配列は、NCBI Gene ID: 28638; Ensembl: ENSG00000211772で入手できる。T-cell receptor Beta Constant、V__segment Translation Product、およびTCRBC2は、TRBC2遺伝子の別名である。

【0148】

ヒト野生型TRAC配列は、NCBI Gene ID: 28755; Ensembl: ENSG00000277734で入手できる。T-cell receptor Alpha Constant、TCRA、IMD7、TRCA、およびTRAはTRAC遺伝子の別名である。

【0149】

ウィルムス腫瘍タンパク質（ウィルムス腫瘍抗原と称される場合もある）は、WT1遺伝子にコードされるタンパク質である。ヒト野生型WT1配列はNCBI Gene ID: 7490; Ensembl: ENSG00000184937で入手できる。GUD、AWT1、WAGR、WT33、NPHS4、およびWIT-2はWT1遺伝子の別名である。ウィルムス腫瘍タンパク質は、固形腫瘍（ウィルムス腫瘍を含むがこれに限定はされない）および血液がんを含む様々ながんにおいて発現され、また、腫瘍の血管内皮細胞および造血前駆細胞において発現されることも報告されている。

【0150】

本明細書で使用される場合、「標的配列」とは、gRNAのガイド配列に対して相補性を有する、標的遺伝子内の核酸配列を指す。標的配列とガイド配列との相互作用により、RNAガイド型DNA結合剤が誘導されて、標的配列内で結合し、ニッキングまたは切断（当該結合剤の活性に依存）を起こし得る。

【0151】

本明細書で使用される場合、「治療」とは、対象における疾患または障害に対する治療のあらゆる投与または適用を指し、当該疾患を抑制すること、その発生を阻止すること、当該疾患の1もしくは複数の症状を軽減すること、当該疾患を治癒させること、または当該疾患の1もしくは複数の症状の再発を予防すること、を包含する。

【0152】

用語「約」または「およそ」とは、当業者によって決定されるような、特定の値に関する許容可能な誤差を意味し、その値がどのように測定されたか、あるいは求められたかに部分的に依存する。

【0153】

10

20

30

40

50

II. 組成物

A. ガイドRNA (gRNA) を含む組成物

本明細書において、例えばガイドRNAとRNAガイド型DNA結合剤（例えば、CRISPR/Cas系）とを用いて、TRBC遺伝子および／またはTRAC遺伝子内で、DNA配列を改変する（例えば一本鎖切断（SSB）または二本鎖切断（DSB）を誘導する）のに有用な、組成物が提供される。いくつかの実施形態では、上記組成物は、TRAC配列および／またはTRBC配列を改変し、さらに、TCR遺伝子を挿入するのに有用である。

【0154】

いくつかの実施形態では、TRAC配列および／またはTRBC配列を改変し、さらにTCR遺伝子を挿入することによって、対照（例えばTRACおよび／またはTRBCが改変されていない対照）と比較して、TRACおよび／またはTRBCの誤対合が有利に低減される。例えば、TRBC配列を改変し（例えば、TRBCをロックアウトし）、さらにTCR遺伝子を挿入することによって、挿入TCRと天然TRBCとの間の誤対合が有利に低減され得る。あるいは、TRAC配列を改変し（例えば、TRACをロックアウトし）、さらにTCR遺伝子を挿入することによって、挿入TCRと天然TRACとの間の誤対合が有利に低減され得る。TRBC遺伝子を標的とするガイド配列を表1の配列番号1～89に示す。TRAC遺伝子を標的とするガイド配列を表2の配列番号90～178、185、および213～218に示す。

【0155】

いくつかの実施形態では、ヒト参照ゲノムhg38からのコーディネートに応じて、ガイド配列は下記の表に示される対応するゲノム領域に対して相補的である。さらなる実施形態のガイド配列は、表1、表2、および／または表3のいずれかに記載のゲノムコーディネートのすぐ傍の配列に対して相補的であり得る。例えば、さらなる実施形態のガイド配列は、表1、表2、および／または表3のいずれかに記載のゲノムコーディネートの15個の連続ヌクレオチド±10個のヌクレオチドを含む配列に対して相補的であり得る。

【0156】

表1および表2の配列番号1～89、90～178、185、および213～218に示される各ガイド配列は、追加のヌクレオチドを含むことで、crRNAを形成してもよく、例えば、3'末端において以下の例示的なヌクレオチド配列が当該ガイド配列の後に続く：GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG（配列番号400）（5'→3'方向）。sgRNAの場合、ガイド配列は、追加のヌクレオチドをさらに含むことで、sgRNAを形成してもよく、例えば、以下の例示的なヌクレオチド配列が当該ガイド配列の3'末端の後に続く：GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUAUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGCUUUU（配列番号401）（5'→3'方向）。ガイド配列は、追加のヌクレオチドをさらに含むことで、例えば、当該ガイド配列の3'末端の後に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を含む、sgRNAを形成してもよい：GUUUUAGAGCUAGAAAAUAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUAUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGC（配列番号402）（5'→3'方向）。

【0157】

10

20

30

40

【表 1】

表 1 : T R B C 標のガイド配列および対照ガイド配列、並びに染色体コーディネー
ト

配列番 号	ガイド配列	ゲノムコーディネート(hg38)
1	GGCUCUCGGAGAAUGACGAG	chr7:142791996-142792016
2	GGCCUCGGCGCUGACGAUCU	chr7:142792047-142792067
3	AUGACGAGUGGACCCAGGAU	chr7:142792008-142792028
4	AGAAGGUGGCCGAGACCCUC	chr7:142791931-142791951
5	UGAGGGUCUCGGCCACCUUC	chr7:142791930-142791950
6	AGAGAUCUCCACACCCAAA	chr7:142791748-142791768
7	UGGCUCAAACACAGCGACCU	chr7:142791720-142791740
8	GGCGCUGACGAUCUGGGUGA	chr7:142792041-142792061
9	UGGCAGACAGGACCCCUUGC	chr7:142802114-142802134
10	UGACGAGUGGACCCAGGAUA	chr7:142792009-142792029
11†	AGACAGGACCCCUUGCUGGU	chr7:142792697-142792717
12	UUGACAGCGGAAGUGGUUGC	chr7:142791963-142791983
13	CGUAGAACUGGACUUGACAG	chr7:142791976-142791996
14	CGCUGUCAAGUCCAGUUCUA	chr7:142791974-142791994
15	ACUGGACUUGACAGCGGAAG	chr7:142791970-142791990
16	GUUGCGGGGUUCUGCCAGA	chr7:142791948-142791968
17	CUGCCUGAGCAGCCGCCUGA	chr7:142791913-142791933
18	GACAGCGGAAGUGGUUGCGG	chr7:142791961-142791981
19	CCACUACCCUGCUCUACCCC	chr7:142792068-142792088
20	GCUGUCAAGUCCAGUUCUAC	chr7:142791975-142791995
21	ACACUGGUGUGCCUGGCCAC	chr7:142791773-142791793
22	AGACCCUCAGGCGGCUGCUC	chr7:142791919-142791939
23	AUGGGAAGGAGGUGCACAGU	chr7:142791834-142791854
24	AGGGCGGGCUGCUCCUUGAG	chr7:142791878-142791898
25	UCCCUAGCAAGAUCAUAG	chr7:142802141-142802161
26†	GGUGCACAGUGGGGUCAGCA	chr7:142791844-142791864
27	CCAGCUCAGCUCCACGUGGU	chr7:142801154-142801174
28	CCGCAACCACUCCGCUGUC	chr7:142791961-142791981

10

20

30

40

50

29	GUCCACUCGUCAUUCUCCGA	chr7:142792001-142792021
30	GCCCGUAGAACUGGACUUGA	chr7:142791979-142791999
31	UCACCCAGAUCGUCAGCGCC	chr7:142792041-142792061
32	GGGUCCACUCGUCAUUCUCC	chr7:142792003-142792023
33	UCCAGUUCUACGGGCUCUCG	chr7:142791984-142792004
34	CGGAGAAUGACGAGUGGACC	chr7:142792002-142792022
35	ACCACUCCGCGUGCAAGUC	chr7:142791966-142791986
36	AAUGACGAGUGGACCCAGGA	chr7:142792007-142792027
37	ACGGGCUCUCGGAGAAUGAC	chr7:142791993-142792013
38	GACUCCAGAUACUGCCUGAG	chr7:142791902-142791922
39	CGCUGUGUUUGAGCCAUCAG	chr7:142791724-142791744
40	AGAACUGGACUUGACAGCGG	chr7:142791973-142791993
41	GAGACCCUCAGGCGGCUGCU	chr7:142791920-142791940
42	CGUCAUUCUCCGAGAGCCCG	chr7:142791994-142792014
43	CAGCCCGCCCUCAAUGACUC	chr7:142791887-142791907
44	GGCUGCUCAGGCAGUAUCUG	chr7:142791907-142791927
45	AGUGGUUGCGGGGUUCUGC	chr7:142791952-142791972
46	GGUCGCUGUGUUUGAGCCAU	chr7:142791721-142791741
47	GAUCUCAUAGAGGAUGGUGG	chr7:142792718-142792738
48	UGUUUGAGCCAUCAGAAGCA	chr7:142791729-142791749
49	UACUGCCUGAGCAGCCGCCU	chr7:142791911-142791931
50	ACCCGCAGCCCCUCAAGGAG	chr7:142791867-142791887
51	AGGCAGUAUCUGGAGUCAUU	chr7:142791899-142791919
52	UGUGUUUGAGCCAUCAGAAG	chr7:142791727-142791747
53	GGUUGCGGGGUUCUGCCAG	chr7:142791949-142791969
54	GGGUCUCGGCCACCUUCUGG	chr7:142791933-142791953
55	CAGAAGGUGGCCGAGACCCU	chr7:142791932-142791952
56	CGCCGAGGCCUGGGGUAGAG	chr7:142792057-142792077
57	GGUUCUGCCAGAAGGUGGCC	chr7:142791940-142791960
58	CAGAGAUCUCCACACCCAA	chr7:142791747-142791767
59	UUGAGGGCGGGCUGCUCCUU	chr7:142791881-142791901
60	AAGCCUGUGGCCAGGCACAC	chr7:142791779-142791799
61	CAGCGCCGAGGCCUGGGGUA	chr7:142792054-142792074

10

20

30

40

50

62	CCCACUCACCGUCUCUACCC	chr7:142792069-142792089
63	UGUCUGCCACCAUCCUCUAU	chr7:142792712-142792732
64	UGCUUCUGAUGGCUCAAACA	chr7:142791729-142791749
65	UUCCCAUUCACCCACCAGCU	chr7:142791821-142791841
66	GUCAGCGCCGAGGCCUGGGG	chr7:142792052-142792072
67	CCCUCAGGCGGCUGCUCAGG	chr7:142791916-142791936
68	AAUGACUCCAGAUACUGCCU	chr7:142791899-142791919
69	CACACUGGUGUGCCUGGCCA	chr7:142791772-142791792
70	UCAUAGAGGAUGGUGGCAGA	chr7:142792714-142792734
71	CACCCAGAUCGUCAGCGCCG	chr7:142792042-142792062
72	UGACAGCGGAAGUGGUUGCG	chr7:142791962-142791982
73	UCUCCGAGAGCCCGUAGAAC	chr7:142791988-142792008
74	AGUCCAGUUCUACGGGCUCU	chr7:142791982-142792002
75	AUCGUCAGCGCCGAGGCCUG	chr7:142792049-142792069
76	AAGGAGGUGCACAGUGGGGU	chr7:142791839-142791859
77	UAUCUGGAGUCAUUGAGGGC	chr7:142791893-142791913
78	GCGGGGGUUCUGCCAGAAGG	chr7:142791945-142791965
79	CUUGACAGCGGAAGUGGUUG	chr7:142791964-142791984
80	GUGUGGCCUUUUGGGUGUGG	chr7:142791757-142791777
81	GAUCGUCAGCGCCGAGGCCU	chr7:142792048-142792068
82	UGUGGCCAGGCACACCAGUG	chr7:142791774-142791794
83	AGGCCUCGGCGCUGACGAUC	chr7:142792048-142792068
84	GUGAAUGGGAAGGAGGUGCA	chr7:142791830-142791850
85	GCGGCUGCUCAGGCAGUAUC	chr7:142791909-142791929
86	ACUGCCUGAGCAGCCGCCUG	chr7:142791912-142791932
87	AAAGGCCACACUGGUGUGCC	chr7:142791766-142791786
88	UGAGGGCGGGCUGCUCUUG	chr7:142791880-142791900
89	GAGCAGCCGCCUGAGGGUCU	chr7:142791919-142791939

これらの各ガイド配列は、通常、T R B C 1 遺伝子およびT R B C 2 遺伝子の両方を標的とするが、以下のような標識が付けられた例外がある：

† 配列番号 1 1 および配列番号 2 6 はT R B C 1 を特異的に標的とする。

【 0 1 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2 : T R A C 標的ガイド配列および対照ガイド配列、並びに染色体コーディネート

配列番号	ガイド配列	ゲノムコーディネート(hg38)
90	CUCUCAGCUGGUACACGGCA	chr14:22547524-22547544
91	UUCGGAACCCAAUCACUGAC	chr14:22550581-22550601
92	UAAACCCGGCCACUUCAGG	chr14:22550608-22550628
93	GAUUAACCCGGCCACUUC	chr14:22550611-22550631
94	CGUCAUGAGCAGAUUAAACC	chr14:22550622-22550642
95	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	chr14:22547529-22547549
96	ACACGGCAGGGUCAGGGUUC	chr14:22547512-22547532
97	UCUCUCAGCUGGUACACGGC	chr14:22547525-22547545
98	UGGAUUUAGAGUCUCUCAGC	chr14:22547536-22547556
99	GAGAAUAAAAUCGGUGAAU	chr14:22547575-22547595
100	ACAAAACUGUGCUAGACAUG	chr14:22547640-22547660
101	UGUGCUAGACAUGAGGUUA	chr14:22547647-22547667
102	GCACCAAAGCUGCCCUUACC	chr14:22547777-22547797
103	AAGUUCUGUGAUGUCAAGC	chr14:22549638-22549658
104	CUCGACCAGCUUGACAUCAC	chr14:22549646-22549666
105	AUCCUCCUCCUGAAAGUGGC	chr14:22550600-22550620
106	ACCCGGCCACUUCAGGAGG	chr14:22550605-22550625
107	UUAUUCUGCUAUGACGCUG	chr14:22550625-22550645
108	ACACGGAUGAACAUAAGGC	chr14:22539116-22539136
109	ACUUACACGGAUGAACAUA	chr14:22539120-22539140
110	GCUGGUACACGGCAGGGUCA	chr14:22547518-22547538
111	GGAAGCUACAUACCUACAUU	chr14:22539082-22539102
112	UCCUCACUGUGUGCAUCAGG	chr14:22539061-22539081
113	CUGGUUCCUCUCCAAAUGU	chr14:22539097-22539117
114	AAAGUCAGAUUUGUUGCUCC	chr14:22547697-22547717
115	UUCAAAACCUGUCAGUGAUU	chr14:22550571-22550591
116	UGCUC AUGACGCUGCGGCUG	chr14:22550631-22550651
117	UCAAGGCCCCUCACCUCAGC	chr14:22550658-22550678
118	GGCGUUUGCACAUGCAAAGU	chr14:22547712-22547732

10

20

30

40

50

119	GACCACAGCCGACGCUCAU	chr14:22550636-22550656
120	AUGACGCUGCGGCUUGGUC	chr14:22550636-22550656
121	AUUCGGAACCCAAUCACUGA	chr14:22550582-22550602
122	AACCCGGCCACUUUCAGGAG	chr14:22550606-22550626
123	UUAACCCGGCCACUUUCAG	chr14:22550609-22550629
124	AGAUUUGUUGCUCCAGGCCA	chr14:22547691-22547711
125	UGAGAAUCAAAAUCGGUGAA	chr14:22547576-22547596
126	GAUGUCAAGCUGGUCGAGAA	chr14:22549648-22549668
127	GUUUCAAAGCUUUUCUCGAC	chr14:22549660-22549680
128	UGAAGGCGUUUGCACAUGCA	chr14:22547716-22547736
129	ACCCUGACCCUGCCGUGUAC	chr14:22547514-22547534
130	AGCUUCAAGGCCCUACCU	chr14:22550662-22550682
131	GUUCCGAAUCCUCCUCCUGA	chr14:22550593-22550613
132	AGAUUAAAACCCGGCCACUUU	chr14:22550612-22550632
133	CCUGCCGUGUACCAGCUGA	chr14:22547521-22547541
134	UCACUGGAUUUAGAGUCUCU	chr14:22547540-22547560
135	UACUUACACGGAUGAACAAU	chr14:22539121-22539141
136	UAUCACAGACAAAACUGUGC	chr14:22547632-22547652
137	CCACAGCACUGUUGCUCUUG	chr14:22547674-22547694
138	CCUGUGAUGUCAAGCUGGUC	chr14:22549643-22549663
139	ACAUGAGGUCUAUGGACUUC	chr14:22547655-22547675
140	ACUGUUGCUCUUGAAGUCCA	chr14:22547667-22547687
141	AGCUACAUACCUACAUUUGG	chr14:22539085-22539105
142	UAGAAAGUUCUGUGAUGUC	chr14:22549634-22549654
143	UCACUGUGUGCAUCAGGAGG	chr14:22539064-22539084
144	GACAAAACUGUGCUAGACAU	chr14:22547639-22547659
145	CUUCAACAACAGCAUUAUUC	chr14:22547731-22547751
146	CAACAACAGCAUUAUUCAG	chr14:22547734-22547754
147	UCUCAACAAAUUGUGACACA	chr14:22547591-22547611
148	AUGAGGUCUAUGGACUCAA	chr14:22547657-22547677
149	GACCCUGCCGUGUACCAGCU	chr14:22547519-22547539
150	CCCCUGUCUUACCUGUUUCA	chr14:22549674-22549694
151	AGCAACAGUGCUGUGGCCUG	chr14:22547678-22547698

10

20

30

40

50

152	CUACAUACCUACAUUUGGAA	chr14:22539087-22539107
153	ACUUUGUGACACAUUUGUUU	chr14:22547595-22547615
154	AUCACAGACAAAACUGUGCU	chr14:22547633-22547653
155	UUCAACAACAGCAUUAUUC	chr14:22547732-22547752
156	CAUGAGGUCUAUGGACUUA	chr14:22547656-22547676
157	GCUACAUACCUACAUUUGGA	chr14:22539086-22539106
158	CUCUUGUCCACAGAUUCC	chr14:22547491-22547511
159	GAUUCUGAUGUGUAUAUCAC	chr14:22547618-22547638
160	CUGUGAUGUCAAGCUGGUCG	chr14:22549644-22549664
161	CCUGCCGUGUACCAGCUGAG	chr14:22547522-22547542
162	ACAUACCUACAUUUGGAAGA	chr14:22539089-22539109
163	CCUCACUGUGUGCAUCAGGA	chr14:22539062-22539082
164	ACAAAUGUGUCACAAAGUAA	chr14:22547597-22547617
165	GAGCAACAGUGCUGUGGCCU	chr14:22547677-22547697
166	UCGACCAGCUUGACAUCACA	chr14:22549645-22549665
167	AUUAACCCGGCCACUUUCA	chr14:22550610-22550630
168	CACGGCAGGGUCAGGGUUCU	chr14:22547511-22547531
169	AAACCCGGCCACUUUCAGGA	chr14:22550607-22550627
170	CAAGGCCCCUCACCUCAGCU	chr14:22550657-22550677
171	CCCGGCCACUUUCAGGAGGA	chr14:22550604-22550624
172	CAUUUCUAUAAUACUACAC	chr14:22539132-22539152
173	ACAGCCGCAGCGUCAUGAGC	chr14:22550632-22550652
174	AUCAAAUUCGGUGAAUAGGC	chr14:22547571-22547591
175	GCGUUUGCACAUGCAAAGUC	chr14:22547711-22547731
176	CUGUUGCUCUUGAAGUCCAU	chr14:22547666-22547686
177	AAAUCGGUGAAUAGGCAGAC	chr14:22547567-22547587
178	UUGUCUGUGAUAUACACAUC	chr14:22547624-22547644
185	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGU	chr14:22547501-22547521
213	AGCUGGUACACGGCAGGGUC	chr14:22547519-22547539
214	UAGGCAGACAGACUUGUCAC	chr14:22547556-22547576
215	UCUGUGGGACAAGAGGAUCA	chr14:22547486-22547506
216	AUCUGUGGGACAAGAGGAUC	chr14:22547487-22547507
217	CUGGAUAUCUGUGGGACAAG	chr14:22547493-22547513

10

20

30

218	GUCAGGGUUCUGGAUAUCUG	chr14:22547502-22547522
-----	----------------------	-------------------------

40

【 0 1 5 9 】

50

【表 3】

表 3 : s g R N A 配列、命名法、および構成成分の部分配列

配列番号	sgRNA配列	ゲノムコーディネート (hg38)
179	GGCUCUCGGAGAAUGACGAGGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791996- 142792016
180	GGCCUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142792047- 142792067
181	AUGACGAGUGGACCCAGGAUGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142792008- 142792028
182	AGAAGGUGGCCGAGACCCUCGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791931- 142791951
183	UGAGGGUCUCGGCCACCUUCGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791930- 142791950
184	AGAGAUCUCCACACCCAAAGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr7:142791748- 142791768
186	CUCUCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547529- 22547549

10

20

30

40

50

187	UUCGGAACCCAAUCACUGACGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22550611- 22550631
188	UAAACCCGGCCACUUUCAGGGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547501- 22547521
189	GAUUAACCCGGCCACUUUCGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22550608- 22550628
190	CGUCAUGAGCAGAUUAAACCGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547529- 22547549
191	AGAGUCUCUCAGCUGGUACAGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547524- 22547544
192	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGUGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22550622- 22550642
193	mG*mA*mG*UCCGAGCAGAAGAAGAAGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	chr2:72933852- 72933872
194	mG*mA*mC*CCCCUCCACCCGCCUCGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUm	chr6:43770821- 43770841

10

20

30

40

50

	GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	
195	AACAGCAUAGCAAGUUAUAAUAAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCUUUUUUU	chr14:22550581- 22550601
196	GGCUCUCGGAGAAUGACGAGGUUUUAGA GCUAGAAAUAAGCAAGUUAUAAUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUUU	chr7:142791996- 142792016
197	GGCCUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGA GCUAGAAAUAAGCAAGUUAUAAUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUUU	chr7:142792047- 142792067
198	AUGACGAGUGGACCCAGGAUGUUUUAGA GCUAGAAAUAAGCAAGUUAUAAUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUUU	chr7:142792008- 142792028
199	UGAGGGUCUCGGCCACCUUCGUUUUAGA GCUAGAAAUAAGCAAGUUAUAAUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUUU	chr7:142791930- 142791950
200	AGAGAUCUCCACACCCAAAGUUUUAGA GCUAGAAAUAAGCAAGUUAUAAUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUUU	chr7:142791748- 142791768
201	mA*mC*mA*CGGCAGGGUCAGGGUUCGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAUAAUAAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547512- 22547532
202	mA*mG*mC*UGGUACACGGCAGGGUCGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG	chr14:22547519- 22547539

10

20

30

40

50

	mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	
203	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547524- 22547544
204	mU*mC*mU*CUCAGCUGGUACACGGCGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547525- 22547545
205	mU*mG*mG*AUUUAGAGUCUCUCAGCGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547536- 22547556
206	mU*mA*mG*GCAGACAGACUUGUCACGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547556- 22547576
207	mU*mC*mU*GUGGGACAAGAGGAUCAGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547486- 22547506

10

20

30

40

50

208	mA*mU*mC*UGUGGGACAAGAGGAUCGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547487- 22547507
209	mC*mU*mG*GAUAUCUGUGGGACAAGGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547493- 22547513
210	mG*mU*mC*AGGGUUCUGGAUAUCUGGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547502- 22547522
211	mU*mC*mA*GGGUUCUGGAUAUCUGUGUU UUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	chr14:22547501- 22547521
212	UAGGCAGACAGACUUGUCACGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUUUU	chr14:22547556- 22547576

* = P S 結合 ; m = 2' - O - M e ヌクレオチド ; N = 任意の天然または非天然ヌクレオチド

10

20

30

40

50

【 0 1 6 0 】

いくつかの実施形態では、本発明は、ヌクレアーゼ（例えば、Cas9などのCasヌクレアーゼ）とすることができる、RNAガイド型DNA結合剤を、TRBC1、TRBC2、および／またはTRAC内の標的DNA配列に誘導するガイド配列を含む1または複数のガイドRNA（gRNA）を含む組成物を提供する。gRNAは表1または表2に示されるガイド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、gRNAは以下の配列を含み：(N)_xGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAACCGAGUCGGUGC（配列番号403）、ここで、「N」は任意の天然または非天然ヌクレオチドとしてよく

、N全体で、本明細書に記載されるようなTRBCガイド配列またはTRACガイド配列を構成する。gRNAは表1～3に示されるガイド配列を含むcrRNAを含み得る。gRNAは、表1および表2に示されるガイド配列の17個、18個、19個、または20個の連続ヌクレオチドを含むcrRNAを含み得る。いくつかの実施形態では、gRNAは、表1および表2に示されるガイド配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチドに対して約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%の同一性を有する配列を含むcrRNAを含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、表1および表2に示されるガイド配列に対して約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または約100%の同一性を有する配列を含むcrRNAを含む。gRNAはtrRNAをさらに含んでもよい。本明細書に記載の各実施形態において、crRNAおよびtrRNAは、単一のRNAとして結合する場合もあるし(sgRNA)、あるいは、別々のRNA上に存在する場合もある(dgRNA)。sgRNAの場合、crRNA成分およびtrRNA成分は、例えばホスホジエステル結合または他の共有結合を介して、共有結合的に連結されていてもよい。

10

【0161】

本明細書に記載のそれぞれの実施形態では、「デュアルガイドRNA」または「dgRNA」として、ガイドRNAは2つのRNA分子を含んでもよい。dgRNAは、例えば表1および表2に示されるガイド配列を含むcrRNAを含む第一RNA分子と、trRNAを含む第二RNA分子と、を含む。第一RNA分子と第二RNA分子は共有結合的に連結されていなくてもよいが、crRNAの一部とtrRNAの一部との間の塩基対形成を介してRNA二本鎖を形成していてもよい。

20

【0162】

本明細書に記載のそれぞれの実施形態では、ガイドRNAは、「シングルガイドRNA」または「sgRNA」として、1つのRNA分子を含んでもよい。sgRNAは、trRNAに共有結合的に連結された、表1および表2に示されるガイド配列を含むcrRNA（またはその一部）を含んでもよい。sgRNAは、表1および表2に示されるガイド配列の17個、18個、19個、または20個の連続ヌクレオチドを含んでもよい。いくつかの実施形態では、crRNAとtrRNAとは、リンカーを介して共有結合的に連結されている。いくつかの実施形態では、sgRNAは、crRNAの一部とtrRNAの一部との間の塩基対形成を介してステムループ構造を形成している。いくつかの実施形態では、crRNAとtrRNAとは、ホスホジエステル結合ではない1または複数の結合を介して共有結合的に連結されている。

30

【0163】

いくつかの実施形態では、trRNAは、天然起源CRISPR/Cas系由来のtrRNA配列の全てまたは一部を含んでもよい。いくつかの実施形態では、trRNAは、切断または修飾された野生型trRNAを含む。trRNAの長さは使用されたCRISPR/Cas系に依存する。いくつかの実施形態では、trRNAは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100超のヌクレオチドを含む、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、trRNAは、例えば1もしくは複数のヘアピン構造もしくはステムループ構造、または1もしくは複数のバルジ構造などの、ある特定の二次構造を含んでもよい。

40

【0164】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号1～89および配列番号90～178のいずれか1つのガイド配列を含む1または複数のガイドRNAを含む組成物を提供する。

【0165】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号179～184のいずれか1つを含む1または複数のsgRNAを含む組成物を提供する。

50

【0166】

1つの態様では、本発明は、配列番号1～89、90～178、185、および213～218の核酸のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列を含むgRNAを含む組成物を提供する。

【0167】

他の実施形態では、上記組成物は、配列番号1～89、90～178、185、および213～218のガイド配列のうちのいずれか2つ以上から選択されるガイド配列を含む少なくとも1つ（例えば少なくとも2つ）のgRNAを含む。いくつかの実施形態では、上記組成物は、配列番号1～89、90～178、185、および213～218の核酸のいずれかに対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列をそれぞれ含む少なくとも2つのgRNAを含む。

【0168】

本発明のガイドRNA組成物は、TRBC1遺伝子、TRBC2遺伝子、および／またはTRAC遺伝子内の標的配列を認識する（例えば、それにハイブリダイズ）するように設計される。例えば、TRBC1標的配列、TRBC2標的配列、および／またはTRAC標的配列は、提供された、ガイドRNAを含むCasクリベースによって認識および切断され得る。いくつかの実施形態では、CasクリベースなどのRNAガイド型DNA結合剤が、ガイドRNAによって、TRBC1遺伝子、TRBC2遺伝子、および／またはTRAC遺伝子の標的配列に誘導され得るが、この場合、上記ガイドRNAのガイド配列が上記標的配列とハイブリダイズし、上記のCasクリベースなどのRNAガイド型DNA結合剤が上記標的配列を切断する。

【0169】

いくつかの実施形態では、1または複数のガイドRNAの選択は、TRBC1遺伝子、TRBC2遺伝子、および／またはTRAC遺伝子内の標的配列に基づいて決定される。

【0170】

いかなる特定の理論にも束縛されるものではないが、遺伝子のある特定の領域における変異（例えば、ヌクレアーゼを介したDSBの結果として生じるインデルを原因とするフレームシフト変異）が、遺伝子の他の領域における変異よりも許容性が低い場合があるが、このため、DSBの位置は、引き起こされ得るタンパク質ロックダウンの量または種類において重要な要素である。いくつかの実施形態では、TRBC1、TRBC2、および／またはTRAC内の標的配列に対し相補的である、または相補性を有するgRNAを用いて、適切なTRBC1、TRBC2、および／またはTRAC遺伝子の特定の部位にRNAガイド型DNA結合剤が誘導される。いくつかの実施形態では、gRNAが、TRBC1および／もしくはTRBC2の第1エクソン、第2エクソン、第3エクソン、もしくは第4エクソンにおける標的配列、並びに／または、TRACの第1エクソン、第2エクソン、第3エクソン、もしくは第4エクソンにおける標的配列、に対して相補的である、または相補性を有する、ガイド配列を有するように設計される。

【0171】

いくつかの実施形態では、上記ガイド配列は、ヒトTRBC1遺伝子、ヒトTRBC2遺伝子、および／またはヒトTRAC遺伝子に存在する標的配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、標的配列は、ガイドRNAのガイド配列に対して相補的であってもよい。いくつかの実施形態では、ガイドRNAのガイド配列とその対応標的配列との間の相補性または同一性の程度は、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも9

7 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %、または少なくとも100 %であり得る。いくつかの実施形態では、標的配列とgRNAのガイド配列とは、100 %相補的または同一であってもよい。他の実施形態では、標的配列とgRNAのガイド配列とは、少なくとも1つのミスマッチを含んでいてもよい。例えば、ガイド配列の全長が20である場合、標的配列とgRNAのガイド配列とは、1、2、3、または4つのミスマッチを含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、標的配列とgRNAのガイド配列とは、ガイド配列が20ヌクレオチドである場合、1～4つのミスマッチを含んでいてもよい。

【0172】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される組成物または製剤は、本明細書に記載のCasヌクレアーゼなどのRNAガイド型DNA結合剤をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を含むmRNAを含む。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼなどのRNAガイド型DNA結合剤をコードするORFを含むmRNAが提供され、使用され、投与される。

10

【0173】

B. 修飾されたgRNAおよびmRNA

いくつかの実施形態では、gRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態では、gRNAは、1または複数の修飾ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオチドを含み、「修飾」gRNAまたは「化学修飾」gRNAと称されて、標準のA、G、C、およびU残基の代わりに、またはそれらに加えて使用されている、1または複数の非天然起源および／または天然起源の構成成分または立体配置の存在を述べていることがある。いくつかの実施形態では、修飾gRNAが非標準のヌクレオシドまたはヌクレオチドを用いて合成され、本明細書では「修飾」と称される。修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは以下のうちの1または複数を含み得る：(i) ホスホジエステル骨格結合における、結合を起こしていないリン酸の一方もしくは両方、および／または、結合を起こしているリン酸の1もしくは複数の変化、例えば置換(例示的な骨格修飾)；(ii) リボース糖の構成要素、例えばリボース糖上の2'ヒドロキシルの変化、例えば置換(例示的な糖修飾)；(iii) リン酸部分の「デホスホ」リンカーとの大規模な置換(例示的な骨格修飾)；(iv) 非標準の核酸塩基とのものを含む、天然起源の核酸塩基の修飾または置換(例示的な塩基修飾)；(v) リボース-リン酸骨格の置換または修飾(例示的な骨格修飾)；(vi) オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾、もしくは置換、または部分、キャップ、もしくはリンカーの接続(このような3'または5'キャップ修飾は糖修飾および／または骨格修飾を含み得る)；並びに、(vii) 糖の修飾または置換(例示的な糖修飾)。

20

30

【0174】

上記で挙げたものなどの化学修飾は、組み合わせることで、2、3、4、またはそれ以上の修飾を有し得るヌクレオシドおよびヌクレオチド(まとめて「残基」)を含む、修飾されたgRNAおよび／またはmRNAを得ることができる。例えば、修飾残基は修飾糖および修飾核酸塩基を有し得る。いくつかの実施形態では、gRNAの全ての塩基が修飾されており、例えば、全ての塩基がホスホロチオエート基などの修飾リン酸基を有する。ある特定の実施形態では、gRNA分子のリン酸基の全て、または実質的に全てが、ホスホロチオエート基と置換されている。いくつかの実施形態では、修飾gRNAは、RNAの5'末端またはその付近に少なくとも1つの修飾残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾gRNAは、RNAの3'末端またはその付近に少なくとも1つの修飾残基を含む。

40

【0175】

いくつかの実施形態では、gRNAは、1、2、3、またはそれ以上の修飾残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾gRNAにおける位置の少なくとも5 % (例えば、少なくとも5 %、少なくとも10 %、少なくとも15 %、少なくとも20 %、少なくとも25 %、少なくとも30 %、少なくとも35 %、少なくとも40 %、少なくとも45 %、少なくとも50 %、少なくとも55 %、少なくとも60 %、少なくとも65 %、少なくとも70 %、少なくとも75 %、少なくとも80 %、少なくとも85 %、少なくとも90 %、少な

50

くとも95%、または100%)が、修飾ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオチドである。

【0176】

未修飾の核酸は、例えば、細胞内のヌクレアーゼまたは血清中に存在するヌクレアーゼによる分解を受けやすい可能性がある。例えば、ヌクレアーゼが核酸のホスホジエステル結合を加水分解する可能性がある。これを受けて、1つの態様では、本明細書に記載のgRNAは、細胞内ヌクレアーゼまたは血清ベースのヌクレアーゼに対しての安定性を導入するなどのために、1または複数の修飾ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオチドを含有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の修飾gRNA分子は、インビボおよびエキソビボの両方で、細胞集団に導入された場合に、自然免疫反応の低減を示し得る。用語「自然免疫反応」は、一本鎖核酸を含む外来性核酸に対する細胞応答を包含し、この細胞応答はサイトカインの発現および放出（特にインターフェロン）、並びに細胞死の誘導を含む。

10

【0177】

骨格修飾のいくつかの実施形態では、修飾残基のリン酸基は、その酸素の1または複数の異なる置換基と置換することにより、修飾できる。さらに、修飾残基（例えば、修飾核酸に存在する修飾残基）は、未修飾リン酸部分の、本明細書に記載されるような修飾リン酸基との大規模な置換を含み得る。いくつかの実施形態では、リン酸骨格の骨格修飾は、非荷電リンカーまたは非対称の電荷分布を有する荷電リンカーをもたらし変化を含み得る。

【0178】

修飾リン酸基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロセネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、ハイドロゲンホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリアルホスホネート、およびホスホトリエステルが挙げられる。非修飾リン酸基内のリン(phosphorous)原子はアキラル性である。しかし、非架橋酸素の1つの、上記の原子または原子群の1つとの置換により、その亜リン酸(phosphorous)原子がキラル性になり得る。不斉リン(phosphorous)原子は、「R」立体配置（本明細書ではRp）または「S」立体配置（本明細書ではSp）を有し得る。骨格は、架橋している酸素（すなわち、そのリン酸をそのヌクレオシドに連結している酸素）の、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）との置換によっても修飾できる。この置換は、連結を行っているどちらかの酸素で生じることでもできるし、あるいは、連結を行っている両方の酸素で生じることでもできる。

20

30

【0179】

リン酸基は、ある特定の骨格修飾においては、非リン含有連結体に置換され得る。いくつかの実施形態では、荷電リン酸基は中性部分に置換され得る。リン酸基を置換できる部分の例としては、例えば、メチルホスホン酸、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、炭酸、カルボキシメチル、カルバミン酸、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホン酸、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノを挙げることができるが、これらに限定はされない。

【0180】

リン酸リンカーとリボース糖がヌクレアーゼ抵抗性の代替ヌクレオシドまたは代替ヌクレオチドで置換された、核酸を模倣できる足場を構築することでもできる。このような修飾は骨格修飾および糖修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、代替骨格に核酸塩基が繋がれ得る。例として、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸(PNA)といった代替ヌクレオシドを挙げることができるが、これらに限定はされない。

40

【0181】

修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、糖基に1または複数の修飾を含むことができる（すなわち、糖修飾）。例えば、2'ヒドロキシル基(OH)は、修飾することができる、例えば、いくつかの異なる「オキシ」置換基または「デオキシ」置換基で置換することができる。いくつかの実施形態では、2'ヒドロキシル基に対する修飾は、ヒドロキシ

50

ルが脱プロトン化により 2'-アルコキシドイオンを形成することができなくなるため、核酸の安定性を増強することができる。

【0182】

2'-ヒドロキシル基修飾の例としては、アルコキシまたはアリールオキシ（OR、式中「R」は、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖とすることができる）；ポリエチレングリコール（PEG）、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ （式中、Rは、例えば、Hまたは所望により置換されたアルキルとすることができる、nは0～20（例えば、0～4、0～8、0～10、0～16、1～4、1～8、1～10、1～16、1～20、2～4、2～8、2～10、2～16、2～20、4～8、4～10、4～16、および4～20）の整数とすることができる）を挙げることができる。いくつかの実施形態では、2'-ヒドロキシル基修飾は、2'-O-Meとすることができる。いくつかの実施形態では、2'-ヒドロキシル基修飾は、2'-ヒドロキシル基をフッ化物と置き換えた、2'-フルオロ修飾とすることができる。いくつかの実施形態では、2'-ヒドロキシル基修飾は、「ロックド」核酸（LNA）を含むことができ、2'-ヒドロキシルを、 C_{1-6} アルキレン架橋または C_{1-6} ヘテロアルキレン架橋などによって、同じリボース糖の4'炭素に連結することができ、例示的な架橋としては、メチレン架橋、プロピレン架橋、エーテル架橋、またはアミノ架橋を挙げることができる；また、2'-ヒドロキシル基修飾は、O-アミノ（アミノは、例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、複素環基（heterocyclic）、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノとすることができる）、および、アミノアルコキシ、 $O(CH_2)_n$ -アミノ（アミノは、例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、複素環基、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノとすることができる）を含むことができる。いくつかの実施形態では、2'-ヒドロキシル基修飾は、リボース環が $C2'-C3'$ 結合を欠いている、「アンロックド」核酸（UNA）を含むことができる。いくつかの実施形態では、2'-ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基（MOE）（ $OCH_2CH_2OCH_3$ 、例えば、PEG誘導体）を含むことができる。

【0183】

「デオキシ」2'修飾は、水素（すなわち、dsRNAのオーバーハング部分などにおけるデオキシリボース糖類）；ハロ（例えば、ブロモ、クロロ、フルオロ、またはヨード）；アミノ（アミノは、例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、複素環基、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸とすることができる）； $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -アミノ（アミノは、例えば、本明細書に記載の通りとすることができる）、 $-NHC(O)R$ （Rは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖とすることができる）、シアノ；メルカプト；アルキルチオールアルキル；チオアルコキシ；並びに、本明細書に記載されているようなアミノなどで所望により置換されていてもよいアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニル、およびアルキニルを含むことができる。

【0184】

糖修飾は、リボースにおける対応する炭素のものとは逆の立体化学的配置を有する炭素を1または複数含有していてもよい糖基を含むことができる。すなわち、修飾核酸は、糖としてアラビノースなどを含有するヌクレオチドを含むことができる。これらの修飾核酸は、脱塩基糖を含むこともできる。これらの脱塩基糖は、構成糖原子の1または複数においてさらに修飾することができる。修飾核酸は、L型である糖を1または複数含むこともできる（例えば、L-ヌクレオシド）。

【0185】

修飾核酸に組み込むことができる、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、修飾塩基（別名、核酸塩基）を含むことができる。核酸塩基の例としては、ア

デニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、およびウラシル（U）が挙げられるが、これらに限定はされない。これらの核酸塩基を修飾または全体的に置換することで、修飾核酸に組み込むことができる修飾残基を得ることができる。ヌクレオチドの核酸塩基は、プリン、ピリミジン、プリン類似体、またはピリミジン類似体から独立して選択される。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、例えば、塩基の天然起源の誘導体および合成誘導体を含むことができる。

【0186】

デュアルガイドRNAを使用する実施形態では、crRNAおよびtracrRNAのそれぞれに、修飾を含ませることができる。このような修飾は、crRNAおよび／またはtracrRNAの一方または両方の末端にあってもよい。sgRNAを含む実施形態では、sgRNAの一方または両方の末端における1または複数の残基は化学修飾であってもよく、且つ／または、内部ヌクレオシドは修飾されていてもよく、且つ／または、sgRNA全体が化学修飾されていてもよい。ある特定の実施形態は5'末端修飾を含む。ある特定の実施形態は3'末端修飾を含む。ある特定の実施形態は5'末端修飾および3'末端修飾を含む。

【0187】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるガイドRNAは、その内容の全体が参照によって本明細書に援用される、「Chemically Modified Guide RNAs」という題名の、2017年12月8日に出版された国際公開第2018/107028号で開示された、修飾パターンの1つを含む。いくつかの実施形態では、本明細書において開示されたガイドRNAは、その内容の全体が参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第20170114334号で開示された、構造／修飾パターンの1つを含む。いくつかの実施形態では、本明細書において開示されたガイドRNAは、その内容の全体が参照によって本明細書に援用される、国際公開第2017/136794号で開示された、構造／修飾パターンの1つを含む。

【0188】

いくつかの実施形態では、sgRNAは、本明細書に示される修飾パターンのいずれかを含み、Nは任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、N全体で、表1～3の、本明細書に記載されるようなTRBC1ガイド配列、TRBC2ガイド配列、および／またはTRACガイド配列を構成する。いくつかの実施形態では、修飾sgRNAは以下の配列を含み：mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号300）、ここで「N」は任意の天然または非天然ヌクレオチドとしてよく、N全体で、表1および表2に記載されるような、または本明細書に記載されるような、TRBC1ガイド配列、TRBC2ガイド配列、および／またはTRACガイド配列を構成する。例えば、配列番号300が本明細書に包含されており、Nが本明細書の表1および表2に開示されるガイド配列のいずれかと置き換えられている（配列番号1～89、90～178、185、および213～218）。

【0189】

下記の修飾のいずれも、本明細書に記載のgRNAおよびmRNAの中に存在していてもよい。

【0190】

用語「mA」、「mC」、「mU」、または「mG」は、2'-O-Meで修飾されたヌクレオチドを表すために使用され得る。

【0191】

2'-O-メチルの修飾は以下のように示すことができる。

10

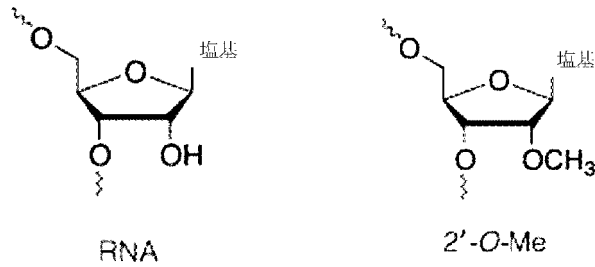
20

30

40

50

【化 1】



10

【0192】

ヌクレオチド糖環に影響を与えることが示されている別の化学修飾として、ハロゲン置換がある。例えば、ヌクレオチド糖環上の2'-フルオロ(2'-F)置換は、オリゴヌクレオチド結合親和性およびヌクレアーゼ安定性を増加させることができる。

【0193】

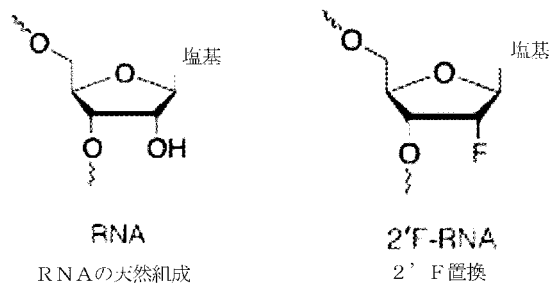
本願において、用語「fA」、「fC」、「fU」、または「fG」は、2'-Fで置換されたヌクレオチドを表すために使用され得る。

【0194】

2'-Fの置換は以下のように示すことができる。

20

【化 2】



30

【0195】

ホスホロチオエート(P S)結合は、ヌクレオチド塩基間の結合などにおける、ホスホジエステル結合におけるリン酸の架橋を行っていない1つの酸素が、硫黄と置換された結合を指す。オリゴヌクレオチドを作製するためにホスホロチオエートが使用された場合、その修飾オリゴヌクレオチドはS-オリゴと称される場合もある。

【0196】

「*」はP S修飾を表すために使用され得る。本願において、用語A*、C*、U*、またはG*は、次の(例えば、3')ヌクレオチドにP S結合で連結したヌクレオチドを表すために使用され得る。

40

【0197】

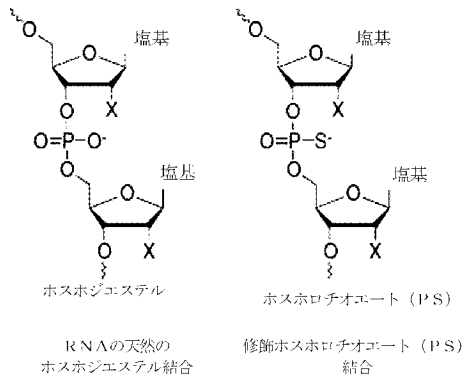
本願において、用語「mA*」、「mC*」、「mU*」、または「mG*」は、2'-O-Meで置換された、且つ、次の(例えば、3')ヌクレオチドにP S結合で連結した、ヌクレオチドを表すために使用され得る。

【0198】

下図は、架橋を行っていないリン酸の酸素へのS-置換による、ホスホジエステル結合に代わるP S結合の作製を示している。

50

【化 3】

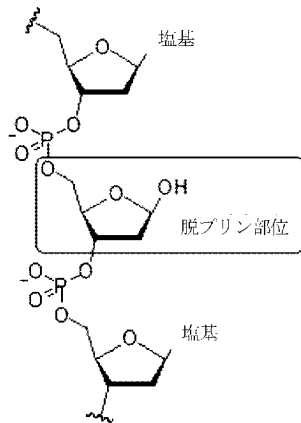


10

【0199】

脱塩基ヌクレオチドは窒素含有塩基を欠くヌクレオチドを指す。下図は、塩基を欠く脱塩基部位（別名、脱プリン部位）を有するオリゴヌクレオチドを表している。

【化 4】



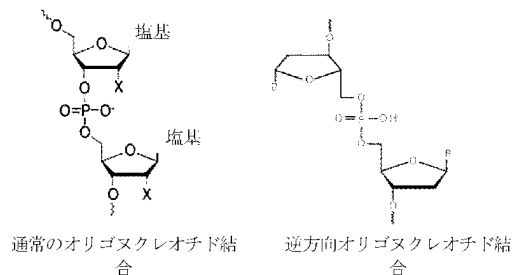
20

30

【0200】

逆方向塩基 (inverted base) とは、通常の 5' → 3' 結合から逆転した結合（すなわち、5' → 5' 結合または 3' → 3' 結合）を有する塩基を指す。例えば、以下である。

【化 5】



40

【0201】

脱塩基ヌクレオチドは逆方向結合で取り付けることができる。例えば、脱塩基ヌクレオチドを、5' → 5' 結合を介して 5' 末端ヌクレオチドに取り付けてもよいし、あるいは、脱 50

塩基ヌクレオチドを、3'→3'結合を介して3'末端ヌクレオチドに取り付けてもよい。5'末端ヌクレオチドまたは3'末端ヌクレオチドにおける逆方向脱塩基ヌクレオチドは、逆方向脱塩基末端キャップと称される場合もある。

【0202】

いくつかの実施形態では、5'末端の最初の3個、4個、または5個のヌクレオチドの1または複数、および3'末端の最後の3個、4個、または5個のヌクレオチドの1または複数が修飾される。いくつかの実施形態では、上記の修飾は、安定性および／または性能を増大させるための、2'-O-Me、2'-F、逆方向脱塩基ヌクレオチド、PS結合、または当該技術分野において周知の他のヌクレオチド修飾である。

【0203】

いくつかの実施形態では、5'末端の最初の4個のヌクレオチドと、3'末端の最後の4個のヌクレオチドとは、ホスホロチオエート(PS)結合で結合されている。

【0204】

いくつかの実施形態では、5'末端の最初の3個のヌクレオチドと、3'末端の最後の3個のヌクレオチドは、2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、5'末端の最初の3個のヌクレオチドと、3'末端の最後の3個のヌクレオチドは、2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、5'末端の最初の3個のヌクレオチドと、3'末端の最後の3個のヌクレオチドは、逆方向脱塩基ヌクレオチドを含む。

【0205】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは修飾sgRNAを含む。いくつかの実施形態では、sgRNAは、配列番号401に示される修飾パターンを含み、ここで、Nは任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、N全体で、例えば表1および表2に示されたような、ヌクレアーゼをTRBC1、TRBC2、および／またはTRAC内の標的配列に誘導するガイド配列を構成する。

【0206】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは配列番号179~184のいずれか1つに示されるsgRNAを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1~178のガイド配列のいずれか1つを含むsgRNAと、配列番号401のヌクレオチドと、を含み、当該配列番号401のヌクレオチドは号体ガイド配列の3'末端に位置しており、当該sgRNAは本明細書または配列番号300に示されているように修飾されていてもよい。

【0207】

上記で言及したように、いくつかの実施形態では、本明細書で開示される組成物または製剤は、本明細書に記載のCasヌクレアーゼなどのRNAガイド型DNA結合剤をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を含むmRNAを含む。いくつかの実施形態において、CasヌクレアーゼなどのRNAガイド型DNA結合剤をコードするORFを含むmRNAが提供され、使用され、投与される。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNAヌクレアーゼをコードするORFは、「修飾されたRNAガイド型DNA結合剤のORF」、または単に、ORFが修飾されていることを示す短縮表現として使用される「修飾ORF」である。

【0208】

いくつかの実施形態では、修飾ORFは、少なくとも1つ、複数、または全てのウリジン位置に修飾ウリジンを含み得る。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、5位において、ハロゲン、メチル、またはエチルなどで修飾されたウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、1位において、ハロゲン、メチル、またはエチルなどで修飾されたプソイドウリジンである。修飾ウリジンは、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、5-メトキシウリジン、5-ヨードウリジン、またはこれらの組み合わせなどとすることができる。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは5-メトキシウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは5-ヨードウリジンである。いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態では、修飾ウリジンはプソイドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンはN1-メチルプソイドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンはプソイドウリジンとN1-メチルプソイドウリジンとの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンはプソイドウリジンと5-メトキシウリジンとの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンはN1-メチルプソイドウリジンと5-メトキシウリジンとの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは5-ヨードウリジンとN1-メチルプソイドウリジンとの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンはプソイドウリジンと5-ヨードウリジンとの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは5-ヨードウリジンと5-メトキシウリジンとの組み合わせである。

10

【0209】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるmRNAは、キャップ0、キャップ1、またはキャップ2などの5'キャップを含む。5'キャップは、通常、mRNAの5'→3'鎖の最初のヌクレオチドの5'位に5'-三リン酸を介して結合した7-メチルグアニンリボヌクレオチド（例えばARCAに関しての下記のようにさらに修飾されていてもよい）、すなわち第一キャップ近傍ヌクレオチド、である。キャップ0では、mRNAの第一キャップ近傍ヌクレオチドおよび第二キャップ近傍ヌクレオチドのリボースの両方が、2'-ヒドロキシルを含む。キャップ1では、mRNAの第一ヌクレオチドおよび第二転写ヌクレオチドのリボースが、それぞれ2'-メトキシおよび2'-ヒドロキシルを含む。キャップ2では、mRNAの第一キャップ近傍ヌクレオチドおよび第二キャップ近傍ヌクレオチドのリボースが共に、2'-メトキシを含む。例えば、Katibahら（2014年）、Proc Natl Acad Sci USA、111巻（33号）：頁12025～30；Abbasら（2017年）Proc Natl Acad Sci USA、114巻（11号）：E2106-E2115を参照されたい。ヒトmRNAなどの哺乳類mRNAを含む、ほとんどの内在性高等真核生物mRNAが、キャップ1またはキャップ2を含む。キャップ0、並びにキャップ1およびキャップ2以外の他のキャップ構造は、IFIT-1およびIFIT-5などの自然免疫系の構成成分によって「非自己」として認識され、これによりI型インターフェロンを含むサイトカインレベルが上昇し得るために、ヒトなどの哺乳類においては免疫原性であり得る。IFIT-1およびIFIT-5などの自然免疫系の構成成分は、mRNAのキャップ1またはキャップ2以外のキャップとの結合において、eIF4Eとも競合し得るが、これにより、当該mRNAの翻訳が阻害される可能性がある。

20

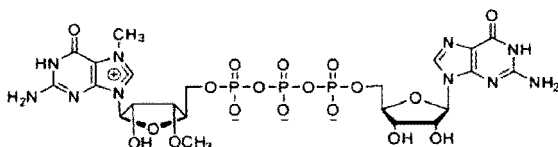
30

【0210】

転写と同時にキャップを含めることができる。例えば、ARCA（Anti-Reverse Cap Analog；サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社カタログ番号AM8045）は、グアニンリボヌクレオチドの5'位に連結した7-メチルグアニン3'-メトキシ-5'-三リン酸エステルを含むキャップ類似体であり、インビトロにおいて開始時に転写物に組み込むことができる。ARCAは、最初のキャップ近傍ヌクレオチドの2'位がヒドロキシルであるキャップ0キャップをもたらす。例えば、Stepinskiら、（2001年）、「Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl (3'-O-methyl) GpppG and 7-methyl (3'-deoxy) GpppG」、RNA、7巻：頁1486～1495を参照されたい。ARCA構造を以下に示す。

40

【化6】



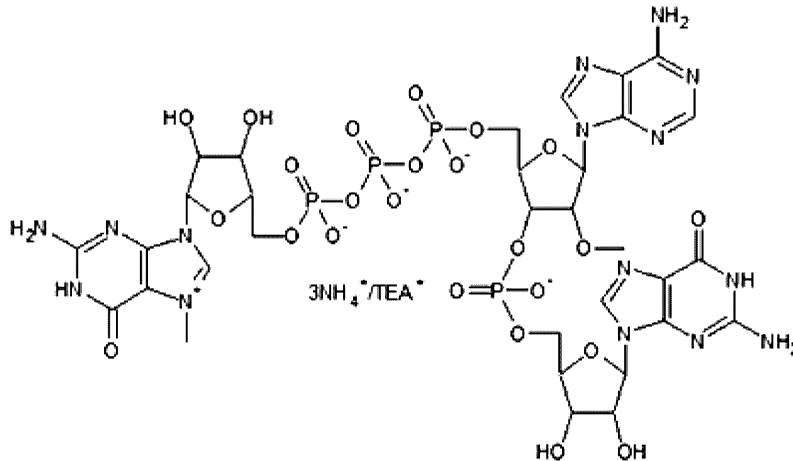
50

【0211】

CleanCap (商標) AG (m7G (5') ppp (5') (2' OMeA) pG; トライリンク・バイオテクノロジーズ社 (TriLink Biotechnologies) カタログ番号 N-7113) または CleanCap (商標) GG (m7G (5') ppp (5') (2' OMeG) pG; トライリンク・バイオテクノロジーズ社 カタログ番号 N-7133) を用いることで、転写と同時にキャップ1構造を得ることができる。CleanCap (商標) AG および CleanCap (商標) GG の3'-O-メチル化型も、トライリンク・バイオテクノロジーズ社から、それぞれカタログ番号 N-7413 および N-7433 として入手できる。CleanCap (商標) AG 構造を以下に示す。

10

【化7】



20

【0212】

あるいは、転写後に、キャップをRNAに付加することができる。例えば、ワクシニアキャップ形成酵素が市販されており (ニュー・イングランド・バイオラボ社 (New England Biolabs) カタログ番号 M2080S)、そのD1サブユニットによって与えられるRNAトリホスファターゼ活性およびグアニリルトランスフェラーゼ活性、並びに、そのD12サブユニットによって与えられるグアニンメチルトランスフェラーゼ、を有する。従って、上記酵素は、キャップ0が得られるように、S-アデノシルメチオニンおよびGTPの存在下で、7-メチルグアニンをRNAに付加することができる。例えば、Guo, P. および Moss, B. (1990年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87巻、頁4023~4027; Mao, X. および Shuman, S. (1994年)、J. Biol. Chem.、269巻、頁24472~24479を参照されたい。

30

【0213】

いくつかの実施形態では、上記mRNAはポリアデニル化 (ポリA) テールをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記ポリAテールは、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、または少なくとも100個のアデニン、所望により300個までのアデニンを含む。いくつかの実施形態では、上記ポリAテールは、95個、96個、97個、98個、99個、または100個のアデニンヌクレオチドを含む。

40

【0214】

C. リボ核タンパク質複合体

いくつかの実施形態では、表1および表2からの1もしくは複数のガイド配列を含む1もしくは複数のgRNA、または表3からの1もしくは複数のsgRNAと、RNAガイド型DNA結合剤、例えばヌクレアーゼ、例えばCasヌクレアーゼ、例えばCas9と、

50

を含む、組成物が包含される。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤（例えばCas9）は、二本鎖エンドヌクレアーゼ活性と称されることもある、クリベース活性を有する。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤はCas9ヌクレアーゼを含む。Cas9ヌクレアーゼの例としては、化膿性連鎖球菌（*S. pyogenes*）、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）、および他の原核生物（例えば、次の段落の列挙を参照）のII型CRISPR系のCas9ヌクレアーゼ、並びにその改変（例えば、操作または変異）型が挙げられる。例えば、米国特許出願公開第2016/0312198号；同第2016/0312199号を参照されたい。Casヌクレアーゼの他の例としては、III型CRISPR系のCsm複合体もしくはCmr複合体、またはそのCas10サブユニット、Csm1サブユニット、もしくはCmr2サブユニット；および、I型CRISPR系のカスケード複合体、またはそのCas3サブユニットが挙げられる。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、IIA型、IIB型、またはIIC型の系由来であり得る。種々のCRISPR系およびCasヌクレアーゼの考察については、例えば、Makarovaら、*Nat. Rev. Microbiol.*、9巻：頁467～477（2011年）；Makarovaら、*Nat. Rev. Microbiol.*、13巻：頁722～36（2015年）；Shmakovら、*Molecular Cell*、60巻：頁385～397（2015年）を参照されたい。

【0215】

Casヌクレアーゼを得ることができる非限定的且つ例示的な種としては、以下が挙げられる：化膿性連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）、ストレプトコッカス・サーモフィルス（*Streptococcus thermophilus*）、ストレプトコッカス属菌種（*Streptococcus sp.*）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、リステリア・イノキュア（*Listeria innocua*）、ラクトバチルス・ガセリ（*Lactobacillus gasserii*）、フランシセラ・ノビシダ（*Francisella novicida*）、ウォリネラ・サクシノゲネス（*Wolinella succinogenes*）、ステレラ・ワズワーセンシス（*Sutterella wadsworthensis*）、ガンマプロテオバクテリア（*Gammaproteobacterium*）、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）、カンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）、パストレラ・マルトシダ（*Pasteurella multocida*）、フィブロバクター・サクシノゲネス（*Fibrobacter succinogenes*）、ロドスピリウム・ラブラム（*Rhodospirillum rubrum*）、ノカルジオプシス・ダソンビレイ（*Nocardioopsis dassonvillei*）、ストレプトマイセス・プリステナエスピラリス（*Streptomyces pristinaespiralis*）、ストレプトマイセス・ビリドクロモゲネス（*Streptomyces viridochromogenes*）、ストレプトマイセス・ビリドクロモゲネス（*Streptomyces viridochromogenes*）、ストレプトスポランギウム・ロセウム（*Streptosporangium roseum*）、ストレプトスポランギウム・ロセウム（*Streptosporangium roseum*）、アリシクロバチルス・アシドカルダリウス（*Alicyclobacillus acidocaldarius*）、バチルス・シュードマイコイデス（*Bacillus pseudomycooides*）、バチルス・セレンチレデュセンズ（*Bacillus selenitireducens*）、エキシグオバクテリウム・シビリクム（*Exiguobacterium sibiricum*）、デルブリュッキ菌（*Lactobacillus delbrueckii*）、ラクトバチルス・サリヴァリウス（*Lactobacillus salivarius*）、ラクトバチルス・ブフネリ（*Lactobacillus buchneri*）、トレポネマ・デンチコラ（*Treponema denticola*）、ミクロシラ・マリナ（*Microscilla marina*）、バークホルデルリア目細菌（*Burkholderiales bacterium*）、ポラロモナス・ナフタレニボラ

ンス (*Polaromonas naphthalenivorans*)、ボラロモナス
 属菌種 (*Polaromonas* sp.)、クロコスファエラ・ワトソニ (*Croc-
 osphaera watsonii*)、シアノセイス属菌種 (*Cyanothece* sp.)、ミクロシスチス・エルギノーザ (*Microcystis aeruginosa*)、シネココッカス属菌種 (*Synechococcus* sp.)、アセトハロビウム・アラバチウム (*Acetohalobium arabaticum*)、アンモニフェックス・デゲンシ (*Ammonifex degensii*)、カルジセルロシラプター・ベクシ (*Caldicelulosiruptor becscii*)、カンジダツス・デスルフォルジス (*Candidatus Desulforudis*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*)、フィネゴルディア・マグナ (*Finnegoldia magna*)、ナトラナエロビウス・サーモフィルス (*Natran aerobius thermophilus*)、ペロトマキュラム・サーモプロピオニウム (*Pelotomaculum thermopropionicum*)、アシジチオバチルス・カルダス (*Acidithiobacillus caldus*)、アシジチオバチルス・フェロオキシダンス (*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、アロクロマチウム・ビノスム (*Allochromatium vinosum*)、マリノバクター属菌種 (*Marinobacter* sp.)、ニトロソコッカス・ハロフィルス (*Nitrosococcus halophilus*)、ニトロソコッカス・ワトソニ (*Nitrosococcus watsonii*)、シュードアルテロモナス・ハロプランクチス (*Pseudoalteromonas haloplanktis*)、クテドノバクター・ラセミファー (*Ktedonobacter racemifer*)、メタノハロビウム・エベスチガツム (*Methanohalobium evestigatum*)、アナベナ・バリアビリス (*Anabaena variabilis*)、ノジュラリナ・スプミゲナ (*Nodularia spumigena*)、ノストック属菌種 (*Nostoc* sp.)、アルスロスピラ・マキシマ (*Arthrospira maxima*)、アルスロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*)、アルスロスピラ属菌種 (*Arthrospira* sp.)、リングビア属菌種 (*Lyngbya* sp.)、ミクロコレウス・クトノプラステス (*Microcoleus chthonoplastes*)、オシラトリア属菌種 (*Oscillatoria* sp.)、ペトロトガ・モビリス (*Petrotoga mobilis*)、サーモシフォ・アフリガヌス (*Thermosiphon africanus*)、ストレプトコッカス・パステウリアヌス (*Streptococcus pasteurianus*)、ネイセリア・シネレア (*Neisseria cinerea*)、カンピロバクター・ラリ (*Campylobacter lari*)、パルビバキュラム・ラバメンチボランス (*Parvibaculum lavamentivorans*)、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheria*)、アシダミノコッカス属菌種 (*Acidaminococcus* sp.)、ラクノスピラ科 (*Lachnospiraceae*) 細菌 ND2006、およびアカリオクロリス・マリナ (*Acaryochloris marina*)。

10

20

30

40

50

【0216】

いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来の Cas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 由来の Cas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 由来の Cas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由来の Cas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、フランシセラ・ノビシダ (*Francisella novicida*) 由来の Cpf1ヌクレ

アーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、アシダミノコッカス属菌種 (*Acidaminococcus* sp.) 由来のCpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、ラクノスピラ科 (*Lachnospiraceae*) 細菌ND2006由来のCpf1ヌクレアーゼである。別の実施形態では、Casヌクレアーゼは、野兔病菌 (*Francisella tularensis*)、ラクノスピラ科 (*Lachnospiraceae*) 細菌、ブチリビブリオ・プロテオクラスチカス (*Butyrivibrio proteoclasticus*)、ペレグリニバクテリア属 (*Peregrinibacteria*) 細菌、パルクバクテリア属 (*Parcubacteria*) 細菌、スミセラ属 (*Smithella*)、アシダミノコッカス属 (*Acidaminococcus*)、カンジダツス・メタノプラズマ・テルミツム (*Candidatus Methanoplasma termitum*)、ユーバクテリウム・エリゲンス (*Eubacterium eligens*)、モラクセラ・ボボクリ (*Moraxella bovoculi*)、レプトスピラ・イナダイ (*Leptospira inadai*)、ポルフィロモナス・クレビオリカニス (*Porphyromonas crevioricanis*)、プレボテラ・ディシエンス (*Prevotella disiens*)、またはポルフィロモナス・マカカエ (*Porphyromonas macacae*) 由来のCpf1ヌクレアーゼである。ある特定の実施形態では、Casヌクレアーゼは、アシダミノコッカス属 (*Acidaminococcus*) またはラクノスピラ科 (*Lachnospiraceae*) 由来のCpf1ヌクレアーゼである。

10

20

【0217】

いくつかの実施形態では、gRNAとRNAガイド型DNA結合剤とが一緒になったものは、リボ核タンパク質複合体 (RNP) と呼ばれる。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤はCasヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、gRNAとCasヌクレアーゼが一緒になったものは、Cas RNPと呼ばれる。いくつかの実施形態では、RNPはI型、II型、またはIII型の構成成分を含む。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、II型CRISPR/Cas系からのCas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、gRNAとCas9が一緒になったものは、Cas9 RNPと呼ばれる。

【0218】

野生型Cas9は2つのヌクレアーゼドメイン (RuvCおよびHNH) を有する。RuvCドメインは非標的DNA鎖を切断し、HNHドメインは標的DNA鎖を切断する。いくつかの実施形態では、Cas9タンパク質は、2つ以上のRuvCドメインおよび／または2つ以上のHNHドメインを含む。いくつかの実施形態では、Cas9タンパク質は野生型Cas9である。組成物、使用、および方法の各実施形態において、Casは、標的DNAに二本鎖切断を誘導する。

30

【0219】

いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼのドメインタンパク質の1つのドメインまたは領域が異なるタンパク質の一部に置き換えられている、キメラCasヌクレアーゼが使用される。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼドメインは、FokIなどの異なるヌクレアーゼ由来のドメインと置き換えられ得る。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、修飾ヌクレアーゼであり得る。

40

【0220】

他の実施形態では、Casヌクレアーゼは、I型CRISPR/Cas系由来であり得る。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、I型CRISPR/Cas系のカスケード複合体の構成成分であり得る。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、Cas3タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、III型CRISPR/Cas系由来であり得る。いくつかの実施形態では、CasヌクレアーゼはRNA切断活性を有し得る。

【0221】

50

いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、一本鎖ニッカーゼ活性を有し、すなわち、一本のDNA鎖を切断して、一本鎖切断（別名「ニック」）を生じることができる。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤はCasニッカーゼを含む。ニッカーゼは、dsDNAにニックを生成する、すなわち、DNA二重らせんの一方の鎖を切断するが他方の鎖は切断しない、酵素である。いくつかの実施形態では、Casニッカーゼは、触媒ドメインにおける1または複数の改変（例えば、点変異）などによりヌクレオチド鎖切断活性部位が不活性化されている型のCasヌクレアーゼ（例えば、上述のCasヌクレアーゼ）である。Casニッカーゼおよび例示的な触媒ドメイン改変の考察については、例えば、米国特許第8,889,356号を参照されたい。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼなどのCasニッカーゼは、不活性化型のRuvCドメインまたはHNHドメインを有する。

10

【0222】

いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、機能的ヌクレアーゼドメインを1つのみ含むように改変されている。例えば、上記RNAガイド型DNA結合剤タンパク質は、その核酸切断活性を低減させるように、ヌクレアーゼドメインの1つが変異、または完全欠失もしくは部分欠失するように、改変されていてもよい。いくつかの実施形態では、活性が低減されたRuvCドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、不活性型RuvCドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、活性が低減されたHNHドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、不活性型HNHドメインを有するニッカーゼが使用される。

20

【0223】

いくつかの実施形態では、Casタンパク質ヌクレアーゼドメインを含まない保存アミノ酸配列は、ヌクレアーゼ活性を低減または変化させるように置換されている。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、RuvCヌクレアーゼドメインまたはRuvC様ヌクレアーゼドメインにアミノ酸置換を含んでいてもよい。RuvCヌクレアーゼドメインまたはRuvC様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、D10A（化膿性連鎖球菌（*S. pyogenes*）Cas9タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Zetscheら、（2015年）、Cell Oct 22:163巻（3号）：頁759～771。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、HNHヌクレアーゼドメインまたはHNH様ヌクレアーゼドメインにアミノ酸置換を含んでいてもよい。HNHヌクレアーゼドメインまたはHNH様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、E762A、H840A、N863A、H983A、およびD986A（化膿性連鎖球菌（*S. pyogenes*）Cas9タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Zetscheら（2015年）を参照されたい。さらなる例示的なアミノ酸置換として、D917A、E1006A、およびD1255A（フランシセラ・ノビシダ（*Francisella novicida*）U112 Cpf1（FnCpf1）配列（UniProtKB-A0Q7Q2（CPF1__FRATN）に基づく）が挙げられる。

30

【0224】

いくつかの実施形態では、ニッカーゼをコードするmRNAは、標的配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖に対してそれぞれ相補的なガイドRNA対と組み合わせて提供される。この実施形態では、上記ガイドRNAは上記ニッカーゼを標的配列に誘導し、標的配列の対向する鎖上にニックを生成すること（すなわち、ダブルニックング）により、DSBを導入する。いくつかの実施形態では、ダブルニックングの使用により、特異性が向上し、オフターゲット効果が低減し得る。いくつかの実施形態では、ニッカーゼが対向するDNA鎖を標的とする2つの別々のガイドRNAと一緒に使用されることで、標的DNAにダブルニックが生成される。いくつかの実施形態では、ニッカーゼが、すぐ近くに存在するように選択された2つの別々のガイドRNAと一緒に使用されることで、標的DNAにダブルニックが生成される。

40

【0225】

50

いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤はクリベース活性およびニックアーゼ活性を欠失している。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、dCas DNA結合性ポリペプチドを含む。dCasポリペプチドはDNA結合活性を有するが、触媒（クリベース／ニックアーゼ）活性を実質的に欠失している。いくつかの実施形態では、dCasポリペプチドはdCas9ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、クリベース活性およびニックアーゼ活性を欠失しているRNAガイド型DNA結合剤またはdCas DNA結合性ポリペプチドは、触媒ドメインにおける1または複数の改変（例えば、点変異）などによりそのヌクレオチド鎖切断活性部位が不活性化されている型のCasヌクレアーゼ（例えば、上述のCasヌクレアーゼ）である。例えば、米国特許出願公開第2014／0186958号；同第2015／0166980号を参照されたい。

10

【0226】

いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、1または複数の異種機能ドメインを含む（例えば、融合ポリペプチドである、またはそれを含む）。

【0227】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、細胞の核へのRNAガイド型DNA結合剤の輸送を促進するものであってよい。例えば、異種機能ドメインは、核局在化シグナル（NLS）であってもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、1～10個のNLSと融合していてもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、1～5個のNLSと融合していてもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、1個のNLSと融合していてもよい。1個のNLSが用いられている場合、NLSは、RNAガイド型DNA結合剤配列のN末端に連結されていてもよいし、あるいはC末端に連結されていてもよい。また、NLSは、RNAガイド型DNA結合剤配列内部に挿入されていてもよい。他の実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、2個以上のNLSと融合していてもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、2個、3個、4個、または5個のNLSと融合していてもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、2個のNLSと融合していてもよい。ある特定の状況では、上記2つのNLSは、同じものであっててもよいし（例えば、2個のSV40 NLS）、あるいは異なってもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、カルボキシ末端に連結された2つのSV40 NLS配列と融合していてもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、1個はN末端に連結され、1個はC末端に連結された、2個のNLSと融合していてもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、3個のNLSと融合していてもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、NLSと融合していてもよい。いくつかの実施形態では、NLSは、単節型配列であってもよく、例えば、SV40 NLS、PKKKRKV（配列番号600）、またはPKKKRRV（配列番号601）などである。いくつかの実施形態では、NLSは、双節型配列であってもよく、ヌクレオプラスミンのNLS、KRPAATKKAGQAKKKK（配列番号602）などである。特定の実施形態では、1個のPKKKRKV（配列番号600）NLSがRNAガイド型DNA結合剤のC末端に連結されていてもよい。所望により、1または複数のリンカーが融合部位に含まれる。

20

30

40

【0228】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイド型DNA結合剤の細胞内半減期を改良することが可能なものであっててもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤の半減期は増加され得る。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤の半減期は減少され得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイド型DNA結合剤の安定性を増加させることが可能なものであっててもよい。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイド型DNA結合剤の安定性を減少させることが可能なものであっててもよい。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、タンパク質分解のシグナルペプチドとして働くものであっててもよい。いくつかの実施形

50

態では、このタンパク質分解は、タンパク質分解酵素を介したものであってもよく、例えば、プロテアソーム、リソソーム性プロテアーゼ、またはカルパインプロテアーゼなどである。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、P E S T配列を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイド型DNA結合剤は、ユビキチンまたはポリユビキチン鎖の付加により修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、上記ユビキチンは、ユビキチン様タンパク質 (U B L) であってもよい。ユビキチン様タンパク質の非限定例としては、低分子ユビキチン様修飾因子 (S U M O)、ユビキチン交差反応性タンパク質 (u b i q u i t i n c r o s s - r e a c t i v e p r o t e i n) (U C R P、別名インターフェロン活性化遺伝子-15 (i n t e r f e r o n - s t i m u l a t e d g e n e - 1 5) (I S G 1 5))、ユビキチン関連修飾因子-1 (u b i q u i t i n - r e l a t e d m o d i f i e r - 1) (U R M 1)、神経前駆細胞発現型発生的発現減少タンパク質-8 (n e u r o n a l - p r e c u r s o r - c e l l - e x p r e s s e d d e v e l o p m e n t a l l y d o w n r e g u l a t e d p r o t e i n - 8) (N E D D 8、出芽酵母 (S . c e r e v i s i a e) ではR u b 1とも称される)、ヒト白血球抗原F関連 (h u m a n l e u k o c y t e a n t i g e n F - a s s o c i a t e d) (F A T 1 0)、オートファジー-8 (A T G 8) およびオートファジー-12 (A T G 1 2)、F a uユビキチン様タンパク質 (F U B 1)、膜アンカー型U B L (m e m b r a n e - a n c h o r e d U B L) (M U B)、ユビキチンフォールディング修飾因子-1 (u b i q u i t i n f o l d - m o d i f i e r - 1) (U F M 1)、並びにユビキチン様タンパク質-5 (U B L 5) が挙げられる。

10

20

【0229】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、マーカードメインであってもよい。マーカードメインの非限定例としては、蛍光タンパク質、精製用タグ、エピトープ標識、およびレポーターの遺伝子配列が挙げられる。いくつかの実施形態では、マーカードメインは、蛍光タンパク質であってもよい。好適な蛍光タンパク質の非限定例としては、緑色蛍光タンパク質 (例えば、G F P、G F P - 2、t a g G F P、t u r b o G F P、s f G F P、E G F P、E m e r a l d、A z a m i G r e e n、M o n o m e r i c A z a m i G r e e n、C o p G F P、A c e G F P、Z s G r e e n 1)、黄色蛍光タンパク質 (例えば、Y F P、E Y F P、C i t r i n e、V e n u s、Y P e t、P h i Y F P、Z s Y e l l o w 1)、青色蛍光タンパク質 (例えば、E B F P、E B F P 2、A z u r i t e、m K a l a m a l、G F P u v、S a p p h i r e、T - s a p p h i r e)、シアン蛍光タンパク質 (例えば、E C F P、C e r u l e a n、C y P e t、A m C y a n 1、M i d o r i i s h i - C y a n)、赤色蛍光タンパク質 (例えば、m K a t e、m K a t e 2、m P l u m、D s R e d m o n o m e r、m C h e r r y、m R F P 1、D s R e d - E x p r e s s、D s R e d 2、D s R e d - M o n o m e r、H c R e d - T a n d e m、H c R e d 1、A s R e d 2、e q F P 6 1 1、m R a s b e r r y、m S t r a w b e r r y、J r e d)、および橙黄色蛍光タンパク質 (m O r a n g e、m K O、K u s a b i r a - O r a n g e、M o n o m e r i c K u s a b i r a - O r a n g e、m T a n g e r i n e、t d T o m a t o) が挙げられ、あるいは任意の他の好適な蛍光タンパク質も挙げられる。他の実施形態では、マーカードメインは、精製用タグおよび／またはエピトープ標識であってもよい。非限定的且つ例示的なタグとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (G S T)、キチン結合タンパク質 (C B P)、マルトース結合タンパク質 (M B P)、チオレドキシン (T R X)、ポリ (N A N P)、タンデムアフィニティー精製 (T A P) 用タグ、m y c、A c V 5、A U 1、A U 5、E、E C S、E 2、F L A G、H A、n u s、S o f t a g 1、S o f t a g 3、S t r e p、S B P、G l u - G l u、H S V、K T 3、S、S 1、T 7、V 5、V S V - G、6 x H i s、8 x H i s、ビオチンカルボキシルキャリアータンパク質 (B C C P)、ポリ-H i s、およびカルモジュリンが挙げられる。非限定的且つ例示的なレポーター遺伝子としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (G S T)、西洋わさびペル

30

40

50

オキシダーゼ（HRP）、クロラムフェニコールアセチル基転移酵素（CAT）、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質が挙げられる。

【0230】

追加の実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイド型DNA結合剤を、特定の細胞小器官、細胞型、組織、または臓器に標的化するものとしてもよい。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイド型DNA結合剤をミトコンドリアに標的化するものとしてもよい。

【0231】

別の実施形態では、異種機能ドメインは、エフェクタードメインであってもよい。RNAガイド型DNA結合剤がその標的配列に誘導されている場合、例えば、CasヌクレアーゼがgRNAによって標的配列に誘導されている場合、エフェクタードメインは当該標的配列を変化させるまたはそれに影響を与えるものであってもよい。いくつかの実施形態では、エフェクタードメインは、核酸結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン（例えば、非Casヌクレアーゼドメイン）、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写リプレッサー因子ドメインから選択されるものであってもよい。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインはヌクレアーゼであり、FokIヌクレアーゼなどである。例えば、米国特許第9,023,649号を参照されたい。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、転写活性化因子または転写抑制因子である。例えば、Qiら、「Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression」、Cell、152巻：頁1173～83（2013年）；Perez-Pineraら、「RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors」、Nat. Methods、10巻：頁973～6（2013年）；Maliら、「CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering」、Nat. Biotechnol.、31巻：頁833～8（2013年）；Gilbertら、「CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes」、Cell、154巻：頁442～51（2013年）を参照されたい。従って、RNAガイド型DNA結合剤は本質的には、ガイドRNAを用いて所望の標的配列と結合するよう誘導できる転写因子となる。

【0232】

D. gRNAの有効性の決定

いくつかの実施形態では、gRNAの有効性は、RNPを形成している他の構成成分と一緒に送達または発現された場合に決定される。いくつかの実施形態では、gRNAは、Casタンパク質（例えばCas9）などのRNAガイド型DNA結合剤と一緒に発現される。いくつかの実施形態では、gRNAは、Casヌクレアーゼまたはニッカーゼ（例えば、Cas9ヌクレアーゼまたはニッカーゼ）などのRNAガイド型DNAヌクレアーゼを既に安定に発現している細胞株に送達されるか、またはそれにおいて発現される。いくつかの実施形態では、gRNAはRNPの一部として細胞に送達される。いくつかの実施形態では、gRNAは、Casヌクレアーゼまたはニッカーゼ（例えば、Cas9ヌクレアーゼまたはニッカーゼ）などのRNAガイド型DNAヌクレアーゼをコードするmRNAと共に、細胞に送達される。

【0233】

本明細書に記載のように、本明細書で開示されるRNAガイド型DNAヌクレアーゼおよびガイドRNAの使用により、DNAに二本鎖切断を引き起こし、細胞機構による修復後に挿入／欠失（インデル）変異の形態のエラーを生じさせることができる。インデルによ

る変異の多くは、読み取り枠を変化させるか、または中途終止コドンを導入するため、非機能的なタンパク質を生じる。

【0234】

いくつかの実施形態では、特定の gRNA の有効性はインビトロモデルに基づいて求められる。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、Cas9 を安定発現する HEK293 細胞である (HEK293_Cas9)。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、末梢血単核球 (PBMC) である。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、初代ヒト T 細胞などの T 細胞である。初代細胞の使用に関して、実験間の一貫性がより大きくなるように、市販の初代細胞を使用することができる。いくつかの実施形態では、インビトロモデル (例えば、T 細胞) における欠失または挿入が生じたオフターゲット部位の数が、例えば、インビトロで Cas9 mRNA およびガイド RNA をトランスフェクトされた細胞から得られたゲノム DNA を解析することにより、求められる。いくつかの実施形態では、このような決定は、インビトロで Cas9 mRNA、ガイド RNA、およびドナーオリゴヌクレオチドをトランスフェクトされた細胞から得られたゲノム DNA を解析することを含む。このような決定の例示的な手順は、HEK293 細胞が使用された実施例、PBMC が使用された実施例、およびヒト CD3+T 細胞が使用された実施例に提供されている。

10

【0235】

いくつかの実施形態では、特定の gRNA の有効性を複数のインビトロ細胞モデルにおいて求めることで、gRNA セレクション工程を行う。いくつかの実施形態では、セレクションされた gRNA を用いた場合のデータの細胞株比較が行われる。いくつかの実施形態では、複数の細胞モデルにおけるクロススクリーニングが行われる。

20

【0236】

いくつかの実施形態では、ガイド RNA の有効性は、TRBC1、TRBC2、および／または TRAC のインデル率によって測定される。いくつかの実施形態では、ガイド RNA の有効性は、TRBC および／または TRAC のインデル率によって測定される。いくつかの実施形態では、ガイド RNA の有効性は、TRBC または TRAC のインデル率によって測定される。いくつかの実施形態では、TRBC1、TRBC2、および／または TRAC の編集率が、TRBC1 タンパク質産物、TRBC2 タンパク質産物、および／または TRAC タンパク質産物のノックダウンを達成するために必要なインデル率と比較される。

30

【0237】

いくつかの実施形態では、ガイド RNA の有効性は、T 細胞受容体 (TCR) の構成成分の発現の減少または消失によって測定される。各実施形態において、T 細胞受容体 (TCR) の構成成分の発現の減少または消失は、TRAC、TRBC1、TRBC2、CD3E、CD3G、および／または CD3D の発現の減少または消失を包含する。各実施形態において、上記の TCR の構成成分の発現の減少または消失は、TCR の構成成分に対する本明細書に記載の gRNA 分子を、1 または複数、例えば 1 つまたは 2 つ、例えば 1 つ、細胞に導入した結果である。各実施形態において、上記の TCR の構成成分の発現の減少または消失は、例えば本明細書に記載のように、フローサイトメトリーで測定されるような、減少または消失である。

40

【0238】

いくつかの実施形態では、ガイド RNA の有効性は、T 細胞などの標的細胞型のゲノム内のオフターゲット配列におけるインデルの数および／または頻度によって測定される。いくつかの実施形態では、細胞集団において、且つ／または標的部位におけるインデル生成の頻度と比較して、非常に低い頻度 (例えば、<5%) でしかオフターゲット部位にインデルを生じない、効果的なガイド RNA が提供される。よって、本開示は、標的細胞型 (例えば、T 細胞) においてオフターゲットのインデル形成を示さない、または、細胞集団において、且つ／もしくは標的部位におけるインデル生成の頻度と比較して、<5% のオフターゲットのインデル形成の頻度をもたらす、ガイド RNA を提供する。いくつかの実

50

施形態では、本開示は、標的細胞型（例えば、T細胞）にいかなるオフターゲットインデル形成も示さない、ガイドRNAを提供する。いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載の1または複数の方法で評価された場合に、5か所未満のオフターゲット部位でしかインデルを生じない、ガイドRNAが提供される。いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載の1または複数の方法で評価された場合に、4、3、2、または1か所以下のオフターゲット部位でしかインデルを生じない、ガイドRNAが提供される。いくつかの実施形態では、オフターゲット部位は、標的細胞（例えば、肝細胞）ゲノム内のタンパク質コード領域に生じない。

【0239】

いくつかの実施形態では、標的DNAにおける、挿入／欠失（「インデル」）変異の形成などの遺伝子編集イベント、および相同組換え修復（HDR）イベントの検出は、タグ付プライマーを用いた線形増幅とタグ付増幅産物の単離とを活用する（以後、「LAM-PCR」法、または「線形増幅（LA）」法と称する）。

【0240】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAの有効性は、当該遺伝子の発現されたタンパク質産物を含む機能的タンパク質複合体のレベルによって測定される。いくつかの実施形態では、ガイドRNAの有効性は、編集後の生細胞集団をTCRの減少について分析するTCR発現のフローサイトメトリー分析によって測定される。

【0241】

III. 治療法および操作された細胞または免疫療法用試薬を作製する方法を含む方法
本明細書で開示されるgRNA並びに関連の方法および組成物は、免疫療法において有用であり、また、操作された細胞などの免疫療法用試薬を作製する際に有用である。

【0242】

いくつかの実施形態では、表1および表2のガイド配列を含むgRNAは、CasヌクレアーゼなどのRNAガイド型DNAヌクレアーゼと一緒に、DSBを誘導し、修復中の非相同末端結合（non-homologous ending joining）（NHEJ）により、TRBC1遺伝子、TRBC2遺伝子、および／またはTRAC遺伝子に変異が生じる。いくつかの実施形態では、NHEJがヌクレオチドの欠失または挿入を引き起こし、これにより、フレームシフト変異またはナンセンス変異がTRBC1遺伝子、TRBC2遺伝子、および／またはTRAC遺伝子に誘導される。

【0243】

いくつかの実施形態では、対象は哺乳類である。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、対象は雌ウシ、ブタ、サル、ヒツジ、イヌ、ネコ、魚類、または家禽類である。

【0244】

いくつかの実施形態では、免疫療法を必要とするヒト対象を治療するための医薬の調製のために、表1および表2のガイド配列の任意の1もしくは複数の含むガイドRNA、または表3の1もしくは複数のsgRNAの（例えば、本明細書において提供される組成物中の）使用が提供される。

【0245】

いくつかの実施形態では、上記のガイドRNA、組成物、および製剤を用いて、変異したTRBC1遺伝子、TRBC2遺伝子、および／またはTRAC遺伝子を有するT細胞がエキソビボで作製される。上記の改変されたT細胞は、ナチュラルキラー（NK）T細胞であってもよい。上記の改変されたT細胞は、普遍的なTCRまたは改変されたTCRなどの、T細胞受容体を発現するものであってもよい。上記T細胞は、CAR、または鎖シグナル伝達モチーフを有するCARコンストラクトを発現するものであってもよい。

【0246】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供されるガイドRNAを含む組成物の単回投与が、TRBC1、TRBC2、またはTRACの発現をノックダウンするために十分である。他の実施形態では、本明細書において提供されるガイドRNAを含む組成物の2

10

20

30

40

50

回以上の投与が、治療効果を増大させるために有益であり得る。

【0247】

gRNA組成物の送達

脂質ナノ粒子（LNP）は、積荷ヌクレオチドおよび積荷タンパク質の送達において有用な手段であり、本明細書で開示されるガイドRNA、組成物、または医薬製剤の送達に使用され得る。いくつかの実施形態では、LNPは、核酸、タンパク質、または核酸とタンパク質を送達する。

【0248】

ガイドRNAまたは他の核酸（例えば、ポリペプチドをコードする核酸）を、脂質ナノ粒子（LNP）と結び付けてもよい。好適なLNPは当該技術分野において公知のものである。例えば、PCT/US2018/053559、国際公開第2017/173054号、同第2015/095340号、および同第2014/136086号、並びにこれらに記載された参考文献の脂質を参照されたい。

10

【0249】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書において開示されるgRNAのうちのいずれか1つを対象に送達するための方法であって、上記gRNAがLNPを介して送達される、方法を含む。いくつかの実施形態では、上記gRNA/LNPはまた、Cas9またはCas9をコードするmRNAと結び付けられる。

【0250】

いくつかの実施形態では、本発明は、開示されたgRNAのいずれか1つとLNPとを含む組成物を含む。いくつかの実施形態では、上記組成物は、Cas9またはCas9をコードするmRNAをさらに含む。

20

【0251】

いくつかの実施形態では、上記LNPはイオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、上記LNPは、(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアート、別名3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエノアート、または別のイオン性脂質を含む。例えば、PCT/US2018/053559（2018年9月28日に出版）、国際公開第2017/173054号、同第2015/095340号、および同第2014/136086号、並びにこれらに記載された参考文献の脂質を参照されたい。いくつかの実施形態では、LNP脂質に関連した陽イオン性およびイオン性という用語は互換的であり、例えば、イオン性脂質はpHによっては陽イオン性である。

30

【0252】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるgRNAと結び付けられたLNPは、疾患または障害を治療するための医薬を作製する際に有用である。

【0253】

エレクトロポレーションは積荷送達のもう1つの有用な手段であり、本明細書において開示されるgRNAのいずれか1つの送達に、任意のエレクトロポレーション法を用いてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるgRNAのいずれか1つ、およびCas9またはCas9をコードするmRNAを送達するために、エレクトロポレーションを用いてもよい。

40

【0254】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書において開示されるgRNAのうちのいずれか1つを生体外細胞に送達するための方法であって、上記gRNAがLNPと結び付けられている、またはLNPと結び付けられていない、方法を含む。いくつかの実施形態では、上記gRNA/LNPまたはgRNAはまた、Cas9またはCas9をコードするmRNAと結び付けられる。

50

【0255】

いくつかの実施形態では、単独の、または1もしくは複数のベクター上にコードされた、本明細書に記載のガイドRNA組成物は、脂質ナノ粒子の中に製剤化されるか、または脂質ナノ粒子を介して投与される。例えば、その内容の全体が参照によって本明細書に援用される国際公開第2017/173054号を参照されたい。

【0256】

ある特定の実施形態では、本発明は、本明細書に記載のガイド配列のうちのいずれか1または複数を含むガイドRNAのいずれかをコードするDNAベクターまたはRNAベクターを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA配列に加えて、上記ベクターは、ガイドRNAをコードしていない核酸をさらに含む。ガイドRNAをコードしていない核酸としては、プロモーター、エンハンサー、制御配列、および、Cas9などのヌクレアーゼであり得るRNAガイド型DNAヌクレアーゼをコードしている核酸が挙げられるが、これらに限定はされない。いくつかの実施形態では、上記ベクターは、crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNAをコードする1または複数のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記ベクターは、sgRNAと、Cas9またはCpf1などのCasヌクレアーゼであり得るRNAガイド型DNAヌクレアーゼをコードするmRNAと、をコードする1または複数のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、上記ベクターは、crRNAと、trRNAと、Cas9などのCasタンパク質であり得るRNAガイド型DNAヌクレアーゼをコードするmRNAと、をコードする1または複数のヌクレオチド配列を含む。1つの実施形態では、Cas9は化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来 (すなわち、Spy Cas9) である。いくつかの実施形態では、crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNA (sgRNAであり得る) をコードするヌクレオチド配列は、ガイド配列と、それに隣接した天然起源のCRISPR/Cas系由来の反復配列の全てまたは一部と、を含む、またはこれらからなる。crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNAを含む、またはそれからなる核酸は、天然において当該crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNAと一緒に存在しない核酸を含む、またはそれからなる、ベクター配列をさらに含んでもよい。

【0257】

いくつかの実施形態では、上記構成成分は、裸の核酸として導入することもできるし、リポソームまたはポロキサマーなどの剤と複合体化された核酸として導入することもできるし、あるいは、リボ核タンパク質複合体 (RNP) である核酸 (例えばgRNA) およびタンパク質として導入することもできる。いくつかの実施形態では、上記構成成分は、ウイルスベクター (例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス) などの、ベクターによって送達されてもよい。核酸の非ウイルス性送達のための方法および組成物として、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、ピロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、LNP、ポリカチオンまたは脂質：核酸複合体、裸の核酸 (例えば、裸のDNA/RNA)、人工ビリオン、および薬剤によるDNAの取り込み増強が挙げられる。Sonitron 2000システム (リッチマー社 (Rich-Mar)) などを用いたソノポレーションも、核酸の送達に使用できる。

【0258】

ポリペプチドの細胞への導入は、当該目的ポリペプチドをコードする核酸鑄型などの核酸を当該細胞に送達することにより、行うことができる。核酸鑄型は、目的ポリペプチドを、所望により発現カセットの一部としてコードしていてもよく、この場合、当該鑄型は隣接配列をさらに含む。所望により、そのような隣接配列は、上記細胞における上記鑄型核酸の相同組換え修復および組み込みを促進するように設計された、ホモロジーアームである。核酸鑄型に、第一標的遺伝子座と相同的な配列に挟まれた目的ポリペプチドのオープンリーディングフレーム (ORF) を含ませることで、標的遺伝子座における相同組換えを促進させてもよい。鑄型に、gRNA切断部位に隣接したホモロジーアームを含ませて

もよく、例えば、このホモロジーアームは隣接配列を含む。ある特定の実施形態では、上記隣接配列は、切断部位またはその周辺の上記標的遺伝子座の領域を除外して、この領域の欠失を引き起こすことで、修復後のこの部位の切断を妨げ、また、gRNA/Cas9が上記鋳型核酸を切断することを妨げるように設計される。gRNA切断部位を含む除外領域または「ギャップ」は、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、またはそれ以上のヌクレオチド長であり得る。上記隣接配列は、例えば、10～100ヌクレオチドのギャップ、10～50ヌクレオチドのギャップ、25～100ヌクレオチドのギャップ、または50～100ヌクレオチドのギャップを除去するように設計され得る。

【0259】

目的ポリペプチドをコードする核酸は、ウイルス性鋳型または非ウイルス性鋳型に含ませてもよい。ウイルスベクターは、任意の好適なウイルスとしてもよいが、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはこれらのハイブリッドなどである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターとしてもよい。上記核酸鋳型は、ORFの上流に外来性プロモーター配列を含んでもよい。内在性のTRACプロモーターが挿入後の目的ポリペプチドの発現を駆動し得ることから、上記核酸鋳型はプロモーターレスでもよい。

【0260】

目的ポリペプチドをコードする配列に加えて、核酸鋳型は、プロモーター配列、コザック配列、IRES配列、スプライスアクセプター配列、ポリA配列、およびP2A、T2A、E2Aなどの切断可能ペプチドをコードする配列のうちの1または複数を含んでもよい。

【0261】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、1または複数の目的ポリペプチドをコードする1または複数の遺伝子を含む1または複数の配列を細胞に送達することをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記目的ポリペプチドは、免疫寛容の制御に関するものである。いくつかの実施形態では、上記目的ポリペプチドは、がん表現型の制御に関するものである。

【0262】

いくつかの実施形態では、上記の1または複数のポリペプチドは、受容体を含み、例えば、免疫受容体を含む。免疫受容体(immunological receptor)とは、抗原を認識できる受容体を意味する。例示的な免疫受容体の種類として、T細胞受容体(TCR)およびキメラ抗原受容体(CAR)がある。いくつかの実施形態では、上記免疫受容体は、WT1などのがん抗原を認識するものである。ある特定の実施形態では、上記の目的ポリペプチドは、WT1 TCRである。上記のWT1 TCRは、VLDFAPPGA(VLD)WT1ペプチドを認識するものであってもよいし、あるいはRMFPNAPYL(RMF)WT1ペプチドを認識するものであってもよい。ある特定の実施形態では、上記WT1 TCRは、VLDペプチドを認識するものである。上記の目的ポリペプチドは、WT1 TCRのα鎖を含むものであってもよい。上記の目的ポリペプチドは、WT1 TCRのβ鎖を含むものであってもよい。ある特定の実施形態では、上記の目的ポリペプチドは、WT1 TCRα鎖とWT1 TCRβ鎖とを含むものであってもよい。例示的なWT1特異的TCR配列は、当該技術分野において公知のものであり、以下が挙げられる。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4

TCR ID	アミノ酸配列	配列 番号
TCR-A (β —リンカ — α 配置)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV LRCKPIS GH DYLFWYRQTMMRGLELLIY FNNNV PIDDSG MPEDRFS AK MPNASFSTLKI Q PSEPRDS AVYFCASRKTGG YSNQQH FGDGTRL S ILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMVKRKDSRGG GATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLKVLSGTLLWQLTWV RSQQPVQSPQAVILREGEDAVINCSS KALYS VHWYRQKH GEAPVFLMILL KGGEQ KGHEKISASFNEKKQSSLYLTAS QLSYSGTYFC GTAWINDYKLS FGAGTTVTVRANIQNPD AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDK TVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAG FNLLMTLRLWSS	500
TCR-A、 α 鎖	METLLKVLSGTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDA VINCSS KALYS VHWYRQKHGEAPVFLMILL KGGEQ KG HEKISASFNEKKQSSLYLTASQLSYSGTYFC GTAWINDY KLS FGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETD TNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	501
TCR-A、 β 鎖	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV LRCKPIS GH DYLFWYRQTMMRGLELLIY FNNNV PIDDSG MPEDRFS AK MPNASFSTLKI Q PSEPRDS AVYFCASRKTGG YSNQQH FGDGTRL S ILEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG	502

10

20

30

40

50

	LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLAMVVKRKDSRG	
TCR-B (β-リンカー -α 配置)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV LRCKPIS GH DYLFWYRQTMMRGLELLIYFNN NP IDDSG MPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCAS RKTGG YSNQPQH FGDGTRLSELDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPRNHFRQCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLAMVVKRKDSRGGS GATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLKVLSGTLLWQLTWV RSQQPVQSPQAVILREGEDAVINCSS S KALYSVHWYRQKH GEAPVFLMILL KGGEQ KGHEKISASFNEKKQSSLYLTAS QLSYSGTYFC GTAWINDYKLS FGAGTTVTVRANIQNPD AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDK TVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAG FNLLMTLRLWSS	503
TCR-B、α鎖	METLLKVLSGTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDA VINCSS S KALYSVHWYRQKHGEAPVFLMILL KGGEQ KG HEKISASFNEKKQSSLYLTASQLSYSGTYFC GTAWINDY KLS FGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETD TNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	504
TCR-B、β鎖	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEV LRCKPIS GH DYLFWYRQTMMRGLELLIYFNN NP IDDSG MPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCAS RKTGG YSNQPQH FGDGTRLSELDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFWQNPRNHFRQCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLAMVVKRKDSRG	505

10

20

30

40

50

TCR-C (β-リンカー- α配置)	MSNQVLCCVVLCLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNV LSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGD IAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSPGALYE QYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPA LNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVSAVLMLMAMVKRKDSRGGSGATNF SLLKQAGDVEENPGPMTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQ HPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQL IIDIRSNVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVY FCAATEDLTLIWGAGTKLIKPDIQNPDPVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKS NSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	506
TCR-C、α鎖	MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVI KCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIIDIRSNVGEKKDQRI AVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAATEDLTLIWGA GTKLIKPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL LSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	507
TCR-C、β鎖	MSNQVLCCVVLCLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNV LSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGD IAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSPGALYE QYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPA LNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVSAVLMLMAMVKRKDSRG	508
TCR-D (β-リンカー- α配置)	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTPRHLVMGMT NKSLKCEQHLGHNAMEYWKQSAKKPLELMFVYSLEER VENNSVPSRFSPECNPSSHLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQ	509

10

20

30

40

50

	DYLVSNKELFFGSGTQLSVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMVKKRDSR GGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSW VWSQRKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFW YRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLI RDSKLSDSATYLCVVNLLSNQGGKLIFGQGTLSVKPNIQ NPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVY ITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIP EDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS	
TCR-D、 α 鎖	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPFNVPEGAT VAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNED GRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVNLLSNQGG KLIFGQGTLSVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTD FDSQTNVSQSKDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWS NKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLFQNLVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS	510
TCR-D、 β 鎖	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTPRHLVGMGT NKKSLKCEQHLGHNAMEYWKQSAKKPLELMFVYSLEER VENNSVPSRFSPECNSSLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQ DYLVSNKELFFGSGTQLSVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMVKKRDSR G	511
TCR-E (β -リンカー- α 配置)	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTPRHLVGMGT NKKSLKCEQHLGHNAMEYWKQSAKKPLELMFVYSLEER VENNSVPSRFSPECNSSLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQ DYLVSNKELFFGSGTQLSVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI	512

10

20

30

40

50

	SHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSR GGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSW VWSQRKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFW YRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLI RDSKLSDSATYLCVVNLLSNQGGKLIFGQGTELSVKPNIQ NPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVY ITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIP EDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS	
TCR-E、α鎖	MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPFNVPEGAT VAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNED GRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVNLLSNQGG KLIFGQGTELSVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTD FDSQTNVSQSKDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWS NKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDT NLFQNLVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS	513
TCR-E、β鎖	MGCRLCCAVLCLLGAGELVPMETGVTQTPRHLVMGMT NKKSLKCEQHLGHNAMEWYKQSAKKPELMFVYSLEER VENNSVPSRFSPECNSSHFLHLHTLQPEDSALYLCASSQ DYLVSNEKLFFGSGTQLSVLEDLNKVPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSR G	514
TCR-F (β-リンカー- α配置)	MLSPDLPSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRH LIKEKRETATLKCYPHRHDTVYWYQQGPGQDPQLISFYE KMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSLELGDSALYFC ASSLRGGLEKLFFGSGTQLSVLEDLNKVPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT	515

10

20

30

40

50

	DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFTWQNPRNHFRCQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVS YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMVVRKD FGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMSLSLLKVVTASLWL PGIAQKITQTQPGMFVQEKEAVTLDCTYDTSQPSYGLFWY KQPSSGEMIFLIYQGSYDQQNATEGRYSLNFQKARKSANL VISASQLGDSAMYFCAISGNTPLVFGKGTRLSVIANIQNPD PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITD KCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPED TFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLV AGFNLLMTLRLWSS	
TCR-F、α鎖	MSLSLLKVVTASLWLGPGLAQKITQTQPGMFVQEKEAVT LDCTYDTSQPSYGLFWYKQPSSGEMIFLIYQGSYDQQNAT EGRYSLNFQKARKSANLVISASQLGDSAMYFCAISGNTPL VFGKGTRLSVIANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNL NFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	516
TCR-F、β鎖	MLSPDLPSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRH LIKEKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYE KMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSLELGDSALYFC ASSLRGGLEKLFFGSGTQLSVLEDLNKVFPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAFTWQNPRNHFRCQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVS YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMVVRKD F	517
TCR-G (β-リンカー- α配置)	MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKHEKRQSVAF WCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFNNGVVDDSQLP KDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSLYRGEQ YFGPGTRTLVTEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSAFTWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDE	518

10

20

30

40

50

	WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVSAVLMLAMVVKRKDSRGGSGATNF SLLKQAGDVEENPGPMAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQ KNDDQQVKQNSPSSLVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWY KKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIV PSQPGDSAVYFCAARGQGNIIFGKGTKLSVKPNIQNPDP VYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKC VLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFF PSPSSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLKLVAGF NLLMTLRLWSS	
TCR-G、α鎖 (アミノ酸配 列)	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSSL VQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIK DKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAARG QGNIIFGKGTKLSVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCL FTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAV AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSF ETDTNLNFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	519
TCR-G、β鎖 (アミノ酸配 列)	MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIKRQSVAF WCNPISGHATLYWYQQILGQGP KLLIQFNNGVVDDSQLP KDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSLYRGEQ YFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVSAVLMLAMVVKRKDSRG	520
TCR-H (β-リンカー- α配置)	MSLGLCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQSMT LLCAQDMNHEMYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGTTAKG EVPDGYNVSRLLKQNFLLGLESAAPSQTSVYFCASRGYHR LNNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLAMVVKRKDSRGG	521

10

20

30

40

50

	GATNFSLLKQAGDVEENPGPMISLRVLLVILWLQLSWVW SGGGSWSHPQFEKGGGSGGGSAGWSHPQFEKQRKEVE QDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFWYRQDCRKEPK LLMSVYSSGNEDGRFTAQLNRASQYISLLIRDSKLSDSATY LCVVKPDPGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPVAVYQLR DSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMR SMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESS CDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMT LRLWSS	
TCR-H、 α 鎖 (アミノ酸配 列)	MISLRVLLVILWLQLSWVWSGGGSWSHPQFEKGGGSGGG SGGSAWSHPQFEKQRKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTY SNSASQSFFWYRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQL NRASQYISLLIRDSKLSDSATYLCVVKPDPGAGSYQLTFGK GTKLSVIPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	522
TCR-H、 β 鎖 (アミノ酸配 列)	MSLGLLCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQSM LLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGTTAKG EVPDGYNVSRLLKQNFLLGLESAAPSQTSVYFCASRGYHR LNNEQFFGPGTRTLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLMAMVKRKDSRG	523

10

20

30

40

50

【0263】

TCRおよび抗体などの可変ドメイン内には相補性決定領域（CDR）が存在する。TCR α およびTCR β の各可変領域には3つのCDRが存在し、各可変領域においてCDR1、CDR2、およびCDR3と命名される。これらのCDRの厳密な境界は、公知の方法に従って規定することができ（例えば、Kabataら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」およびDunbarら、「ANARCI: antigen receptor numbering and receptor classification」を参照）、これにより、可変ドメインだけでなく、3つのCDRを規定する残基境界にも適用できる残基番号付け方式が提供される。他のCDR規定法により、Kabataに基づいたCDRと重複した、且つ、特定の残基もしくは残基群またはCDR全体が抗原結合に有意な影響を与えないという予測または実験結果を踏まえて短縮または延長された、CDRを得ることができる。本明細書におけるCDRは、これらの方法のいずれかに従って規定できる。

【0264】

上記の1または複数の配列は、TRAC、TRBC1、および／またはTRBC2などの遺伝子座に、挿入され得る、例えば、組み込みを受け得る。いくつかの実施形態では、上記の1または複数の遺伝子は、TRAC遺伝子座に、挿入され得る、例えば、組み込みを受け得る。上記の1または複数の遺伝子は、EF-1 α プロモーターなどの異種プロモーターに機能的に連結された形態で、提供され得る。あるいは、上記の1または複数の遺伝子は、組み込み後の内在性プロモーター、例えば、TRACプロモーター、TRBC1プロモーター、またはTRBC2プロモーターから発現されるような構成で提供され得る。

上記の 1 または複数の遺伝子は、自己切断配列によって連結された 2 以上のポリペプチドの翻訳融合体を含み得る。このアプローチは、多鎖受容体（例えば、T 細胞受容体）のコード配列が与えられ、当該受容体の発現を駆動するために単一のプロモーター（内在性が異種性を問わない）を用いることが望まれる場合に、有用となり得る。このようにして、上記プロモーターの活性により、切断を受けて個々の受容体鎖を与えるポリペプチドに翻訳される複数の受容体鎖のアミノ酸を含む連続したコード配列を含む mRNA が得られる。

【0265】

上記の 1 または複数の配列は、適切な手段で送達されてもよく、例えば、トランスフェクション、脂質ナノ粒子、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、またはウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターが使用される。

10

【0266】

IV. 追加の例示的な実施形態

以下の追加の例示的な実施形態が提供される。

実施形態 001.

TRBC1 遺伝子および／または TRBC2 遺伝子内の DNA 配列を改変する方法であって、

組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

20

a. 以下から選択される配列を含むガイド RNA :

i. 配列番号 1 ~ 89 から選択されるガイド配列 ;

ii. 配列番号 1 ~ 89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド ;

iii. 配列番号 1 ~ 89 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列 ;

iv. 配列番号 1 ~ 24 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; および

v. 配列番号 1 ~ 6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; または

30

b. (a.) のガイド RNA をコードする核酸 ; 並びに、所望により

c. RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含む、方法。

実施形態 002.

TRBC1 遺伝子および／または TRBC2 遺伝子の発現を減少させる方法であって、

組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

a. 以下から選択される配列を含むガイド RNA :

i. 配列番号 1 ~ 89 から選択されるガイド配列 ;

ii. 配列番号 1 ~ 89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド ;

40

iii. 配列番号 1 ~ 89 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列 ;

iv. 配列番号 1 ~ 24 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; および

v. 配列番号 1 ~ 6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; または

b. (a.) のガイド RNA をコードする核酸 ; 並びに、所望により

c. RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含む、方法。

50

実施形態 003.

免疫療法の方法であって、

組成物を対象、その自己細胞、および／または同種細胞に投与することを含み、
前記組成物が、

a. 以下から選択される配列を含むガイド RNA :

i. 配列番号 1 ~ 89 から選択されるガイド配列 ;

ii. 配列番号 1 ~ 89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド ;

iii. 配列番号 1 ~ 89 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列 ;

iv. 配列番号 1 ~ 24 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; および

v. 配列番号 1 ~ 6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; または

b. (a.) のガイド RNA をコードする核酸 ; 並びに、所望により

c. RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含む、方法。

実施形態 004.

TRAC 遺伝子内の DNA 配列を改変する方法であって、

組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

a. 以下から選択される配列を含むガイド RNA :

i. 配列番号 90 ~ 178 から選択されるガイド配列 ;

ii. 配列番号 90 ~ 178 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド ;

iii. 配列番号 90 ~ 178 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列 ;

iv. 配列番号 90 ~ 113 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; および

v. 配列番号 90 ~ 95 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; または

b. (a.) のガイド RNA をコードする核酸 ; 並びに、所望により

c. RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含む、方法。

実施形態 005.

TRAC 遺伝子の発現を減少させる方法であって、

組成物を細胞に送達することを含み、

前記組成物は、

a. 以下から選択される配列を含むガイド RNA :

i. 配列番号 90 ~ 178 から選択されるガイド配列 ;

ii. 配列番号 90 ~ 178 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド ;

iii. 配列番号 90 ~ 178 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列 ;

iv. 配列番号 90 ~ 113 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; および

v. 配列番号 90 ~ 95 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; または

b. (a.) のガイド RNA をコードする核酸 ; 並びに、所望により

c. RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、

を含む、方法。

実施形態 006.

免疫療法の方法であって、

組成物を対象、その自己細胞、および／または同種細胞に投与することを含み、

前記組成物が、

a. 以下から選択される配列を含むガイド RNA :

i. 配列番号 90 ~ 178 から選択されるガイド配列 ;

ii. 配列番号 90 ~ 178 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド ;

iii. 配列番号 90 ~ 178 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列 ;

iv. 配列番号 90 ~ 113 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; および

v. 配列番号 90 ~ 95 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; または

b. (a.) のガイド RNA をコードする核酸 ; 並びに、所望により

c. RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含む、方法。

実施形態 007.

TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／または TRAC 遺伝子内の DNA 配列を改変する方法であって、

細胞に、第一ガイド RNA と、第二ガイド RNA と、所望により、RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸と、を送達することを含み、前記第一ガイド RNA が、

i. 配列番号 1 ~ 89 から選択されるガイド配列 ;

ii. 配列番号 1 ~ 89 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド ;

iii. 配列番号 1 ~ 89 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列 ;

iv. 配列番号 1 ~ 24 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; および

v. 配列番号 1 ~ 6 のいずれか 1 つを含むガイド配列、

から選択される配列を含み、

前記第二ガイド RNA が、

i. 配列番号 90 ~ 178 から選択されるガイド配列 ;

ii. 配列番号 90 ~ 178 から選択される配列の少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または少なくとも 20 個の連続ヌクレオチド ;

iii. 配列番号 90 ~ 178 から選択される配列に対して少なくとも 99 %、少なくとも 98 %、少なくとも 97 %、少なくとも 96 %、少なくとも 95 %、少なくとも 94 %、少なくとも 93 %、少なくとも 92 %、少なくとも 91 %、または少なくとも 90 % の同一性を有するガイド配列 ;

iv. 配列番号 90 ~ 113 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列 ; および

v. 配列番号 90 ~ 95 のいずれか 1 つを含むガイド配列、

から選択される配列を含む、方法。

実施形態 008.

TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／または TRAC 遺伝子の発現を減少させる方法であって、

細胞に、第一ガイド RNA と、第二ガイド RNA と、所望により、RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸と、を送達することを含み、

10

20

30

40

50

前記第一ガイドRNAが、

- i. 配列番号1～89から選択されるガイド配列；
 - ii. 配列番号1～89から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド；
 - iii. 配列番号1～89から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列；
 - iv. 配列番号1～24のうちのいずれか1つを含むガイド配列；および
 - v. 配列番号1～6のいずれか1つを含むガイド配列、
- から選択される配列を含み、

10

前記第二ガイドRNAが、

- i. 配列番号90～178から選択されるガイド配列；
 - ii. 配列番号90～178から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド；
 - iii. 配列番号90～178から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列；
 - iv. 配列番号90～113のうちのいずれか1つを含むガイド配列；および
 - v. 配列番号90～95のいずれか1つを含むガイド配列、
- から選択される配列を含む、方法。

20

実施形態009.

免疫療法の方法であって、

組成物を対象、その自己細胞、または同種細胞に投与することを含み、

前記組成物は、第一ガイドRNAと、第二ガイドRNAと、所望により、RNAガイド型DNA結合剤またはRNAガイド型DNA結合剤をコードする核酸とを含み、

前記第一ガイドRNAが、

- i. 配列番号1～89から選択されるガイド配列；
 - ii. 配列番号1～89から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド；
 - iii. 配列番号1～89から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列；
 - iv. 配列番号1～24のうちのいずれか1つを含むガイド配列；および
 - v. 配列番号1～6のいずれか1つを含むガイド配列、
- から選択される配列を含み、

30

前記第二ガイドRNAが、

- i. 配列番号90～178から選択されるガイド配列；
 - ii. 配列番号90～178から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド；
 - iii. 配列番号90～178から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列；
 - iv. 配列番号90～113のうちのいずれか1つを含むガイド配列；および
 - v. 配列番号90～95のいずれか1つを含むガイド配列、
- から選択される配列を含む、方法。

40

実施形態010.

50

RNAガイド型DNA結合剤またはRNAガイド型DNA結合剤をコードする核酸が投与される、実施形態1～9のいずれか一項に記載の方法。

実施形態011.

a. 以下を含むガイドRNA:

i. 配列番号1～89から選択されるガイド配列;または

ii. 配列番号1～89から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド;または

iii. 配列番号1～89から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列;または

iv. 配列番号1～24のうちのいずれか1つを含むガイド配列;または

v. 配列番号1～6のうちのいずれか1つを含むガイド配列;および、所望により

b. RNAガイド型DNA結合剤またはRNAガイド型DNA結合剤をコードする核酸、を含む、組成物。

実施形態012.

細胞におけるTRBC1遺伝子および/またはTRBC2遺伝子内のDNA配列を改変する際に使用される、実施形態11に記載の組成物。

実施形態013.

細胞におけるTRBC1遺伝子および/またはTRBC2遺伝子の発現を導入する際に使用される、実施形態11に記載の組成物。

実施形態014.

a. 以下を含むガイドRNA:

i. 配列番号90～178から選択されるガイド配列;または

ii. 配列番号90～178から選択される配列の少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の連続ヌクレオチド;または

iii. 配列番号90～178から選択される配列に対して少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列;または

iv. 配列番号90～113のうちのいずれか1つを含むガイド配列;または

v. 配列番号90～95のうちのいずれか1つを含むガイド配列;および、所望により

b. RNAガイド型DNA結合剤またはRNAガイド型DNA結合剤をコードする核酸、を含む、組成物。

実施形態015.

細胞におけるTRAC遺伝子内のDNA配列を改変する際に使用される、実施形態14に記載の組成物。

実施形態016.

細胞におけるTRAC遺伝子の発現を減少させる際に使用される、実施形態14に記載の組成物。

実施形態017.

対象の免疫療法で使用される、実施形態11～17のいずれか一項に記載の組成物。

実施形態018.

実施形態1～10のいずれか一項に記載の方法によって改変された、細胞。

実施形態019.

生体外で改変された、実施形態18に記載の細胞。

実施形態020.

T細胞である、実施形態18または実施形態19に記載の細胞。

実施形態021.

CD3⁺、CD4⁺、且つ/またはCD8⁺T細胞である、実施形態18～20のいずれ

10

20

30

40

50

か一項に記載の細胞。

実施形態 022.

哺乳類細胞、霊長類細胞、またはヒト細胞である、実施形態 18～21 のいずれか一項に記載の細胞。

実施形態 023.

対象の免疫療法で使用される、実施形態 18～21 のいずれか一項に記載の細胞。

実施形態 024.

a. 細胞および／もしくは対象における T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／もしくは T R A C 遺伝子内に二本鎖切断 (D S B) を導入すること；または

b. 細胞および／もしくは対象における T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／もしくは T R A C 遺伝子内に一本鎖切断 (S S B) を導入すること；または

c. 細胞および／もしくは対象における T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／もしくは T R A C 遺伝子の発現を減少させること、

をさらに含む、実施形態 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

実施形態 025.

前記組成物が T R B C 1 遺伝子および／または T R B C 2 遺伝子の編集をもたらす、実施形態 1～3、実施形態 7～13 のいずれかで使用される方法または組成物。

実施形態 026.

前記組成物が T R A C 遺伝子の編集をもたらす、実施形態 4～10 および実施形態 14～17 のいずれかで使用される方法または組成物。

実施形態 027.

前記組成物が T R B C 遺伝子および T R A C 遺伝子の編集をもたらす、実施形態 7～10 のいずれかで使用される方法または組成物。

実施形態 028.

前記編集が編集された集団の割合として算出される（編集率またはインデル率）、実施形態 25～27 のいずれかで使用される方法または組成物。

実施形態 029.

前記編集率が前記集団の 10～100% であり、例えば前記集団の 30～99% である、実施形態 25～28 のいずれかで使用される方法または組成物。

実施形態 030.

前記編集率が、前記集団の 30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または 95～99% である、実施形態 25～29 のいずれかで使用される方法または組成物。

実施形態 031.

前記組成物が、

a. 配列番号 179～184 のうちのいずれか 1 つ；または

b. 配列番号 1～89 のうちのいずれか 1 つから選択されるガイド配列；または

c. 配列番号 1～24 から選択されるガイド配列；または

d. 配列番号 1～6 から選択されるガイド配列、

を含む s g R N A を含む、実施形態 1～3、7～13、17、および 24～30 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 032.

前記組成物が、

a. 配列番号 90～178 のうちのいずれか 1 つから選択されるガイド配列；または

b. 配列番号 90～113 から選択されるガイド配列；または

c. 配列番号 90～95 から選択されるガイド配列、

を含む s g R N A を含む、実施形態 4～10、14～17、および 24～30 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 033.

前記標的配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子の第 1 エクソン、第 2 エクソン、第 3 エクソン、または第 4 エクソン内の配列である、実施形態 1 ～ 1 7 および 2 4 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 3 4 .

前記標的配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の第 1 エクソン内の配列である、実施形態 3 3 に記載の方法または組成物。

実施形態 0 3 5 .

前記標的配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の第 2 エクソン内の配列である、実施形態 3 3 に記載の方法または組成物。

実施形態 0 3 6 .

前記標的配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の第 3 エクソン内の配列である、実施形態 3 3 に記載の方法または組成物。

実施形態 0 3 7 .

前記標的配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子の第 4 エクソン内の配列である、実施形態 3 3 に記載の方法または組成物。

実施形態 0 3 8 .

前記標的配列がヒト T R B C 1 遺伝子、ヒト T R B C 2 遺伝子および／またはヒト T R A C 遺伝子内の配列である、実施形態 3 3 ～ 3 7 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 3 9 .

前記ガイド配列が T R B C 1、T R B C 2、および／または T R A C のプラス鎖内の標的配列に対して相補的である、実施形態 1 ～ 1 7 または 2 4 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 4 0 .

前記ガイド配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子、および／または T R A C 遺伝子のマイナス鎖内の標的配列に対して相補的である、実施形態 1 ～ 1 7 または 2 4 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 4 1 .

前記第一ガイド配列が T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子のプラス鎖内の第一標的配列に対して相補的であり、前記組成物は T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子のマイナス鎖内の第二標的配列に対して相補的な第二ガイド配列をさらに含む、実施形態 1 ～ 1 7 または 2 4 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 4 2 .

前記ガイド R N A が配列番号 1 ～ 1 7 8 のいずれか 1 つから選択されるガイド配列を含み、且つ、配列番号 2 0 0 のヌクレオチド配列をさらに含み、前記配列番号 2 0 0 のヌクレオチドは前記ガイド配列の 3 ' 末端の後に続いている、実施形態 1 ～ 1 7 または 2 4 ～ 4 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 4 3 .

前記ガイド R N A が配列番号 1 ～ 1 7 8 のいずれか 1 つから選択されるガイド配列を含み、且つ、配列番号 2 0 1 のヌクレオチド配列をさらに含み、前記配列番号 2 0 1 のヌクレオチドは前記ガイド配列の 3 ' 末端の後に続いている、実施形態 1 ～ 1 7 または 2 4 ～ 4 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 4 4 .

前記ガイド R N A が配列番号 3 0 0 のパターンに従って改変されており、N が、まとめて、表 1 のガイド配列（配列番号 1 ～ 8 9）のいずれか 1 つである、実施形態 1 ～ 1 7 または 2 4 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 4 5 .

配列番号 3 0 0 内の各 N が任意の天然ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチドであり、前記 N がガイド配列を形成し、前記ガイド配列が C a s 9 を T R B C 1 遺伝子、T R B C 2

10

20

30

40

50

遺伝子および／または T R A C 遺伝子に標的化する、実施形態 4 4 に記載の方法または組成物。

実施形態 0 4 6 .

前記 s g R N A が配列番号 1 ～ 8 9 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 1 %、または少なくとも 9 0 % の同一性を有するガイド配列を含む、実施形態 4 2 ～ 4 4 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 4 7 .

前記ガイド R N A が少なくとも 1 つの修飾を含む、実施形態 1 ～ 1 7 または 2 4 ～ 4 6 のいずれか一項に記載の方法または組成物。 10

実施形態 0 4 8 .

前記少なくとも 1 つの修飾が 2' - O - メチル (2' - O - M e) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 4 7 に記載の方法または組成物。

実施形態 0 4 9 .

ヌクレオチド同士のホスホロチオエート (P S) 結合を含む、実施形態 4 7 または実施形態 4 8 に記載の方法または組成物。

実施形態 0 5 0 .

2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 4 7 ～ 4 9 のいずれか一項に記載の方法または組成物。 20

実施形態 0 5 1 .

前記ガイド R N A の 5' 末端の最初の 5 個のヌクレオチドの 1 または複数に修飾を含む、実施形態 4 7 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 5 2 .

前記ガイド R N A の 3' 末端の最後の 5 個のヌクレオチドの 1 または複数に修飾を含む、実施形態 4 7 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 5 3 .

前記ガイド R N A の最初の 4 個のヌクレオチドの間に P S 結合を含む、実施形態 4 7 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 5 4 .

前記ガイド R N A の最後の 4 個のヌクレオチドの間に P S 結合を含む、実施形態 4 7 ～ 5 3 のいずれか一項に記載の方法または組成物。 30

実施形態 0 5 5 .

前記ガイド R N A の 5' 末端の最初の 3 個のヌクレオチドに 2' - O - M e 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 4 7 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 5 6 .

前記ガイド R N A の 3' 末端の最後の 3 個のヌクレオチドに 2' - O - M e 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 4 7 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 5 7 .

前記ガイド R N A が配列番号 3 0 0 の修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 4 7 ～ 5 6 のいずれか一項に記載の方法または組成物。 40

実施形態 0 5 8 .

前記組成物が薬剤的に許容できる医薬品添加物をさらに含む、実施形態 1 ～ 1 7 または 2 4 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 5 9 .

前記ガイド R N A が脂質ナノ粒子 (L N P) と結び付けられている、実施形態 1 ～ 5 8 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 0 6 0 .

前記 L N P が生分解性のイオン性脂質を含む、実施形態 5 9 に記載の方法または組成物。

実施形態 0 6 1 .

前記イオン性脂質が(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアート、別名3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエノアートである、実施形態60に記載の方法または組成物。

実施形態062.

前記LNPが中性脂質を含む、実施形態59~61のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態063.

前記中性脂質がDSPCである、実施形態62に記載の方法または組成物。

実施形態064.

前記LNPがヘルパー脂質を含む、実施形態59~63のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態065.

前記ヘルパー脂質がコレステロールである、実施形態64に記載の方法または組成物。

実施形態066.

前記LNPがステルス脂質(*stealth lipid*)を含む、実施形態59~65のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態067.

前記ステルス脂質がPEG2k-DMGである、実施形態66に記載の方法または組成物。

実施形態068.

前記組成物がRNAガイド型DNA結合剤をさらに含む、実施形態1~17または24~66のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態069.

前記組成物がRNAガイド型DNA結合剤をコードするmRNAをさらに含む、実施形態1~17または24~68のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態070.

前記RNAガイド型DNA結合剤がCas9である、実施形態68または実施形態69に記載の方法または組成物。

実施形態071.

前記組成物が医薬製剤であり、薬剂的に許容できる担体をさらに含む、実施形態1~17または24~70のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態072.

配列番号1~89から選択される前記配列が配列番号1である、実施形態1~3、7~13、17、24、25、27~31、または33~71のいずれか一項に記載の方法、組成物、または細胞。

実施形態073.

配列番号1~89から選択される前記配列が配列番号2である、実施形態1~3、7~13、17、24、25、27~31、または33~71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態074.

配列番号1~89から選択される前記配列が配列番号3である、実施形態1~3、7~13、17、24、25、27~31、または33~71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態075.

配列番号1~89から選択される前記配列が配列番号4である、実施形態1~3、7~13、17、24、25、27~31、または33~71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

20

30

40

50

実施形態 076.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 5 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 077.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 6 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 078.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 7 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

実施形態 079.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 8 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 080.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 9 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

20

実施形態 081.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 10 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 082.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 11 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 083.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 12 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

30

実施形態 084.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 13 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 085.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 14 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

40

実施形態 086.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 15 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 087.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 16 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 088.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 17 である、実施形態 1～3、7～

50

13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態089.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号18である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態090.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号19である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態091.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号20である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態092.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号21である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態093.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号22である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態094.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号23である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態095.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号24である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態096.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号25である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態097.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号26である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態098.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号27である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態099.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号28である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態100.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号29である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

20

30

40

50

実施形態 101.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 30 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 102.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 31 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 103.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 32 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

実施形態 104.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 33 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 105.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 34 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

20

実施形態 106.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 35 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 107.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 36 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 108.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 37 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

30

実施形態 109.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 38 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 110.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 39 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

40

実施形態 111.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 40 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 112.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 41 である、実施形態 1～3、7～13、17、24、25、27～31、または 33～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 113.

配列番号 1～89 から選択される前記配列が配列番号 42 である、実施形態 1～3、7～

50

13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態114.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号43である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態115.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号44である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態116.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号45である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態117.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号46である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態118.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号47である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態119.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号48である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態120.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号49である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態121.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号50である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態122.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号51である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態123.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号52である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態124.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号53である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態125.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号54である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

20

30

40

50

実施形態 1 2 6 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 5 5 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 2 7 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 5 6 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 2 8 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 5 7 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 2 9 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 5 8 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 3 0 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 5 9 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 3 1 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 6 0 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 3 2 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 6 1 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 3 3 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 6 2 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 3 4 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 6 3 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 3 5 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 6 4 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 3 6 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 6 5 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 3 7 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 6 6 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 3 8 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 6 7 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～

10

20

30

40

50

13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態139.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号68である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態140.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号69である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態141.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号70である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態142.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号71である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態143.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号72である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態144.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号73である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態145.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号74である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態146.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号75である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態147.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号76である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態148.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号77である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態149.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号78である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態150.

配列番号1～89から選択される前記配列が配列番号79である、実施形態1～3、7～13、17、24、25、27～31、または33～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

20

30

40

50

実施形態 1 5 1 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 8 0 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 5 2 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 8 1 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 5 3 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 8 2 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 5 4 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 8 3 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 5 5 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 8 4 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 5 6 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 8 5 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 5 7 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 8 6 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 5 8 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 8 7 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 5 9 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 8 8 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 6 0 .

配列番号 1 ～ 8 9 から選択される前記配列が配列番号 8 9 である、実施形態 1 ～ 3、7 ～ 1 3、1 7、2 4、2 5、2 7 ～ 3 1、または 3 3 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 6 1 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 9 0 である、実施形態 4 ～ 1 0、1 4 ～ 1 7、2 4、2 6 ～ 3 0、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 6 2 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 9 1 である、実施形態 4 ～ 1 0、1 4 ～ 1 7、2 4、2 6 ～ 3 0、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 1 6 3 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 9 2 である、実施形態 4 ～ 1 0

10

20

30

40

50

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 104 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 176.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 105 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 177.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 106 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 178.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 107 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

実施形態 179.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 108 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 180.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 109 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

20

実施形態 181.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 110 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 182.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 111 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 183.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 112 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

30

実施形態 184.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 113 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 185.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 114 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

40

実施形態 186.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 115 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 187.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 116 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 188.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 117 である、実施形態 4～1

50

0、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態189.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号118である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態190.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号119である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態191.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号120である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態192.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号121である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態193.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号122である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態194.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号123である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態195.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号124である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態196.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号125である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態197.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号126である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態198.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号127である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態199.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号128である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態200.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号129である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

20

30

40

50

実施形態 201.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 130 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 202.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 131 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 203.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 132 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

実施形態 204.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 133 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 205.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 134 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

20

実施形態 206.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 135 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 207.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 136 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 208.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 137 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

30

実施形態 209.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 138 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 210.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 139 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

40

実施形態 211.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 140 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 212.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 141 である、実施形態 4～10、14～17、24、26～30、または 32～71 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 213.

配列番号 90～178 から選択される前記配列が配列番号 142 である、実施形態 4～1

50

0、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態214.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号143である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態215.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号144である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態216.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号145である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態217.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号146である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態218.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号147である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態219.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号148である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態220.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号149である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態221.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号150である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態222.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号151である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態223.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号152である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態224.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号153である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態225.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号154である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

20

30

40

50

実施形態 2 2 6 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 5 5 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 2 2 7 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 5 6 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 2 2 8 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 5 7 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

10

実施形態 2 2 9 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 5 8 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 2 3 0 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 5 9 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

20

実施形態 2 3 1 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 6 0 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 2 3 2 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 6 1 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 2 3 3 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 6 2 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

30

実施形態 2 3 4 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 6 3 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 2 3 5 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 6 4 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

40

実施形態 2 3 6 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 6 5 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 2 3 7 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 6 6 である、実施形態 4 ～ 1 0 、 1 4 ～ 1 7 、 2 4 、 2 6 ～ 3 0 、または 3 2 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態 2 3 8 .

配列番号 9 0 ～ 1 7 8 から選択される前記配列が配列番号 1 6 7 である、実施形態 4 ～ 1

50

0、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態239.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号168である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態240.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号169である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態241.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号170である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態242.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号171である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態243.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号172である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態244.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号173である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態245.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号174である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態246.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号175である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態247.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号176である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態248.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号177である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態249.

配列番号90～178から選択される前記配列が配列番号178である、実施形態4～10、14～17、24、26～30、または32～71のいずれか一項に記載の方法または組成物。

実施形態250.

医薬の調製のための、実施形態1～249のいずれか一項に記載の組成物、製剤、または細胞の使用。

実施形態251.

10

20

30

40

50

医薬として使用される、実施形態 1 ～ 2 5 0 のいずれか一項に記載の組成物、製剤、または細胞。

実施形態 2 5 2 .

内在性 T 細胞受容体を欠損している、非内在性 T 細胞受容体を発現する T 細胞を作製するための、実施形態 1 8 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の細胞。

実施形態 2 5 3 .

内在性 T 細胞受容体を欠損している、C A R を発現する T 細胞を作製するための、実施形態 1 8 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の細胞。

実施形態 2 5 4 .

改変後に C D 3 - 細胞となる、実施形態 1 8 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の細胞。

10

実施形態 2 5 5 .

改変前は C D 3 + 細胞であり、改変後は C D 3 - 細胞となる、実施形態 1 8 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の細胞。

実施形態 2 5 6 .

実施形態 1 8 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞集団であって、改変後集団の約 5 0 % 超、約 5 5 % 超、約 6 0 % 超、約 6 5 % 超、約 7 0 % 超、約 7 5 % 超、約 8 0 % 超、約 8 5 % 超、約 9 0 % 超、約 9 5 % 超、約 9 8 % 超、または約 9 9 % 超が C D 3 - 細胞である、細胞集団。

実施形態 2 5 7 .

前記集団の約 9 0 % 超が C D 3 - である、実施形態 2 5 6 に記載の集団。

20

実施形態 2 5 8 .

前記集団の約 9 5 % 超が C D 3 - である、実施形態 2 5 6 に記載の集団。

実施形態 2 5 9 .

前記集団の約 9 9 % 超が C D 3 - である、実施形態 2 5 6 に記載の集団。

実施形態 2 6 0 .

実施形態 1 8 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞集団であって、集団の約 5 0 % 超、約 5 5 % 超、約 6 0 % 超、約 6 5 % 超、約 7 0 % 超、約 7 5 % 超、約 8 0 % 超、約 8 5 % 超、約 9 0 % 超、約 9 5 % 超、約 9 8 % 超、または約 9 9 % 超が内在性 T 細胞受容体を欠失している、細胞集団。

実施形態 2 6 1 .

集団の約 9 0 % 超が内在性 T 細胞受容体を欠失している、実施形態 2 6 0 に記載の集団。

30

実施形態 2 6 2 .

集団の約 9 5 % 超が内在性 T 細胞受容体を欠失している、実施形態 2 6 0 に記載の集団。

実施形態 2 6 3 .

集団の約 9 9 % 超が内在性 T 細胞受容体を欠失している、実施形態 2 6 0 に記載の集団。

実施形態 2 6 4 .

集団における T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子の発現が、未改変の同一細胞集団と比較して、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % 減少している、実施形態 1 8 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞集団。

40

実施形態 2 6 5 .

T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子の発現の減少が少なくとも約 9 0 % である、実施形態 2 6 4 に記載の集団。

実施形態 2 6 6 .

T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子の発現の減少が少なくとも約 9 5 % である、実施形態 2 6 4 に記載の集団。

実施形態 2 6 7 .

T R B C 1 遺伝子、T R B C 2 遺伝子および／または T R A C 遺伝子の発現の減少が少な

50

くとも約 99% である、実施形態 264 に記載の集団。

実施形態 268。

前記減少が TRBC1 遺伝子の発現の減少である、実施形態 264～267 のいずれか一項に記載の集団。

実施形態 269。

前記減少が TRBC2 遺伝子の発現の減少である、実施形態 264～267 のいずれか一項に記載の集団。

実施形態 270。

前記減少が TRAC 遺伝子の発現の減少である、実施形態 264～267 のいずれか一項に記載の集団。

実施形態 271。

実施形態 18～23 のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞集団であって、前記集団の 10～100%、例えば前記集団の 30～99% が、TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／または TRAC 遺伝子にインデルを有する、細胞集団。

実施形態 272。

前記集団の 30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または 95～99% が TRBC1 遺伝子、TRBC2 遺伝子および／または TRAC 遺伝子にインデルを有する、実施形態 271 に記載の集団。

実施形態 273。

前記インデルが TRBC1 遺伝子におけるものである、実施形態 271 または実施形態 272 に記載の集団。

実施形態 274。

前記インデルが TRBC2 遺伝子におけるものである、実施形態 271 または実施形態 272 に記載の集団。

実施形態 275。

前記インデルが TRAC 遺伝子におけるものである、実施形態 271 または実施形態 272 に記載の集団。

【0267】

この説明および例示的な実施形態は限定するものと見なされるべきではない。本明細書および特許請求の範囲で使用されている、量、割合、または比率を表す全ての数字、およびその他の数値は、特に記載のない限り、すべての場合において、用語「約」によって、そのように修飾されていない程度まで、修飾されていると理解されるべきである。従って、特に記載のない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に記載されている数値パラメータは近似値であり、得ようとする所望の特性に応じて変化する可能性がある。少なくとも、また、特許請求の範囲への均等論の適用を限定しようとするものとしてではなく、各数値パラメータは少なくとも、報告された有効数字を考慮し、通常の丸め法を適用して解釈されるべきである。

【0268】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられているように、単数形の「a」、「an」、「the」、並びに任意の単語のいかなる単数形の使用も、明示的かつ明解に 1 つの参照対象に限定されない限り、複数の参照対象を包含することに留意されたい。本明細書で 사용되는場合、用語「包含する (include)」およびその文法上の変形語は、非限定的であることを意図しており、列挙内の項目の記載は、列挙された項目に置換または追加できる他の同様の項目を除外するものではない。

【実施例】

【0269】

以下の実施例は開示されたある特定の実施形態を説明するために提供されており、本開示の範囲を何ら限定するものではない。

10

20

30

40

50

【0270】

実施例1：材料および方法

ゲノムDNAの単離

HEK293__Cas9トランスフェクト細胞をトランスフェクション後24時間の時点で回収した。50μL／ウェルのQuickExtract（商標）DNA Extraction Solution（ルシジェン社（Lucigen）、カタログ番号QE09050）を製造業者のプロトコルに従って用いて、96ウェルプレートの各ウェルからgDNAを抽出した。本明細書に記載されているように、DNA試料をPCRにかけた後、NGS解析を行った。

【0271】

次世代シーケンス（「NGS」）およびオンターゲット切断効率解析

ゲノム内の標的位置における編集の効率を定量するため、ディープシーケンスを利用して、遺伝子編集で導入された挿入および欠失の存在を特定した。目的遺伝子（例えばTRAC）内の標的部位の周辺にPCRプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅した。プライマーの配列設計は当該分野における標準法の通りに行った。

【0272】

シーケンス用の化学的性質を付加するため、製造業者（イルミナ社（Illumina））のプロトコルに従って追加のPCRを行った。アンプリコンをイルミナ社製MiSeq装置でシーケンスした。品質スコアが低いものを除いた後、リードをヒト参照ゲノム（例えば、hg38）に対してアラインメントした。目的の標的領域と重複したリードを選択し、野生型リードの数対挿入または欠失（「インデル」）を含むリードの数を計算した。

【0273】

編集率（例えば、「編集効率」または「インデル率」）は、挿入または欠失（「インデル」）を有する配列リードの総数／野生型を含む配列リードの総数と定義される。

【0274】

実施例2：TRACガイドの設計およびHEK細胞におけるスクリーニング

ヒトTRACガイドの設計

ヒト参照ゲノム（例えば、hg38）およびユーザー定義の目的ゲノム領域（例えば、TRACタンパク質をコードするエクソン）を用いてコンピュータ上で最初のガイド選別を行い、目的領域内のPAMの特定を行った。特定されたそれぞれのPAMについて、解析を行い、統計を報告した。当該技術分野において公知のいくつかの評価基準（例えば、GC含量、予想オンターゲット活性、およびオフターゲット活性の可能性）に基づいて、gRNA分子のさらなる選別と順位付けを行った。

【0275】

TRAC（ENSG00000277734）に対して、当該タンパク質のエクソンコード領域およびイントロン1を標的とする、合計88種のガイドRNAが設計された。ガイド配列および対応するゲノムコーディネートを示す（表2）。

【0276】

ガイドを、HEK293__Cas9細胞における編集効率に基づいてスクリーニングした。Spy Cas9を恒常的に発現するヒト胚腎臓腺癌細胞株HEK293（「HEK293__Cas9」）を、10%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地中で培養した。細胞を96ウェルプレートに10,000細胞／ウェルの密度で播種し、約24時間後にトランスフェクションを行った（トランスフェクションの時点で約70%コンフルエント）。細胞のトランスフェクションは、デュプリケートで、Lipofectamine RNAiMAX（サーモフィッシャー社（ThermoFisher）、カタログ番号13778150）を製造業者のプロトコルに従って用いて行った。個々のガイド（25nM）、trRNA（25nM）、Lipofectamine RNAiMAX（0.3μL／ウェル）、およびOptiMemを含有するリポプレックスを用いて、細胞をトランスフェクトした。DNA単離およびNGS解析を実施例1に記載の通りに行った。図1および表5に、HEK293__Cas9細胞におけるこれらのガイドによるTRAC遺伝子

10

20

30

40

50

座でのインデル率を示す。

【 0 2 7 7 】

【表 5】

表 5 : HEK 2 9 3 __C a s 9 細胞におけるTRACガイド編集

配列番号	インデル率(平均値)	SD	配列番号	インデル率(平均値)	SD
90	53.1	13	135	0.7	0.3
91	51.9	5.2	136	0.1	0.1
92	29.8	15.8	137	0.1	0.1
93	35.1	16.1	138	0.5	0.2
94	55.4	9	139	0.5	0.1
96	6.6	2.3	140	0.3	0.1
97	35.3	9.8	141	0.1	0
98	15.6	4.2	142	0.4	0.1
99	32	9.5	143	0.4	0.1
100	40	14.3	144	1.3	0.8
101	17	4.1	145	0.2	0.1
102	32.9	7.8	146	0.1	0
103	24.8	3.1	147	0.1	0.1
104	47.2	15.7	148	2.5	1.2
105	34.7	13.9	149	3	1
106	27.4	3.8	150	0.2	0.1
107	54.9	17.8	151	0.7	0.4
108	28.2	7.9	152	0.2	0.1
109	54.4	14	153	0.7	0.1
110	52.9	9.5	154	0.3	0.1
111	22.6	5	155	0.1	0.1
112	46.8	15.3	156	0.1	0
113	41.6	10.8	157	0.1	0.1
114	0.4	0.1	158	0.1	0.1
115	26.4	9.4	159	0.2	0.1
116	22.8	3.3	160	0.1	0
117	8.9	1.8	161	0.7	0.2
118	0	0	162	0.1	0.1
119	5.3	1.1	163	0.7	0
120	0.4	0.1	164	0.1	0

10

20

30

40

50

121	0.2	0.1	165	0	0
122	1.2	0.6	166	0.3	0
123	2.2	0.4	167	0.3	0.3
124	0.3	0.1	168	0.1	0.1
125	0.1	0	169	0.5	0.2
126	0.1	0.1	170	0.2	0.1
127	0	0	171	0.2	0.1
128	0.4	0.4	172	0.2	0.1
129	1.1	0.3	173	0	0
130	1.6	0.7	174	0.1	0
131	0.2	0.1	175	0.1	0.1
132	0.4	0.1	176	0.1	0
133	2.5	0.5	177	0.1	0.1
134	0.5	0.2	178	0.1	0

10

20

30

40

50

【0278】

実施例3：ヒトCD3＋T細胞におけるTRACガイドのスクリーニング

【0279】

実施例2から得られたHEK293__Cas9細胞におけるインデル編集率が最も高かった24種のガイドを、ヒトCD3＋T細胞における編集効率およびT細胞受容体（TCR）ノックダウンに基づいてスクリーニングした。CD3＋T細胞は、CD4＋ヘルパーT細胞およびCD8＋細胞傷害性T細胞を含む複数のT細胞集団から構成される。これらの細胞は、全血または白血球アフェレーション試料から単離することができる。T細胞は、Cas9を介した編集を用いて親T細胞を操作することによって、がん性細胞を特異的に標的とするように、且つ、免疫原性が低くなるように、改変することができる。本実施例では、T細胞において、Cas9 RNP（例えば、TRACを標的とするCas9 RNP）を送達するために使用された基本的な方法が説明される。本プロトコルを異なるT細胞標的（例えば、本明細書で提供されたもののいずれか）に適合させるためには、RNPのターゲティング用crRNAだけを変更すればよい。

【0280】

T細胞へのRNPの送達

T細胞は、市販品（例えば、Human Peripheral Blood CD4＋CD45RA＋T Cells, Frozen、ステム・セル・テクノロジー社（Stem Cell Technology）、カタログ番号70029）を入手するか、または社内でLeukopakから調製した。社内の調製については、まず、市販キット（例えば、EasySep（商標）Human T Cell Isolation Kit、ステム・セル・テクノロジー社）を用いて、T細胞をLeukopakから濃縮した。濃縮したT細胞は、さらなる使用に向けて、分注して凍結（ 5×10^6 個／バイアル）した。後に、必要に応じてバイアルを解凍し、T細胞培地（RPMI1640、FBS、L-グルタミン、可欠アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、HEPES緩衝液、2-メルカプトエタノール、および所望によりIL2）中に3：1比のCD3／CD28ビーズ（

Dynabeads、ライフテクノロジーズ社）を添加することで活性化した。RNPは、等量の試薬を混合し、95℃で2分間インキュベートし、室温に冷却することで、個々のcrRNAとtrRNAとをプレアニールすることにより作製した。プレアニールされたcrRNAとtrRNAとからなるデュアルガイド（dgRNA）を、Spy Cas 9タンパク質とインキュベートすることで、リボ核タンパク質（RNP）複合体を形成させた。Spy Cas 9（10 nM）、個々のガイド（10 nM）、およびトレーサーRNA（10 nM）を含有するRNPを、P3 Primary Cell 96-well Nucleofector（商標）Kit（ロンザ社（Lonza）、カタログ番号V4SP-3960）を用い、当該製造業者のAmaxa（商標）96-well Shuttle（商標）Protocol for Stimulated Human T Cellsを用いてヌクレオフェクションすることにより、CD3+T細胞をトリプリケートでトランスフェクトした。ヌクレオフェクション後すぐにT細胞用培地を細胞に加え、2日間以上培養した。

10

【0281】

ヌクレオフェクションの2日後、実施例1に記載の通りにゲノムDNAを調製し、NGS解析を行った。表6および図2は、CD3+T細胞における各種ガイドによるTRAC編集後のインデル頻度に関する結果を示している。

【0282】

20

30

40

50

【表 6】

表 6：ヒト CD3⁺T 細胞における TRAC 編集の場合のインデル頻度

配列番号	インデル頻度	標準偏差	サンプル数(n)
90	79.3%	1.5%	3
91	86.9%	1.2%	3
92	79.0%	1.9%	3
93	82.6%	1.4%	3
96	0.7%	0.1%	3
97	55.2%	3.1%	3
98	15.5%	1.0%	3
99	27.9%	0.9%	3
100	57.7%	3.0%	3
101	26.2%	0.8%	3
102	31.2%	0.8%	3
103	58.1%	1.8%	3
104	62.0%	2.8%	3
105	47.8%	2.0%	3
106	52.0%	2.7%	3
108	27.7%	1.9%	3
109	72.7%	3.7%	3
110	33.0%	2.2%	3
111	36.9%	1.3%	3
112	76.7%	1.0%	3
113	65.7%	4.3%	3

10

20

30

【0283】

TCR 発現のフローサイトメトリー分析

ヌクレオフェクションの 4 日後に、TCR の発現を測定した。細胞を固定化能な生死判定用色素（サーモフィッシャー社 L34975）で染色し、TCR を Alexa Fluor（登録商標）647 anti-human TCR α/β Antibody（バイオレジェンド社（BioLegend）、カタログ番号 306714）を用いて検出した。細胞を 2 μ l の抗体と少なくとも 20 分間氷上でインキュベートし、ベックマン・コールター社（Beckman Coulter）製 Cytotflex S などを用いたフローサイトメトリーで解析した。データは Flow Jo ソフトウェアを用いて解析した。生細胞集団を TCR 減少について解析した。結果を表 7 および図 3 に示す。

40

【0284】

50

【表 7】

表 7 : CD3⁺T細胞におけるTRAC編集後のTCR発現

配列番号	ドナー1-TCR陰性の割合	ドナー1-標準偏差	ドナー2-TCR陰性の割合	ドナー2-標準偏差
90	80.2	19.5	84.9	3.6
91	95.3	1.4	80.7	20.5
92	93.5	0.3	87.6	3.4
93	95.9	0.6	91.7	5
94	73.5	28.3	90.2	2.1
96	3.6	0.8	1.8	0.4
97	59.9	0.9	51.3	0.4
98	17.9	1.1	11.5	1.2
99	32.9	1.1	30.4	2.3
100	61.4	1.7	55.8	3.4
101	28.8	1.3	24.6	2
102	28.7	0.5	20.7	1
103	58.2	6.4	41.6	0.4
104	68	5.7	58	3.2
105	46.8	3.3	46.2	1.5
106	58	1.6	51.6	1.7
107	62.3	4.6	62.2	0.9
108	3.3	0.3	2.6	0.4
109	4.5	0.5	4.2	0.5
110	33.1	2.5	35.1	10.9
111	5.1	0.1	3.7	0.3
112	10.5	0.2	17.7	12.3
113	6.3	0.7	5.7	1
116	19.3	1.5	13.7	0.4

10

20

30

40

【0285】

実施例 4 : TRBCガイドの設計およびHEK細胞におけるスクリーニング

ヒトTRBCガイドの設計

ヒトTRBC1 (ENSG00000211751) およびTRBC2 (ENSG00000211772) を編集するための最初のガイド選別は、実施例 2 に記載の通りとした。合計 89 種のガイドRNAを設計した：TRBC1のみを標的とする 2 種（配列番号 11 および配列番号 26）、TRBC2のみを標的とする 2 種（配列番号 8）、並びにTRBC1およびTRBC2の両方を標的とする 86 種。ガイドはタンパク質エクソンコード領域を標的とするように設計した。ガイドおよび対応するゲノムコーディネートは上記の

50

通りである（表 1）。

【 0 2 8 6 】

TRBCガイドを、HEK293_Cas9細胞における編集効率に基づいてスクリーニングした。トランスフェクションを実施例2に記載の通りに行った。DNA単離およびNGS解析を実施例1に記載の通りに行った。図4Aおよび図4B、並びに表8に、HEK293_Cas9細胞におけるこれらのガイドによるTRBC1遺伝子座およびTRBC2遺伝子座でのインデル率を示す。

【 0 2 8 7 】

【表 8】

表 8 : HEK293_Cas9細胞におけるTRBCガイド編集

配列 番号	TRBC1 平均イ ンデル率	TRBC1 SD	数値の 数(n)	TRBC2 平均イ ンデル率	TRBC2 SD	数値の 数(n)
1	22.7	4.8	3	28.0	5.9	3
2	50.6	2.9	3	56.9	3.1	3
3	28.7	3.5	3	41.9	4	3
4	53.4	8.6	3	34.4	NA	1
5	33.9	7.7	3	29.5	7.1	3
6	54.8	8	3	48.7	7.7	3
7	47.3	4	3	43.9	3.8	3
8	30.2	3.5	3	38.6	2.5	3
9	29.5	6.4	3	30	6.5	3
10	31.5	4.6	3	41.7	5.9	3
11	38.4	9.7	3	2.6	0.8	3
12	29.6	5	3	28.1	6	3
13	61.7	4.9	3	65.7	4.4	3
14	31.5	7.8	3	38.3	8	3
15	24.2	7.5	3	31.7	10.3	3
16	33	2.6	3	34.9	3.2	3
17	37.4	9.3	3	32.3	8.2	3
18	43	9.4	3	37.6	7.9	3
19	22.2	8.6	3	30.2	9.3	3
20	38.7	8.9	3	48.5	10.4	3
21	40.9	5	3	31.3	3.6	3
22	33.1	7.5	3	28.3	7.4	3
23	36.4	2.2	3	22.7	0.8	3
24	32.6	4.2	3	29.5	3.8	3
26	22.5	2.6	3	2.9	0.3	3
27	3.7	0.2	3	3.2	0.3	3
28	0.1	0	3	0.1	0.1	3
29	0.3	0.1	3	0.4	0.2	3
30	0.2	0.1	3	0.3	0.2	3

10

20

30

40

50

31	0.1	0	3	0.2	0.1	3
32	0.2	0.1	3	0.2	0.1	3
33	0.4	0.1	3	0.2	0.1	3
34	0.4	0.1	3	0.3	0.1	3
35	0	0.1	3	0.1	0.1	3
36	0.3	0.1	3	0.3	0.1	3
37	0.8	0.1	3	0.5	0.2	3
38	0.3	0.1	3	0.3	0.1	3
39	2.2	0.4	3	2.2	0.4	3
40	0.1	0.1	3	0.2	0.1	3
41	0.1	0	3	0.2	0.1	3
42	0.1	0.1	3	0.2	0.1	3
43	0.2	0	3	0.1	0.1	3
44	0.2	0	3	0.3	0.1	3
45	0.1	0.1	3	0.1	0	3
46	0.1	0	3	0.1	0	3
47	0.1	0	3	0.2	0.1	3
48	0.2	0.2	3	0.3	0.1	3
49	0.1	0	3	0.1	0	3
50	0.3	0.1	3	0.2	0.1	3
51	0.4	0.1	3	0.4	0.1	3
52	0.2	0.1	3	0.1	0.1	3
53	1.6	0.2	3	1.8	0.2	3
54	0.2	0.1	3	0.3	0.1	3
55	0.1	0.1	3	0	NA	1
56	0.2	0.1	3	0.4	0.1	3
57	0.1	0	3	0.1	0	3
58	5.8	1.3	3	5	1.1	3
59	0.3	0.1	3	0.2	0.1	3
60	0.3	0.1	3	0.2	0.1	3
61	1	0.2	3	1.6	0.3	3
62	1.7	0.3	3	2.2	0.2	3
63	0.3	0.1	3	0.3	0.1	3

10

20

30

40

50

64	0.2	0.1	3	0.3	0.1	3
65	0.2	0	3	0.2	0	3
66	0.1	0.1	3	0.2	0.1	3
67	0.1	0	3	0.1	0.1	3
68	0.7	0.2	3	0.6	0.1	3
69	0	0.1	3	0.1	0.1	3
70	0.1	0.1	3	0.1	0.1	3
71	18.9	5.1	3	24.2	6	3
72	13.8	3	3	14.2	2.6	3
73	12.9	2.9	3	18.4	3.3	3
74	3.3	0.4	3	4.2	1.2	3
75	8.3	1.1	3	13	1.4	3
76	0.3	0	3	0.1	0.1	3
77	18.5	1.3	3	15.1	1.3	3
78	22.2	2.8	3	23.3	2.2	3
79	14.6	2.5	3	13.6	2.6	3
80	0.4	0.1	3	0.5	0.2	3
81	0.3	0.1	3	0.5	0.1	3
82	15.9	2.3	3	9.1	1.8	3
83	13.6	5	3	16.8	5.5	3
84	0.8	0.3	3	0.7	0.1	3
85	6.9	1.2	3	6.3	1.5	3
86	9.7	2	3	9	1.8	3
87	0.7	0.1	3	0.2	0.2	3
88	15.8	1.7	3	13.9	1.6	3
89	5	0.6	3	6.3	0.3	3

10

20

30

40

50

【 0 2 8 8 】

実施例 5：ヒト CD3 + T 細胞における TRBC ガイドのスクリーニング

実施例 4 から得られた HEK293_Cas9 細胞におけるインデル編集率が高かった TRBC ガイドを、ヒト CD3 + T 細胞における編集効率および T 細胞受容体 (TCR) 発現に基づいてスクリーニングした。ヌクレオフェクション、編集解析、および TCR 発現解析は実施例 3 の通りに行った。表 9 および図 5 は、CD3 + T 細胞における各種ガイドによる TRBC 編集後のインデル頻度に関する結果を示している。表 10 および図 6 は、CD3 + T 細胞における、TRBC 編集後の TCR 発現測定 (TCR 陰性細胞の割合としての測定) を示している。

【表 9】

表 9 : C D 3⁺T細胞における T R B C 1 でのインデル頻度

配列番号	平均インデル頻度	標準偏差	サンプル数(n)
1	42.40%	0.80%	3
2	50.50%	3.90%	3
3	45.80%	3.00%	3
4	42.50%	3.40%	3
5	45.00%	5.00%	3
6	53.50%	2.40%	3
7	37.30%	7.90%	3
8	27.40%	1.50%	3
9	34.00%	3.20%	3
10	28.20%	3.50%	3
11	25.10%	4.60%	3
12	8.30%	0.40%	3
13	34.20%	1.20%	3
14	21.00%	1.30%	3
15	11.60%	2.50%	3
16	45.70%	1.00%	3
17	35.10%	4.60%	3
18	14.10%	1.30%	3
19	30.40%	2.10%	3
20	30.50%	2.70%	3
21	23.80%	0.90%	3
22	35.50%	3.40%	3
23	30.00%	1.10%	3
24	24.80%	1.40%	3

10

20

30

40

50

【表 10】

表 10 : CD3⁺T細胞におけるTRBC編集後のTCR発現

配列番号	ドナー1-TCR陰性の割合	ドナー1-標準偏差	ドナー2-TCR陰性の割合	ドナー2-標準偏差
1	71.2	1.4	74.4	1.3
2	72.4	2.6	79.9	1.5
3	73.3	2.3	76.4	2.8
4	74	0.9	79.2	0.7
5	66.4	1.1	71.5	0.5
6	75	2.2	85.7	1.4
7	53.5	2.2	60.7	2.3
8	18	5.1	30.6	7.6
9	44.4	1.3	59.6	4.1
10	41.2	7.9	47.9	2.3
11	16.3	0.3	20.9	0.7
12	11.8	0.7	14.6	1
13	48.2	12.3	67.2	2
14	23.3	6.5	34.8	3.9
15	22.1	0.8	23.3	1.6
16	60.8	1.7	70.5	0.5
17	42.8	1.4	49.7	0.7
18	20.6	1.8	28.7	8.7
19	45.9	0.8	50.7	1.4
20	55.3	3.2	60.2	1.1
21	39.7	3.4	46.1	0.8
22	39.6	2.1	44.1	1.4
23	33.5	1	43.6	1.1
24	29.5	2.1	32.8	1
25	43.2	1	57	1.5

【0289】

実施例 6 : TRBCガイドおよびTRACガイドのオフターゲット解析

生化学的手法（例えば、Cameronら、Nature Methods、6巻、頁600～606；2017年を参照）を用いて、TRAC、TRBC1、またはTRBC2を標的とするCas9によって切断される潜在的なオフターゲットゲノム部位を決定した。実施例3および実施例5においてCD3陰性細胞を最も多く示したガイドを、このアッセイにより、潜在的なオフターゲットゲノム切断部位について調べた。この実験では、7種のヒトTRAC標的sgRNA、6種のTRBC標的sgRNA、およびオフターゲット特性が既知の2種の対照ガイドを、単離されたHEK293_CasゲノムDNAを用

いてスクリーニングした。生化学アッセイで16 nMのRNP濃度を用いて検出された潜在的なオフターゲット部位の数を、図7Aにプロットし、表11に示した。このアッセイにより、試験されたsgRNAの、潜在的なオフターゲット部位が特定された。

【0290】

【表11】

表11：生化学的オフターゲット解析

配列番号	標的	部位の数
179	TRBC1/2	48
180	TRBC1/2	11
181	TRBC1/2	54
182	TRBC1/2	72
183	TRBC1/2	65
184	TRBC1/2	61
186	TRAC	36
187	TRAC	40
188	TRAC	168
189	TRAC	35
190	TRAC	31
191	TRAC	207
192	TRAC	253
193	EMX1	118
194	VEGFA	1113

10

20

30

【0291】

潜在的なオフターゲット部位を検証するためのターゲットシーケンス

上記で使用された生化学的方法などの公知のオフターゲット検出アッセイでは、通常、他の状況において、例えば目的の初代細胞において検証され得る潜在的部位を求めて「広範囲を探す(cast a wide net)」ような設計により、多数の潜在的なオフターゲット部位が回収される。例えば、生化学的方法は、細胞環境を含まない精製された高分子量のゲノムDNAを利用し、使用されたCas9 RNPの用量に依存するため、通常、潜在的なオフターゲット部位の数の大きな比率を占める。よって、これらの方法によって特定された潜在的なオフターゲット部位は、特定された潜在的なオフターゲット部位のターゲットシーケンスを用いて、検証できる。

40

【0292】

1つのアプローチでは、Cas9および目的のsgRNA（例えば、評価のための潜在的なオフターゲット部位を有するsgRNA）が、初代T細胞に導入される。その後、このT細胞が溶解され、潜在的なオフターゲット部位に隣接するプライマーを用いて、NGS解析用のアンプリコンが生成される。ある特定のレベルのインデルの特定は、潜在的なオフターゲット部位を実証するものであり得るが、一方で、潜在的なオフターゲット部位に

50

て発見されるインデルの欠如は、使用されたオフターゲットアッセイにおける擬陽性を示すものであり得る。

【0293】

オンターゲットなインデル活性を示すガイドを、このアッセイを用いて、潜在的なオフターゲットゲノム切断部位について試験した。この実験では、ヒトTRBC1またはヒトTRBC2を標的とする5種のsgRNA、およびヒトTRACを標的とする3種のガイドを、既知のオフターゲット特性を有する対照ガイド、配列番号194（VEGFA）と共に、男性ヒト末梢血単核球（PBMC）のプールから単離されたゲノムDNAを用いて、スクリーニングした。生化学アッセイで64 nMのガイド濃度を用いて検出された潜在的なオフターゲット部位の数を、図7Bおよび表12に示す。

10

【0294】

【表12】

表12：64 nMオフターゲット解析

sgRNAの配列番号	標的	ガイド配列（配列番号）	オフターゲット部位数
179	TRBC 1/2	GGCUCUCGGAGAAUGACGAG (配列番号1)	190
180	TRBC 1/2	GGCCUCGGCGCUGACGAUCU (配列番号2)	15
181	TRBC 1/2	AUGACGAGUGGACCCAGGAU (配列番号3)	92
183	TRBC 1/2	UGAGGGUCUCGGCCACCUUC (配列番号5)	127
184	TRBC 1/2	AGAGAUUCUCCACACCCAAA (配列番号6)	90
186	TRAC	CUCUCAGCUGGUACACGGCA (配列番号90)	32
192	TRAC	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGU (配列番号185)	293
206	TRAC	UAGGCAGACAGACUUGUCAC (配列番号214)	114
194	VEGFA	表3参照	2945

20

30

40

【0295】

実施例7：多重編集のためのTRACガイドおよびTRBCガイドの使用
また、ガイドを、TRAC遺伝子座およびTRBC遺伝子座の同時編集について調べた。

50

3人の異なる健常ドナー由来の末梢血単核球（P B M C）を、L y m p h o p r e p（商標）（ステム・セル・テクノロジー社）を用いてバフィーコートから単離し、密度勾配遠心法を行った。これらの細胞を、D y n a b e a d s（商標）C l i n E x V i v o（商標）C D 3 / C D 2 8（インビトロジェン社）を；製造業者の説明書に従って用いて、活性化およびソーティングした。T細胞を、5 % F B S、並びにI L 7およびI L 1 5（各5 n g / m l）を添加したX - V I V O（商標）1 5 H e m a t o p o i e t i c S e r u m - F r e e C u l t u r e M e d i a（ロンザ社（商標））中、1 0 6細胞 / m lの濃度で播種した。刺激の2日後、T細胞を、T R A Cを標的とするc r R N AおよびT R B Cを標的とするc r R N Aを同時に用いる、実施例3に記載の通りのエレクトロポレーションにかけた。1人のドナー由来の細胞を用いて、T R A CガイドおよびT R B Cガイドを、分離した状態で、エレクトロポレーションにかけた。刺激後6日目、ビーズを分離させ、細胞を、5 % F B S、並びにI L 7およびI L 1 5（各5 n g / m l）を添加したX - V I V O（商標）1 5中、 1×10^6 / m lの濃度で播種した。7日目のT R A CおよびT R B Cノックアウト効率を、図8 Aおよび表1 3に示すように、フローサイトメトリーでC D 3分子を欠いているT細胞の割合を評価することにより、評価した。

10

【0 2 9 6】

【表 1 3】

表 1 3：T C R ノックダウンの効率

配列番号	CD3+		CD3-		試料(n)
	平均%	SD	平均%	SD	
95	1	N/A	98	N/A	1
6	1	N/A	99	N/A	1
6および95	2	1	98	1	3
モック	97	1	2	1	3

20

30

【0 2 9 7】

レンチウイルスによるT C R遺伝子の挿入を用いたT R A CおよびT R B Cの同時編集刺激の3日後、編集後T細胞を、健常ドナー（H D 1 - T C R）由来のW T 1特異的T C Rをコードするレンチウイルスベクター（L V）を用いて形質導入し、L Vをランダムに挿入した。簡潔には、T C R α 鎖遺伝子および β 鎖遺伝子を単離し、コドン最適化し、システイン修飾し、双方向プロモーター下でL Vにクローニングした。H D 1 T C Rの α 鎖遺伝子および β 鎖遺伝子のD N A配列およびアミノ酸配列を以下に示す。 α 鎖は、最小のヒトC M Vプロモーター下にアンチセンス配向でクローニングし、 β 鎖は、P G Kプロモーター下にセンス配向でクローニングした。L Vを、インテグラーゼコンピテント第三世代コンストラクトによりパッケージングし、水疱性口内炎ウイルス（V S V）エンベロープで偽型化した。Tリンパ球をこのL Vに24時間感染させた。その後、T細胞を1 0 6細胞 / m lで培養し、増殖させた。形質導入の2日後、特定のV β 遺伝子（T R B V 1 2 - 3 / T R B V 1 2 - 4）および特定のデキストラマー（エピトープ：V L D F A P P G A）を発現しているT細胞の割合を求めることにより、導入効率を評価した。刺激後15日目、T細胞の表現型を細胞蛍光分析で評価した。図8 Bおよび表1 4は、45 %超のT細胞がC D 3分子を発現していた（平均値 $\pm$ S E M = 45, 3 $\pm$ 5, 7）ことを示している。デキストラマー陽性率を測定することにより評価されたW T 1特異的C D 8 + T細胞の割合は、95 %超（平均値 $\pm$ S E M = 95, 3 $\pm$ 0, 7）であった。デキストラマー陽性率を測定することにより評価されたW T 1特異的C D 8 + T細胞の割合は、配列番号6および配列番号95を用いた場合、95 %超であった（平均値 $\pm$ S E M = 95, 3 $\pm$ 0

40

50

， 7 ）（ 図 8 C 、 表 1 4 ） 。 編 集 後 T 細 胞 の T 細 胞 表 現 型 は 、 1 5 日 目 に 、 図 8 D お よ び 表 1 5 に 示 す よ う に 評 価 さ れ た 。

【 0 2 9 8 】

配列番号 250 : HD1 TCR α 鎖 : DNA 配列

```

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

```

【 0 2 9 9 】

配列番号 251 : HD1 TCR α 鎖 : アミノ酸配列

```

M E T L L K V L S G T L L W Q L T W V R S Q Q P V Q S P Q A V I L R E G E D A V
I N C S S S K A L Y S V H W Y R Q K H G E A P V F L M I L L K G G E Q K G H E K
I S A S F N E K K Q Q S S L Y L T A S Q L S Y S G T Y F C G T A W I N D Y K L S
F G A G T T V T V R A N I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D
S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K C V L D M R S M D F K S N S A V A W S N K S
D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S S C D V K L V E K S F E T D T N
L N F Q N L S V I G F R I L L L K V A G F N L L M T L R L W S S *

```

【 0 3 0 0 】

配列番号 252 : HD1 TCR β 鎖 : DNA 配列

```

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

```

10

20

30

40

50

50

50

50

50

【表 1 5】

表 1 5 : T C R 編集後 T 細胞の表現型

配列番号	N/Tscm		CM		EM		TemRa		試料(n)
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	
PBMC	44	4	25	5	19	3	12	5	3
モック	56	12	31	13	9	2	4	2	3
95	93	N/A	4	N/A	0	N/A	2	N/A	1
6	94	N/A	4	N/A	1	N/A	2	N/A	1
6および95	82	8	13	6	3	2	2	0	3

10

【 0 3 0 4】

T R A C 編集および T R B C 編集並びに L V H D 1 - T C R 挿入を有する T 細胞の、初代 A M L 芽球を死滅させる能力について調べた。デキストラマー (d e x t r a m e r) 染色および磁気ソーティングを用いて W T 1 - C D 8 + 特異的 T 細胞を濃縮するため、編集後 T 細胞を磁氣的にソーティングした。形質導入の 2 1 日後、W T 1 - C D 8 + T 細胞を、H L A - A * 0 2 : 0 1 対立遺伝子を有する 3 人の異なる患者から得られた初代 A M L 芽球と共培養し、対照として、上記の特定の H L A 対立遺伝子を持たない初代芽球と共培養した。共培養物は異なるエフェクター対標的の比 (1 : 1 ; 5 : 1 ; 1 0 : 1) で播種した。6 時間の共培養後、標的細胞におけるカスパーゼ 3 の発現を読み出しとして用いた。結果を図 9 A ~ 図 9 D および表 1 6 に示す。W T 1 を発現しており、且つ H L A - A * 0 2 : 0 1 を有する白血病性芽球の最大 4 3 % (平均値 $\pm$ S E M = 3 1 $\pm$ 6 , 6) に、アポトーシスの誘導が認められた。H L A - A * 0 2 : 0 1 対立遺伝子を発現しない A M L 芽球に対しては、検出可能なアポトーシス誘導は認められなかった。

20

【 0 3 0 5】

30

40

50

【表 1 6】

表 1 6 : AML の死滅

条件	E:F比	モック	HD1-TCR+ 平均%	SD
pAML#14	1:1	5.9	22.1	4.9
	5:1	6.7	36.1	10.9
	10:1	7.5	38.6	11.6
pAML#15	1:1	3.6	15.7	16.9
	5:1	4.4	14.5	6.7
	10:1	5.3	18.1	8.1
pAML#16	1:1	3.1	9.4	3.1
	5:1	3.1	14.7	5.5
	10:1	3.4	16.4	5.6
pAML HLA-A*02:01	1:1	16.2	13.2	1.8
	5:1	13.8	9.8	2.2
	10:1	15.1	12.1	2.5

10

20

【0306】

実施例 8 : 多重編集のための追加の T R A C ガイドおよび T R B C ガイド

また、追加の c r R N A を、T R A C 遺伝子座および T R B C 遺伝子座の同時編集について調べた。T 細胞を、配列番号 1 8 5 を含む R N P、配列番号 6 を含む R N P、または両方の R N P 種の混合物によるヌクレオフェクションにかけた。5 % F B S、5 0 μ M の β -メルカプトエタノール、1 0 m M の N -アセチル L -シスチン、1 × ペニシリン-ストレプトマイシン溶液（コーニング社、カタログ番号 3 0 - 0 0 2 - C I）を添加し、所望により、I L 7（5 n g / m l）、I L 1 5（5 n g / m l）、および I L 2（2 0 0 ~ 5 0 0 U / m l）を添加した、B i o W h i t t a k e r（商標）X - V I V O（商標）1 5 H e m a t o p o i e t i c S e r u m - F r e e C u l t u r e M e d i a（ロンザ社（商標）、カタログ番号 0 4 - 4 1 8 Q）を用いた以外は、実施例 3 の通りの手順を実行した。ヌクレオフェクションの 1 7 日後、T 細胞を回収し、N G S で解析した。図 1 0 および表 1 7 は、同時ヌクレオフェクション後の各遺伝子座における編集を（インデル頻度として）示している。フローサイトメトリーを用いることで、表面上に T C R タンパク質を発現している T 細胞の割合を測定して、編集効率を調べることもできる。

30

【0307】

40

50

【表 17】

表 17：複数のガイドを用いた編集

条件	アンプリコン	平均インデル頻度	標準偏差
配列番号6および配列番号185	TRAC	83.4%	0.3%
	TRBC1	82.2%	0.9%
	TRBC2	77.1%	0.2%
ガイドなし	TRAC	0.1%	0.1%
	TRBC1	0.4%	0.6%
	TRBC2	1.0%	0.7%

10

【0308】

実施例 9

追加の T R A C および T R B C を標的とする c r R N A 対を、実施例 7 に記載のように組み合わせ編集について調べた。T 細胞を、配列番号 95 を含む R N P、配列番号 2 を含む R N P、または両方の R N P 種の混合物によるヌクレオフェクションにかけた。T R A C および T R B C ノックアウト効率を、図 1 1 A および表 1 8 に示すように、フローサイトメトリーで C D 3 分子を欠いている T 細胞の割合を評価することにより、評価した。

20

【0309】

【表 18】

表 18：T C R ノックダウンの効率

配列番号	CD3+			CD3-		試料(n)
	平均%	SD	平均%	SD		
95	0.5	N/A	99.5	N/A	1	
2	10.2	N/A	89.3	N/A	1	
2および95	1.8	1.0	98.1	1.0	3	
モック	96.8	N/A	2.4	N/A	1	

30

40

【0310】

レンチウイルストランスフェクション後、図 1 1 B および表 1 9 に示すように、T 細胞表現型を細胞蛍光分析で評価した。W T 1 特異的 C D 8 + T 細胞の割合を、デキストラマー陽性値を測定することにより評価した（図 1 1 C、表 1 9）。編集後 T 細胞の T 細胞表現型を図 1 1 D および表 2 0 に示す。

【0311】

50

【表 1 9】

表 1 9：編集後 T 細胞における T C R 形質導入の効率

配列番号	CD3+		CD3-		CD3+CD8+Dx+		試料(n)
	平均%	SD	平均%	SD	平均%	SD	
モック	99.6	N/A	0.4	N/A	0	N/A	1
2および95	40.1	5.4	59.9	5.4	93	1	3

10

【0 3 1 2】

【表 2 0】

表 2 0．T C R 編集後 T 細胞の表現型

配列番号	N/Tscm		CM		EM		TemRa		試料(n)
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	
PBMC	44	4	25	5	19	3	12	5	3
モック	86	N/A	10	N/A	1	N/A	3	N/A	1
2および95	89	4	8	3	1	0	3	1	3

20

【0 3 1 3】

実施例 7 および実施例 9 の改変後細胞では、配列番号 2 5 1 の T C R α 鎖と配列番号 2 5 3 の T C R β 鎖とを有する W T 1 特異的な T C R をコードするレンチウイルスベクターにより、T R A C g R N A および T R B C g R N A が組み合わされている。上記の改変後細胞は、第一組成物および第二組成物を細胞に送達することで改変することができ、上記第一組成物は、(a) 以下から選択される配列を含むガイド RNA：(i) 配列番号 1 ～ 8 9 から選択されるガイド配列；(i i) 配列番号 1 ～ 8 9 から選択される配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、または少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチド；(i i i) 配列番号 1 ～ 8 9 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 1 %、または少なくとも 9 0 % の同一性を有するガイド配列；(i v) 配列番号 1 ～ 2 4 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；および (i v) 配列番号 1 ～ 6 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列；または、(b) (a.) のガイド RNA をコードする核酸；並びに、所望により、(c) RNA ガイド型 DNA 結合剤または RNA ガイド型 DNA 結合剤をコードする核酸、を含み；上記第二組成物は、配列番号 2 5 1 の T C R α 鎖と配列番号 2 5 3 の T C R β 鎖とを有する W T 1 特異的な T C R をコードするレンチウイルスベクターを含む。

30

40

【0 3 1 4】

いくつかの実施形態では、上記改変後細胞は、以下をさらに含む組成物を送達することにより改変することができる：(a) 以下から選択される配列を含むガイド RNA：(i) 配列番号 9 0 ～ 1 7 8、配列番号 1 8 5、および配列番号 2 1 3 ～ 2 1 8 から選択されるガイド配列；(i i) 配列番号 9 0 ～ 1 7 8、配列番号 1 8 5、および配列番号 2 1 3 ～ 2 1 8 から選択される配列の少なくとも 1 7 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 1 9 個、または少なくとも 2 0 個の連続ヌクレオチド；(i i i) 配列番号 9 0 ～ 1 7 8、配列番号 1 8 5、および配列番号 2 1 3 ～ 2 1 8 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %

50

、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、または少なくとも90%の同一性を有するガイド配列；(iv) 配列番号90～113および配列番号213～218のうちのいずれか1つを含むガイド配列；並びに、(iv) 配列番号90～95のうちのいずれか1つを含むガイド配列；または、(b) (a.) のガイドRNAをコードする核酸。

【0315】

実施例10. シングルガイドによる編集

以下の実施例は、各実施例で特に記載がない限り、以下の方法により実行した。

【0316】

ゲノムDNAの単離

ヌクレオトランスフェクションから48時間超経過した後、T細胞を回収した。DNA単離を実施例1に記載の通りに実行した。実施例1に記載の通りに、DNA試料をPCRにかけた後、NGS解析を行った。

【0317】

T細胞へのRNPの送達

健常ドナーPBMCまたはLeukopakを購入し、製造業者のプロトコルに従って、Straight From CD4/CD8 Microbead Kit (ミルテニーバイオテク社) を用いたポジティブセクションによって、または、Easy Sep Human T-cell Isolation Kit (ステム・セル・テクノロジー社、カタログ番号17951) を用いたネガティブセクションによって、T細胞を単離した。T細胞は、さらなる使用のために、Cryostor CS10凍結用培地 (カタログ番号07930) 中で凍結保存した。解凍後、T細胞を、200U/mLのIL2 (ペプロテック社 (Peprotech))、並びにそれぞれ5ng/mLのIL7およびIL15を添加した基本培地 (2-メルカプトエタノール、N-アセチル-L-システイン、および5%ヒトAB血清またはFBSを添加したXVIVO15) 中に一晩静置した。その後、T細胞を、T Cell Trans Act (ミルテニーバイオテク社、130-111-160) を製造業者による推奨の通りに用いて活性化し、48～72時間培養した後、エレクトロポレーションを行った。

【0318】

Cas9タンパク質およびggRNAを含むリボ核タンパク質 (RNP) 複合体は、等量の試薬を混合し、95℃で2分間インキュベートし、室温に冷却することで、まず個々のcrRNAとtrRNAとをプレアニールすることにより作製した。RNP内のガイドとしては、単一のRNA分子 (シングルガイドRNA、sgRNA) として結び付いた、または、95℃で2分間インキュベートした後に周囲温度に冷却することにより予めアニールされた2つの別々のRNA分子 (デュアルガイドRNA、dgRNA) の状態の、crRNAおよびtrRNAを用いた。配列番号186 (TRAC) または配列番号180 (TRBC1/2) を、SpyCas9と、2:1のモル比で混合することにより、TRAC遺伝子座またはTRBC遺伝子座を標的とするRNPを複合体化して、最終濃度20μMのCas9-RNPとした。エレクトロポレーションについては、T細胞を5～20×10⁶細胞/100μLで懸濁し、TRAC RNPおよびTRBC RNPを表示の通りに添加して、最終濃度2μMのRNPとした。T細胞を、P3 Primary Cell 96-well Nucleofector (商標) Kit (ロンザ社、カタログ番号V4SP-3960) またはロンザ社製4D-Nucleofector X Unit (カタログ番号: AAF-1002X) を用い、Buffer P3および製造業者のパルスコードを用いた、RNPによるヌクレオフェクションにかけた。エレクトロポレーション直後に基本培地を細胞に加え、少なくとも4時間細胞を静置した。

【0319】

選別アッセイについては、G-Rexプロトコルを用いて細胞を増殖させた。簡潔に説明すると、エレクトロポレーション後、1×10⁶個の細胞を24ウェルG-Rexの1ウ

10

20

30

40

50

エル内の1mlのサイトカイン培地中に移し、MOI 3×10^5 に相当するウイルスをそのウェルに加えた。24時間後、サイトカイン培地を用いて体積を7mlにメスアップした。2～3日毎に、細胞を乱さないように培地の半分(3.5ml)を除去し、2×サイトカイン培地を加えた。11～13日目に回収した。

【0320】

フローサイトメトリー用の細胞染色

RNPヌクレオフェクションの4～12日後、編集後T細胞(200μl/200,000細胞)を96ウェル丸底プレートに集め、500gで5分間スピンドウンした。次に、細胞を、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD45RO抗体、抗CD45RA抗体、抗CD27抗体、抗CCR7抗体、抗CD62L抗体、および/またはTCR特異的pMHC四量体もしくはTCR特異的Vβ鎖抗体の組み合わせを含有する抗体混合物中で懸濁した。この混合物を室温、暗所で45分間インキュベートした。試料を500gで5分間スピンドウンし、細胞ペレットを回収し、1:10,000DAPI(バイオレジェンド社、#422801)/FACS用緩衝液で懸濁した。その後、CytoFluorを製造業者の取扱説明書に従って用いてフローサイトメトリーを行った。

10

【0321】

シングルガイドを、刺激後T細胞のTRAC遺伝子座およびTRBC遺伝子座における個別編集および同時編集についても試験した。T細胞を、TRBC1遺伝子座およびTRBC2遺伝子座を標的とするガイド配列番号180を含有するRNP、TRACを標的とするガイド配列番号186を含有するRNP、またはガイド対Cas9が2:1比の両RNP種の混合物によるヌクレオフェクションにかけた。エレクトロポレーションの2日後、T細胞を継代し、ライセートを回収した。

20

【0322】

実施例1に記載の通りに、ゲノムDNAを調製し、NGS解析を行った。試料の試験はトリプリケートで行い、単一のモック試料を用いた。TRACガイドおよびTRBCガイドの個別編集および同時編集の場合、TCR細胞表面発現のノックダウン効率を、CD3の存在または非存在を標的としたフローサイトメトリーにより評価した。CD3分子を欠失したT細胞の割合を表21および図12Aに示す。

【0323】

【表21】

30

表21: 集団中の編集後CD3細胞

試料	平均%CD3-	SD	n
TRAC RNP	98.47	0.06	3
TRBC RNP	91.20	0.17	3
TRAC/TRBC RNP	95.83	5.05	3

40

【0324】

CD3-T細胞におけるTRACおよびTRBCの個別編集および組み合わせ編集の後のNGS解析によって、インデル頻度を評価した。TRACおよびTRBCにおけるガイド編集の割合を表22および図12Bに示す。

【0325】

50

【表 2 2】

表 2 2 : T細胞におけるTRACおよびTRBCガイド編集

配列番号	TRAC 平均イ ンデル 率	TRAC SD	TRBC1 平均イ ンデル 率	TRBC1 SD	TRBC2 平均イ ンデル 率	TRBC2 SD	N
TRAC KO	90	1.2	0.4	0	0.2	0.1	3
TRBC KO	0.2	0.1	85.4	3.2	91.2	1.5	3
TRAC KO + TRBC KO	81.8	4.7	78.2	4.4	83.6	2.7	3
モック	0.2	-	0.2	-	0.1	-	1

10

【0326】

実施例 11. TRACガイド挿入スクリーニング

20

AAV鑄型のT細胞への挿入

TRAC遺伝子座を標的とする12種のガイドの位置を用いて、TRAC遺伝子座の80bp領域を除去することで、修復後の当該部位の切断を防ぎ、ガイド/Cas9が鑄型から切断されることを防ぐ、アデノ随伴ウイルス(AAV)鑄型を設計した。これにより、TCRをTRAC遺伝子座に挿入できる、遺伝子座が作製される。80bp欠失を含むホモロジーアームを用いて、モデルTCRを挿入するように、2つ目はGFPを挿入するように、両方はEF1aプロモーターで駆動させて、コンストラクトを設計し、これをジェンスクリプトUSA社(GenScript USA Inc.)で合成し、BgIII制限酵素認識部位を用いてpUC19ベクターに挿入し、AAVベクターへのサブクロニングを行った。ホモロジーアームをTRACガイド切断部位に隣接させて、TCRまたはレポーター分子(例えばGFP)をコードする遺伝子を部位特異的にT細胞に挿入するように、AAV鑄型を設計した。

30

【0327】

T細胞単離およびRNPヌクレオトランスフェクション法を実施例10に記載の通りに行った。エレクトロポレーションの10分後、T細胞を 1×10^6 細胞/mLでサイトカイン培地に加え、AAV鑄型を 3×10^5 のMOIで添加した。エレクトロポレーションの24時間後、細胞を分割し、追加で4~12日間、静置培養にて、またはG-R-EXマルチウェルプレート(ウィルソン・ウォルフ・マニュファクチャリング社(Wilson Wolf Manufacturing))内で増殖させ、その後、機能分析に用いるか、または凍結保存した。フローサイトメトリーを行った。

40

【0328】

TRACガイド挿入スクリーニング

TRAC遺伝子座の第1エクソンを標的とするデュアルガイドを、T細胞においてスクリーニングし、挿入効率を評価した。最初のスクリーニングでは、GFPレポーター遺伝子をコードするAAVベースの挿入鑄型(AV9)が使用された。AV9の設計では、80bpギャップを、表23に列挙されるガイドの標的部位を包含するように設計した。AV9は下記の表37に記載されている。対照として使用したAAVのみ試料およびRNPなし(モック)試料を除き、デュアルガイドを含むRNPを用いて、デュープリケートで、T細胞のヌクレオフェクションを行った。ガイド対Cas9比を1:1としたこと以外は、実施例10に記載の通りに、RNPを用いた細胞形質導入の手順を実行した。TRAC

50

ガイドの挿入効率を、実施例 10 に記載の通りのフローサイトメトリーで求めたところ、表 23 および図 13 A に示す通りの、挿入されたコンストラクト由来の GFP 蛍光が検出された。TRAC ガイドによる編集の場合の、TCR 細胞表面発現のノックダウン効率を、CD3 の存在または非存在を標的としたフローサイトメトリーにより評価した。CD3 分子を欠失した T 細胞の割合を表 23 および図 13 B に示す。

【0329】

【表 23】

表 23. 挿入されたガイドの GFP 発現率

ガイド	GFP%	GFP% SD	CD3-細胞の割合(n=1)
96	6.44	0.28	4.96
213	8.22	0.06	19.8
90	43.9	1.41	98.9
97	20.05	3.61	58.1
95	22.65	2.9	99.2
98	19.1	1.98	26.8
214	36.05	1.63	61.5
185	32.05	3.32	85.7
215	31	0.28	17.9
216	30.4	8.2	13.1
217	39.4	0.14	31.6
218	26.55	0.07	52.5
モック	0	0	0.45
AAVのみ	4.52	0.72	NA

10

20

30

【0330】

実施例 12. TRAC 挿入の場合のシングルガイドスクリーニング

次に、TRAC 遺伝子座の第 1 エクソンを標的とするシングルガイドを、T 細胞においてスクリーニングし、AV9 を用いた挿入効率を評価した。ガイド対 Cas9 比を 1:1 としたこと以外は、実施例 10 に記載の通りに、デュープリケートで、T 細胞作製および RNP 形質導入の手順を実行した。AV9 は、表 24 に列挙されるガイドを用いて、実施例 11 に記載の通りに設計した。NGS インデル解析を実施例 1 に記載の通りに行った。

40

【0331】

TRAC ガイドの挿入効率を、フローサイトメトリーで求めたところ、表 24 および図 14 A に示す通りの、挿入されたコンストラクト由来の GFP 蛍光が検出された。TRAC ガイドによる TCR 細胞表面発現のノックダウン効率を、CD3 の存在または非存在を標的としたフローサイトメトリーにより評価した。CD3 分子を欠失した T 細胞の割合を表 24 および図 14 B に示す。化学修飾および未修飾ガイドの編集効率のアッセイも行ったところ、活性を有することが分かった。

【0332】

50

【表 2 4】

表 2 4. G F P 陽性細胞の割合

ガイド	%GFP (平均)	%GFP SD	CD3-細胞の割合	CD3-細胞の割合 SD
201	45.65	0.78	88.85	0.21
202	40.65	2.05	89.10	0.42
203	53.05	0.21	96.15	0.21
204	51.95	2.33	95.70	0.71
191	37.15	1.34	95.95	0.21
205	66.35	3.46	93.50	0.71
206	73.15	1.34	93.25	0.78
211	53.75	0.21	92.55	0.21
207	48.45	1.34	62.25	0.64
208	57.35	1.06	71.50	0.14
209	55.00	2.97	72.15	1.91
210	53.15	2.05	93.70	0.28
186	36.15	0.35	85.50	0.57
モック	1.88	0.41	0.63	0.01
AAVのみ	0.00	0.00	1.71	0.78

10

20

30

40

50

【0 3 3 3】

実施例 1 3：外来性 T C R の挿入および発現におけるプロモーターおよび I T R の評価機能分析のための遺伝子編集 T C R - T 細胞の改変

T C R 挿入とその後の細胞表面発現を、種々のプロモーターおよび 2 種類の I T R 長を用いて調べた。T 細胞単離およびガイド配列番号 1 8 5 を用いた R N P トランスフェクションを、1：1 モル比の g R N A 対 S p y C a s 9 を用いたことを除いて、実施例 1 0 に記載の通りに実行した。T C R - C を含む A A V コンストラクトの T 細胞への R N P 形質導入を、実施例 1 1 に記載の通りに実行した。A A V 鑄型には、T R A C 遺伝子座内の配列番号 1 8 5 切断部位の両サイドに隣接する 5 0 0 b p に対応する 5 0 0 b p ホモロジーアームを含ませた。それぞれの A A V コンストラクトは、表 2 5 に示す通りの、プロモーターおよび I T R の異なる組み合わせを特徴とした。編集後 T 細胞を、実施例 1 1 に記載の通りに、フローサイトメトリー分析用に四量体染色した。

【0 3 3 4】

T C R - C 挿入効率の細胞蛍光分析による評価を行い、細胞表面上の C D 3 + の存在による T 細胞の同一性、および、T C R の特異的リガンドの四量体、R M F ペプチドを介した、挿入された T C R を発現している細胞の数、の両方を評価した（例えば、その内容が参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第 2 0 1 6 0 0 8 3 4 4 9 号を参照）。C D 3 + 四量体 + 細胞の割合を表 2 5 および図 1 5 A に示す。四量体染色 T 細胞の平均蛍光強度（M F I）を表 2 5 および図 1 5 B に示す。

【0 3 3 5】

【表 2 5】

表 2 5. AAV 鑄型に対するプロモーターおよび ITR

AAV 鑄型 ID	プロモーター	ITR 長 (bp)	四量体+, CD3+ の割合 (平均)	SD	蛍光強度 CD3+ (平均)	SD	n
AV2	Efla-短	145	0.48	0.48	52752	34002	2
AV3	MND-1	141	15.85	1.48	77704	646	2
AV6	MND-1	145	18.55	0.49	67845	4084	2
AV4	MND-2	141	17.10	0.57	116978	6798	2
AV8	MND-2	145	14.55	2.62	65281	3117	2
AV5	PGK	135	2.35	0.03	23410	437	2
AV7	PGK	146	9.01	0.57	12596	78	2
AV1	EFla	146	37	-	117223	-	1

この表に示される配列エレメントおよび配列は、表 3 7 でさらなる定義を行う。

この表に示される配列エレメントおよび配列は、表 3 7 でさらなる定義を行う。

【0 3 3 6】

実施例 1 4：内在性 TRAC プロモーターを用いた改変後 T 細胞における GFP 発現別の実験で、P2A リボソームスキッピング部位の後に GFP レポーター遺伝子を含む AAV 鑄型 (AV10) (例えば、外来性プロモーターなし) を、TRAC 遺伝子座の第 1 エクソンに挿入し、内在性 TRAC プロモーターが GFP 発現を駆動できるかどうかを確認した。実施例 1 0 に記載の通りに、T 細胞の、ガイド配列番号 186 を含む RNP を用いたヌクレオフェクションと、AAV AV10 を用いた形質導入を行った。対照条件として、未編集 T 細胞 (モック) および RNP ヌクレオフェクションを受けたが AAV を受けていない T 細胞 (RNP のみ) を含ませた。4 日間の培養後、編集後 T 細胞の CD3 を APC-Cy7 結合型抗 CD3e (バイオレジェンド社、300318) で共染色し、GFP 発現および TCR ノックアウトについてフローサイトメトリーで解析したところ、表 2 6 および図 1 6 A ~ 図 1 6 C に示す通りとなった。

【表 2 6】

表 2 6：集団中の編集後 CD3- および GFP 陽性細胞の割合

試料	%CD3-	SD	%GFP+	SD
AV10-GFP + RNP	97.5	0.05	76.4	1.9
RNP のみ	86.7	2.05	1.1	0.0
モック	0.8	0.04	0.0	0.0

【0 3 3 7】

実施例 1 5：内在性 TRAC プロモーターおよび外来性 TRAC プロモーターを用いた改変 T 細胞における TCR 発現追加の実験で、外来性プロモーターを有するまたは有さない、TCR- α 、TCR- β 、または TCR- δ を含む AAV 鑄型を、TRAC 遺伝子座に挿入し、内在性 TRAC プロモーターが挿入された TCR の発現および機能を駆動できるかどうかを確認した。T 細胞

トランスフェクションおよびAAV挿入を、それぞれ実施例10および実施例11に記載の通りに、デュープリケートで実行した。T細胞に、TRAC（配列番号186）およびTRBC（ガイド配列番号180）を含むRNPを用いたヌクレオフェクションを行い、このガイドを含むRNPには表27に示される各種AAV鑄型を含ませた。挿入されたTCRを発現するT細胞を、CD4+細胞およびCD8+細胞において、挿入されたTCRのTCRVβ鎖に特異的な抗体を用いるフローサイトメトリーで検出したところ、表27および図17A～17Cに示す通りとなった（TCR-Aの場合は抗Vβ8、[バイオレジェンド社カタログ番号140104]；TCR-Dの場合はVβ7.2、図17B [ベックマン・コールター社、カタログ番号IM3604]；TCR-Cの場合はVβ17、図17Cに図示 [ベックマン・コールター社、カタログ番号IM2048]）。

10

【0338】

【表27】

表27. 外来性プロモーター有りおよび無しの、改変TCRの細胞表面発現

AAV鑄型	TCR	プロモーター	% CD4+ CD3+ Vb+ (平均)	SD	% CD8+ CD3+ Vb+ (平均)	SD
AV21	TCR-A	内在性 (PL)	67.05	0.49	66.50	1.27
AV11	TCR-A	EF1a	65.45	0.49	66.05	1.20
AV20	TCR-D	内在性 (PL)	69.85	0.07	70.25	0.64
AV18	TCR-D	EF1a	44.60	0.00	47.00	0.00
AV19	TCR-C	内在性 (PL)	50.45	0.35	46.40	0.99
AV12	TCR-C	EF1a	60.20	0.71	54.70	0.85

20

* PL：プロモーターレス鑄型コンストラクト

この表に示される配列エレメントおよび配列は、表37でさらなる定義を行う。

30

この表に示される配列エレメントおよび配列は、表37でさらなる定義を行う。

【0339】

特定のWT1ペプチド抗原に反応したT細胞の脱顆粒およびサイトカイン放出を実施し、内在性プロモーターまたは外来性TRACプロモーターから発現された、改変エフェクターT細胞の機能性を試験した。具体的には、改変T細胞を、がん細胞株OCI-AML3（DSMZ社、カタログ番号ACC582）由来のペプチドパルス細胞との共培養後に、CD107aの発現上昇、並びにIL2およびIFNγの発現について評価した。簡潔に説明すると、100,000個のOCI-AML3細胞を、基本培地（Xvivo基本培地：サイトカインなし+1μL/mL GolgiPlug+0.7μL/mL GolgiStop+30μL/mL CD107a APC/Cy7（3μL/ウェル））中、37℃で4～5時間、漸増量の9merペプチドVLDFAPPGA（VLD）またはRMFPNAPYL（RMF）でパルスし、ペプチド濃度は0～5000nMの範囲であった。遺伝子編集TCR+T細胞を、1×10⁶個のTCR挿入後細胞/mLとなるように、最終濃度で30μL/mL CD107a APC/Cyanine7抗体（バイオレジェンド社）、1μL/mL Golgiplug（BD）、および0.7μL/mL GolgiStop（BD）を含有するXVIVO15基本培地に懸濁し、エフェクター細胞：標的細胞（E：T）比が1：1となるようにペプチドパルス標的細胞に加えた。共培養物を37℃で一晩インキュベートし、細胞の、表面マーカーCD3、CD4、CD8、およびTCR-AまたはTCR-Dの特定のTCRβ鎖を染色し、30分間インキュベートした。表面染色後、市販のキット（インビトロジェン社）を用いて細胞を固定および

40

50

透過処理し、細胞内の I F N - β および T N F α の染色を行い、その後、室温で 30 分間インキュベートした。細胞内染色後、細胞を洗浄し、フローサイトメトリーで解析した。

【0340】

T 細胞の死滅およびサイトカイン放出に対する E F 1 α (または E F - 1 α) および内在性プロモーターの影響を、各試料中に存在する、C D 1 0 7 a、I F N γ 、および／または T N F α について陽性の細胞の割合によって、測定した。T C R を有するエフェクター T 細胞およびプロモーターの種類を表 28 に列挙する。T C R + T 細胞についてのフローサイトメトリーの結果を表 28 に示し、T C R - A を発現する細胞についての用量反応曲線を図 18 A に示す (A V 2 1 および A V 1 1)。T C R - D を発現する C D 1 0 7 a + 細胞の割合を表 28 および図 18 B に示す (A V 2 0 および A V 1 8)。T 細胞によって誘発された免疫応答を、T N F - α およびインターフェロン γ の割合を測定することによって評価したところ、表 28 および図 19 A ~ 図 19 B に示す通りとなった。

10

20

30

40

50

【表 2 8】

表 2 8. 外来性プロモーター有りおよび無しの、T C Rを発現する改変T細胞における脱顆粒およびインターフェロン γ 反応

コンストラクト	TCR	プロモーター	ペプチド濃度	%CD107a+	SD	%TNFa+IFN γ +	SD
AV21	TCR-A	内在性	0nM	3.79	0.49	0.08	0.02
			0.5nM	40.55	0.35	9.66	1.34
			5nM	88.70	0.42	22.75	1.34
			50nM	97.55	0.07	29.10	0.00
			500nM	98.55	0.07	38.55	1.34
			5000nM	98.65	0.35	32.80	1.56
			5000nM RMF	11.50	0.71	1.60	0.57
AV11	TCR-A	EF1a	0nM	3.83	0.33	0.02	0.03
			0.5nM	42.85	0.07	4.92	0.40
			5nM	90.15	0.78	17.20	0.85
			50nM	97.65	0.21	28.90	0.28
			500nM	98.15	0.07	37.15	2.19
			5000nM	98.60	0.00	34.35	0.35
			5000nM RMF	11.45	0.21	0.83	0.11

10

20

30

40

50

AV20	TCR-D	内在性	0nM	1.73	0.18	0.05	0.04
			0.5nM	2.16	0.19	0.21	0.08
			5nM	11.95	0.21	3.40	0.23
			50nM	53.30	0.85	11.35	0.07
			500nM	87.15	0.64	21.05	1.91
			5000nM	92.30	0.28	26.20	0.85
			5000nM RMF	1.82	0.13	0.01	0.01
AV18	TCR-D	EF1a	0nM	2.56	0.11	0.01	0.02
			0.5nM	3.52	0.45	0.12	0.08
			5nM	12.70	1.98	2.12	0.00
			50nM	53.25	4.60	10.58	1.87
			500nM	85.10	2.40	17.25	1.34
			5000nM	91.35	1.63	19.15	2.62
			5000nM RMF	2.86	0.25	0.05	0.01

この表に示される配列エレメントおよび配列は、表 3 7 でさらなる定義を行う。

【 0 3 4 1 】

実施例 1 6 : 内在性 T 細胞受容体 α 鎖および β 鎖の両方のノックアウトによる T C R 発現の増強

T 細胞を、挿入された α 鎖および挿入された β 鎖の両方を含む改変された T C R - A 、 T C R - B 、または T C R - D の細胞表面発現について、評価した。挿入された α 鎖および β 鎖の対合を増加させるための 3 つの条件を試験した：（ 1 ）システイン架橋を形成して挿入された α 鎖および β 鎖を結び付け得るシステイン残基の付加；（ 2 ）内在性 T R A C プロモーターからの、または外来性プロモーターからの発現、並びに、（ 3 ） T R A C 、 T R B C 1 、および T R B C 2 の内在性コピーの破壊。T 細胞トランスフェクションおよ

びAAV形質導入を、実施例10に記載の通りに実行した。TCRは、上記のように、TRAC遺伝子座のみを標的とするRNP、またはTRAC遺伝子座、TRBC1遺伝子座、およびTRBC2遺伝子座の両方を標的とするRNPを含む、AAV鑄型であるAV11、AV13、AV18、またはAV20を介して、挿入した。トランスフェクション後、T細胞を実施例10に記載の通りに増殖させた。細胞増殖の9日後、編集後T細胞を、抗CD3eおよび適切なV-β試薬(PE)で共染色し、フローサイトメトリーを介して改変TCRを特定した。各条件の場合の、TCR-AおよびTCR-B CD3+Vb7.2+細胞の割合を表29に示す。図20Aおよび図20Bは、表29のデータについての、改変されたTCR-AおよびTCR-B CD3+Vb7.2+細胞の細胞表面発現の代表例のプロットである。CD8+細胞集団およびCD4+細胞集団における改変TCR-Aおよび改変TCR-Bの細胞表面発現も測定したところ、表29および図21Cに示す通りとなった。

10

【0342】

【表29】

表29. 挿入されたα鎖およびβ鎖の両方を含む改変TCR-Aおよび改変TCR-Bの発現の評価

試料	RNP	CD8+				CD4+			
		平均 CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD	平均 CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD
AV13- TCR- B(シ ステ イン 有り)	TRAC	62.2	1.56	8487	290	68.85	0.64	8947	291
	TRAC + TRBC	69.05	2.05	20709	443.36	75.35	2.05	24521	492
AV11- TCR- A(シ ステ イン 無し)	TRAC	60.8	nd	12520	nd	69.3	nd	13782	nd
	TRAC + TRBC	67.55	0.21	40104	2203	74.75	0.50	49273	1743

20

30

40

【0343】

内在性プロモーターまたは外来性プロモーターを用いた、AV20-TCR-DおよびAV18-TCR-D CD3+Vb7.2+細胞の割合を、表30に示す。CD8+細胞集団およびCD4+細胞集団における改変TCR-Dの細胞表面発現を測定したところ、表30および図21A～図21Dに示す通りとなった。

【0344】

50

【表 3 0】

表 3 0. 挿入された α 鎖および β 鎖の両方を含む改変 T C R - D の発現の評価

試料	RNP	CD8+				CD4+			
		CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD	CD3+ %Vb+	SD	Vb MFI	SD
AV18 -TCR- D	TRA C	41.3	nd	13586	nd	58.6	nd	22324	nd
	TRA C + TRBC	71.4	1.6	58469	12479	74.05	1.15	85360	18034
AV20 -TCR- E	TRA C	40.4	nd	25613	nd	62.1	nd	13406	nd
	TRA C + TRBC	83.5	0.3	44342	11035	84.1	0.3	71007	18790

10

20

【 0 3 4 5】

実施例 1 7：追加の T C R 由来の α 鎖および β 鎖の対合に対する T R B C ノックアウトの影響

T 細胞を、挿入された α 鎖および挿入された β 鎖の両方の対合に対する内在性 β 鎖の影響について、追加の改変 T C R を用いて評価した。この実験は、四量体染色を用いて M F I を測定し、表 3 1 の A A V インサートを形質導入に用いたこと以外は、本明細書に記載の通りに行った。細胞増殖の 9 日後、改変 T 細胞を、V L D - 四量体を用いて共染色し（オルトゴナルな V - β 染色法）、T C R 細胞表面発現を有する細胞をフローサイトメトリーで特定したところ、表 3 1 に示す通りとなり、各実験から得られたデータを図 2 2、図 2 3、および図 2 4 に示す。また、平均蛍光強度（M F I）をフローサイトメトリーで求めたところ、表 3 1 および図 2 5 および図 2 6 に示す通りとなった。

30

【 0 3 4 6】

40

50

【表 3 1】

表 3 1. 改変 T 細胞における表面 T C R 発現

試料	RNP	CD8+				CD4+			
		平均% 四 量体+	SD	平均 四量 体 MFI	SD	平均% 四量体+	SD	平均 四量 体 MFI	SD
AV11- TCR-A	TRAC	12.65	0.6	21853.5	12	7.6	0.4	10064.5	634
	TRAC + TRBC	51.2	3.9	23697	1605	48	2.5	11332	387
AV14- TCR-F	TRAC	61.05	6.2	50097	3828	78.9	0.8	67332.5	1379
	TRAC + TRBC	76.6	0.3	171770	7974.	81.8	2.3	231348	8432
AV15- TCR-G	TRAC	73.6	0.3	101676	2594	77.55	0.77	101366	4317
	TRAC + TRBC	81.9	0.1	190002	3919	85.35	2.05	251084	1569
AV16- TCR-H	TRAC	68.85	1.8	75226.5	1704	71.65	1.8	64255	3921
	TRAC + TRBC	77.1	3.8	138847	1916	80.25	3.5	131127	5313
RNP の み	TRAC	0.0555	0.05	n.a	n.a	0.112	0.04	n.a	n.a
	TRAC + TRBC	0.052	0.02	n.a	n.a	0.107	0.06	n.a	n.a

10

20

【 0 3 4 7 】

実施例 18：改変 T 細胞の毒性およびサイトカイン放出

30

改変 T 細胞を、細胞毒性およびサイトカイン応答について、それぞれ、標的細胞におけるアポトーシスの測定および増殖培地中に放出されるサイトカインの測定を通じて、アッセイした。T R A C 遺伝子座のみを標的とする R N P、または T R A C 遺伝子座と T R B C 遺伝子座の両方を標的とする R N P を有する、表 3 2 に記載の A A V 鋳型配列を用いて、本明細書に記載の通りに、T 細胞を改変した。T C R + T 細胞の細胞比を 2 . 5 : 1 E : T とした以外は実施例 1 5 に記載の通りに、H L A - 0 2 . 0 1 陽性 T 2 細胞株標的細胞をパルスし、改変 T 細胞と共培養した。カスパーゼ 3 / 7 R e d 試薬 (エッセン・バイオサイエンス社 (E s s e n B i o s c i e n c e)) を、最終濃度 2 μ M で各ウェルに添加した。I n c u c y t e L i v e C e l l A n a l y s i s S y s t e m (エッセン・バイオサイエンス社) および I n c u c y t e S 3 解析ソフトウェア (バージョン 2 0 1 8 B) を用いて、6 時間後のカスパーゼ 3 / 7 アポトーシス細胞からの赤色蛍光を定量した。2 4 時間後、上清を各ウェルから回収し、I L 2 および I F N - γ サイトカイン放出を、D u o s e t E L I S A キット (R & D システムズ社) を製造業者のプロトコルに従って用いて、E L I S A で定量した。平均カスパーゼ 3 / 7 積分強度を、表 3 2 および表 3 3、並びに図 2 7 A ~ 図 2 7 C および図 2 8 A ~ 図 2 8 D に示す。サイトカイン放出を、表 3 4 A D、並びに図 2 9 A ~ 図 2 9 G および図 3 0 A ~ 図 3 0 D に示す。

40

【 0 3 4 8 】

50

【表 3 2】

表 3 2 : 細胞毒性

試料	ペプチド (nM)	TRAC/TRBC		TRACのみ	
		平均カスパーゼ3/7積分強度	SD	平均カスパーゼ3/7積分強度	SD
AV11-TCR-A	0nM VLD	92,634	7,107	132,075	37,266
	0.005nM VLD	116,733	25,315	141,590	71,782
	0.05nM VLD	227,475	69,325	135,336	36,246
	0.5nM VLD	729,355	193,569	345,431	43,799
	5nM VLD	1,017,766	174,286	629,094	151,367
	50nM VLD	897,413	122,632	762,373	59,142
	500nM VLD	885,460	225,388	741,203	77,370
	500nM RMF	98,877	12,254	121,279	7,212
AV13-TCR-B	0nM VLD	97,684	21,060	93,536	19,338
	0.005nM VLD	126,983	7,518	88,855	42,431
	0.05nM VLD	174,492	11,465	119,259	14,122
	0.5nM VLD	388,825	71,913	180,269	23,378
	5nM VLD	835,068	86,910	382,323	94,136
	50nM VLD	922,968	49,804	724,521	280,318
	500nM VLD	876,706	57,316	748,140	249,718
	500nM RMF	78,919	21,138	81,044	8,512
AV12-TCR-C	0nM RMF	279,375	93,562	276,204	65,787
	0.05nM RMF	238,879	17,971	360,532	63,189
	0.5nM RMF	639,925	37,882	560,793	134,482
	5nM RMF	1,446,931	341,193	1,463,030	193,719
	50nM RMF	1,864,716	569,777	2,020,037	65,722
	500nM RMF	1,519,652	256,405	2,168,849	391,750
	500nM VLD	218,526	35,777	330,230	34,681

10

20

30

40

50

【表 3 3】

表 3 3 : 細胞毒性

試料	ペプチド(nM)	TRAC / TRBC		TRACのみ	
		平均カスパー ゼ3/7積分強 度	SD	平均カスパー ゼ3/7積分強 度	SD
AV11-TCR-A	0nM VLD	381,416	143,786	9,042	413
	0.005nM VLD	374,092	69,482	9,184	1,881
	0.05nM VLD	1,134,226	154,362	16,907	5,212
	0.5nM VLD	1,173,265	110,362	38,844	19,238
	5nM VLD	1,325,404	313,592	137,374	35,354
	50nM VLD	1,197,360	92,955	207,010	81,220
	500nM VLD	1,571,735	526,514	233,358	55,713
	500nM RMF	280,465	54,951	7,342	1,113
AV14-TCR-F	0nM VLD	21,702	8,974	18,238	3,665
	0.005nM VLD	17,809	2,730	24,480	7,844
	0.05nM VLD	25,664	9,946	31,096	6,502
	0.5nM VLD	528,157	163,446	346,541	71,382
	5nM VLD	1,297,535	240,491	930,724	169,903
	50nM VLD	1,150,859	143,371	1,198,605	138,751
	500nM VLD	1,228,755	146,056	845,589	119,495
	500nM RMF	8,578	1,615	9,659	2,534
AV15-TCR-G	0nM VLD	12,408	4,254	12,182	2,841
	0.005nM VLD	20,974	7,838	21,046	12,983
	0.05nM VLD	310,566	130,784	199,014	55,935
	0.5nM VLD	963,870	113,005	1,007,001	378,833
	5nM VLD	1,255,083	289,237	1,143,162	399,176
	50nM VLD	1,037,328	87,408	1,276,265	379,466
	500nM VLD	1,187,161	202,415	1,305,422	104,837
	500nM RMF	6,795	1,439	4,949	1,238
AV16-TCR-H	0nM VLD	7,388	1,738	6,560	1,298
	0.005nM VLD	9,815	1,987	7,651	4,159
	0.05nM VLD	32,360	3,457	23,556	6,335

	0.5nM VLD	627,805	91,413	549,651	126,913
	5nM VLD	983,752	124,769	991,625	147,487
	50nM VLD	1,080,676	152,098	1,082,346	86,963
	500nM VLD	1,181,699	122,175	1,180,497	276,768
	500nM RMF	3,889	3,101	4,189	944

【表 3 4 - 1】

表 3 4 A : I L 2 サイトカイン放出

コンストラクト	ペプチド(nM)	IL2 TRAC/TRBC			IL2 TRACのみ		
		平均 (pg/ml)	SD(pg/ml)	N	平均 (pg/ml)	SD(pg/ml)	N
AV11-TCR-A	0nM VLD	46	3	3	1,715	119	3
	0.005nM VLD	34	3	3	1,490	79	3
	0.05nM VLD	52	19	3	1,436	18	3
	0.5nM VLD	50	10	3	1,186	170	3
	5nM VLD	506	29	3	1,713	264	3
	50nM VLD	1,902	104	3	3,554	223	3
	500nM VLD	4,804	345	3	5,003	112	3
	500nM RMF	46	3	3	1,615	194	3
AV13-TCR-B	0nM VLD	46	3	3	1,109	181	3
	0.005nM VLD	42	2	3	1,048	60	3
	0.05nM VLD	39	5	3	913	44	3
	0.5nM VLD	55	10	3	868	73	3
	5nM VLD	248	17	3	976	66	3
	50nM VLD	1,095	90	3	2,160	240	3
	500nM VLD	3,363	303	3	3,547	121	3
	500nM RMF	51	18	3	1,011	64	3
AV12-TCR-C	0nM RMF	n.d.	n.d.	n.d.	498	49	3
	0.05nM RMF	398	210	3	511	40	3
	0.5nM RMF	320	15	2	481	42	3
	5nM RMF	182	17	3	333	19	3
	50nM RMF	392	56	3	396	79	3
	500nM RMF	3,193	165	3	2,386	207	3
	500nM VLD	7,776	539	3	7,830	557	3
	0nM VLD	378	113	3	415	66	3

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 2】

表 3 4 B : インターフェロン- γ 放出

コンストラクト	ペプチド(nM)	TRAC/TRBC			TRACのみ		
		平均 (pg/ml)	SD(pg/ml)	N	平均 (pg/ml)	SD(pg/ml)	N
AV11-TCR-A	0nM VLD	<LLOD*	<LLOD	3	1,313	446	3
	0.005nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	904	243	3
	0.05nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	731	68	3
	0.5nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	1,442	148	3
	5nM VLD	7,361	399	3	4,323	332	3
	50nM VLD	15,845	1,783	3	9,221	381	3
	500nM VLD	25,242	3,021	3	11,558	407	3
	500nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	1,656	115	3
AV13-TCR-B	0nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	406	75	3
	0.005nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	265	36	3
	0.05nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	981	896	3
	0.5nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	471	140	3
	5nM VLD	4,643	154	3	1,865	183	3
	50nM VLD	11,273	643	3	3,645	184	3
	500nM VLD	19,868	1,925	3	6,476	434	3
	500nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	648	199	3
AV12-TCR-C	0nM RMF	n.d.	n.d	n.d	1,243	92	3
	0.05nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	839	144	3
	0.5nM RMF	<LLOD	<LLOD	2	1,151	93	3
	5nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	1,181	96	3
	50nM RMF	4,643	154	3	2,434	26	3
	500nM RMF	11,273	643	3	5,302	723	3
	500nM VLD	19,868	1,925	3	16,247	192	3
	0nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	1,058	93	3

* L L O D は、読み取り値が、使用された特定のアッセイにおける検出レベル以下であることを示している。

【表 3 4 - 3】

表 3 4 C : I L 2 サイトカイン放出

TCR	ペプチド(nM)	TRAC/TRBC			TRACのみ		
		平均 (pg/ml)	SD(pg/ml)	N	平均 (pg/ml)	SD(pg/ml)	N
AV11-TCR-A	0nM VLD	314	46	3	2,259	156	3
	0.005nM VLD	304	42	3	2,247	122	3
	0.05nM VLD	227	29	3	2,046	188	3
	0.5nM VLD	200	63	3	2,007	73	3
	5nM VLD	494	15	3	4,266	96	3
	50nM VLD	1,182	157	3	7,062	283	3
	500nM VLD	1,511	141	3	8,375	385	3
	500nM RMF	81	19	3	2,135	245	3
AV16-TCR-H	0nM VLD	17	21	2	102	9	2
	0.005nM VLD	15	0	1	44	27	3
	0.05nM VLD	40	0	1	2	0	1
	0.5nM VLD	17	17	2	23	11	3
	5nM VLD	30	6	2	175	79	2
	50nM VLD	286	8	2	111	32	3
	500nM VLD	455	90	3	387	17	3
	500nM RMF	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
AV15-TCR-G	0nM VLD	306	144	3	338	28	3
	0.005nM VLD	196	40	3	326	49	3
	0.05nM VLD	198	42	3	284	14	3
	0.5nM VLD	248	72	3	305	26	3
	5nM VLD	351	27	3	442	21	3
	50nM VLD	764	47	3	1,053	89	3
	500nM VLD	1,203	111	3	1,566	112	3
	500nM RMF	157	29	3	242	10	3
AV14-TCR-F	0nM VLD	283	16	3	295	55	3
	0.005nM VLD	303	84	3	316	24	3
	0.05nM VLD	274	46	3	361	25	3
	0.5nM VLD	836	103	3	724	129	3

10

20

30

40

	5nM VLD	1,406	69	3	1,634	51	3
	50nM VLD	3,755	180	3	3,850	116	3
	500nM VLD	4,301	57	3	4,289	459	3
	500nM RMF	117	53	3	190	19	2

50

【表 3 4 - 4】

表 3 4 D : インターフェロニン- γ 放出

TCR	ペプチド (nM)	TRAC/TRBC			TRACのみ		
		平均	SD	N	平均	SD	N
AV11- TCR-A	0nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	3,491	108	3
	0.005nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	4,489	444	3
	0.05nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	5,126	262	3
	0.5nM VLD	1,257	23	3	8,284	1,195	3
	5nM VLD	21,739	653	3	16,572	1,237	3
	50nM VLD	40,200	2,121	3	28,080	1,871	3
	500nM VLD	47,628	1,520	3	31,541	3,672	3
	500nM RMF	0	0	3	3,590	389	3
AV16- TCR-H	0nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.005nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.05nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.5nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	5nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	50nM VLD	16,058	422	3	15,923	427	3
	500nM VLD	24,426	61	3	24,319	849	3
	500nM RMF	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
AV15- TCR-G	0nM VLD	219	15	3	260	33	3
	0.005nM VLD	219	56	3	429	196	3
	0.05nM VLD	549	102	3	854	54	3
	0.5nM VLD	1,850	258	3	2,265	391	3
	5nM VLD	7,034	497	3	6,424	616	3

10

20

30

40

50

	50nM VLD	23,558	1,135	3	23,733	1,748	3
	500nM VLD	31,629	1,790	3	27,473	663	3
	500nM RMF	235	33	3	416	199	3
AV14-TCR-F	0nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.005nM VLD	<LLOD	<LLOD	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.05nM VLD	4,088	1,334	3	<LLOD	<LLOD	3
	0.5nM VLD	12,141	321	3	10,419	934	3
	5nM VLD	26,510	1,161	3	25,934	611	3
	50nM VLD	42,858	1,197	3	40,326	2,516	3
	500nM VLD	50,607	2,350	3	51,106	2,385	3
	500nM RMF	1,230	938	3	<LLOD	<LLOD	3

10

20

【 0 3 4 9 】

実施例 19：改変 T 細胞の毒性の、CD107a 脱顆粒および細胞内サイトカイン染色（ICS）による定量

また、改変 T 細胞を、細胞毒性およびサイトカイン反応について、それぞれ CD107a の測定および細胞内サイトカイン染色を通じて、定量した。TRAC 遺伝子座のみを標的とする RNP、または TRAC 遺伝子座と TRBC 遺伝子座の両方を標的とする RNP を有する、表 35 に記載の AAV 鋳型配列を用いて、実施例 18 に記載の通りに、T 細胞を改変した。編集後 TCR+T 細胞をペプチドパルス標的細胞に 1：1 の E：T 細胞比で加えた以外は、実施例 18 に記載の通りに、HLA-02.01 陽性 T2 細胞株をパルスした。共培養物を 37℃で一晩インキュベートし、細胞の、表面マーカー CD3、CD4、CD8、および特定の TCRβ 鎖または四量体を染色した。表面染色の後、細胞を固定し、透過処理し、市販のキット（インビトロジェン社）を用いて細胞内の IFN-γ および TNFα の染色を行った。TCR 発現に対して誘発された免疫応答を、表 35 A および図 31 A～図 31 B に示す。TRBC ノックアウトを伴う、TCR の発現より生じた細胞毒性を、改変 T 細胞において CD107a を測定することにより、評価したところ、表 35 B および図 32 A～図 32 B に示す通りとなった。

30

40

50

【表 3 5 - 1】

表 3 5 A. 細胞内サイトカイン染色

試料名	VLDペプチド(nM)	CD8+TNFa+ IFNg+			CD4+TNFa+ IFNg+		
		平均%細胞	SD	N	平均%細胞	SD	N
AV11-TCR-A TRAC/TRBC	0	9.4	0.2	2	1.1	0.5	2
	0.005	21.0	0.1	2	1.6	0.5	2
	0.05	53.0	0.4	2	1.2	0.1	2
	0.5	74.3	1.3	2	1.8	0.4	2
	5	79.8	0.1	2	11.1	0.7	2
	50	81.3	1.0	2	25.1	2.0	2
	50 RMF	10.0	0.3	2	1.6	0.1	2
AV14-TCR-F TRACのみ	0	0.8	0.0	2	2.0	0.0	2
	0.005	1.0	0.2	2	1.9	0.0	2
	0.05	6.4	0.6	2	1.9	0.6	2
	0.5	44.1	1.5	2	1.3	0.1	2
	5	69.6	1.0	2	1.0	0.1	2
	50	74.1	0.2	2	1.3	0.5	2
	50 RMF	0.7	0.1	2	2.9	0.9	2
AV14-TCR-F TRAC/TRBC	0	1.3	0.0	2	1.2	0.3	2
	0.005	1.9	0.3	2	1.4	0.3	2
	0.05	8.5	0.3	2	1.1	0.5	2
	0.5	44.6	0.6	2	0.4	0.2	2
	5	68.0	1.8	2	0.3	0.0	2
	50	78.7	0.4	2	2.1	0.4	2
	50 RMF	1.8	0.1	2	1.5	0.0	2
AV15-TCR-G TRAC/TRBC	0	0.4	0.1	2	2.1	0.1	2
	0.005	7.6	0.9	2	1.6	0.2	2
	0.05	28.7	0.6	2	0.9	0.0	2
	0.5	46.5	1.3	2	0.6	0.0	2
	5	63.1	0.4	2	0.2	0.0	2
	50	71.4	1.2	2	0.1	0.1	2
	50 RMF	0.4	0.0	2	2.2	0.1	2

10

20

30

40

50

AV16- TCR-H TRAC/TRB C	0	0.5	0.1	2	3.1	0.1	2
	0.005	3.7	0.0	2	2.1	0.5	2
	0.05	27.1	1.0	2	3.0	0.6	2
	0.5	48.7	1.0	2	4.4	0.1	2
	5	67.5	1.5	2	6.0	0.1	2
	50	79.2	0.6	2	6.9	0.4	2
	50 RMF	0.6	0.4	2	2.9	0.5	2

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 2】

表 3 5 B. C D 1 0 7 a 脱顆粒

試料名	VLDペプチド(nM)	CD8+ CD107a+			CD4+ CD107a+		
		平均%細胞	SD	N	平均%細胞	SD	N
AV11-TCR-A TRAC/TRBC	0	21.95	1.06	2	4.45	1.51	2
	0.005	37.30	0.28	2	4.64	0.78	2
	0.05	64.10	0.57	2	4.68	0.44	2
	0.5	73.05	0.35	2	4.23	0.96	2
	5	75.80	1.84	2	11.85	0.49	2
	50	76.20	0.99	2	21.10	0.99	2
	50 RMF	22.05	0.49	2	4.30	0.28	2
AV14-TCR-F TRACのみ	0	6.33	0.03	2	7.14	0.52	2
	0.005	5.93	0.13	2	7.73	1.29	2
	0.05	10.30	0.00	2	7.39	1.10	2
	0.5	42.75	0.78	2	9.08	0.46	2
	5	57.05	0.92	2	8.35	0.36	2
	50	60.75	0.07	2	9.38	0.88	2
	50 RMF	5.42	0.02	2	6.63	0.76	2
AV14-TCR-F TRAC/TRBC	0	15.90	0.14	2	5.84	0.41	2
	0.005	14.75	0.92	2	5.14	0.03	2
	0.05	22.55	1.06	2	4.89	0.40	2
	0.5	63.15	1.34	2	4.94	0.90	2
	5	78.25	0.78	2	4.71	1.35	2
	50	82.05	0.78	2	5.14	1.26	2
	50 RMF	12.00	0.00	2	3.78	0.23	2
AV15-TCR-G TRAC/TRBC	0	3.15	0.40	2	4.62	0.47	2
	0.005	12.15	1.34	2	5.06	0.47	2
	0.05	34.25	1.06	2	4.23	1.06	2
	0.5	53.30	0.99	2	4.74	1.32	2
	5	65.75	0.64	2	4.44	0.88	2
	50	73.25	0.21	2	4.52	0.05	2
AV16-	50 RMF	2.82	0.37	2	4.67	0.65	2

10

20

30

40

50

TCR-H	0	2.29	0.07	2	3.42	0.60	2
TRAC/TR	0.005	5.05	0.17	2	3.63	0.46	2
BC	0.05	23.60	0.85	2	4.48	0.24	2
	0.5	45.65	0.92	2	6.82	0.24	2
	5	60.70	0.28	2	8.09	0.30	2
	50	70.55	1.06	2	8.28	0.08	2
	50 RMF	2.64	0.84	2	3.70	0.15	2

10

20

30

40

50

【0350】

実施例20：アロ反応性アッセイ

実施例18で作製された改変T細胞の、抗原提示細胞に対する非特異的な反応性についても、混合リンパ球培養反応（MLR）抑制アッセイで定量を行った。改変T細胞を、製造業者の取扱説明書に従い、CellTrace Violet（インビトロジェン社）で標識した。MACS（ミルテニー社）を用いて同種PBMCからCD3+細胞を枯渇させ、CTV標識T細胞の刺激に用いた。具体的には、 5×10^4 個のT細胞を、 3×10^4 個のCD3枯渇同種PBMCと共に、96ウェルU字底プレート（コーニング社）に播種した。5日後、細胞を回収し、抗CD4を用いて染色し、フローサイトメトリーで解析した。CellTrace Violet色素の希釈によって、増殖の程度を定量した。グルタミンを含むロズウェルパーク記念研究所（Roswell Park Memorial Institute）1640培地（RPMI；コーニング社）に、10%FBS、 $1 \times \text{GlutaMAX}$ 、10mM HEPES、 $1 \times$ ペニシリン／ストレプトマイシン、1mM ピルビン酸ナトリウム、 $50 \mu\text{M}$ 2-ME、および $1 \times$ 可欠アミノ酸を添加し、これをMLRアッセイの全体を通じて使用した。低レベルのCellTrace Violet（CTV）を有する染色細胞、すなわち増殖値が高い細胞、の平均割合を、表36および図33A～図33Bに示す。図33Aおよび図33Bは、CTVレベルのアッセイに用いたゲーティングを示している。表36並びに図33Cおよび図33Dに示されるように、それぞれの挿入TCRを試験した場合、CD4+細胞およびCD4-（CD8+）細胞の両方において、TRBC RNPで処理された細胞は、TRBC RNPで処理されていない細胞よりも少ない増殖を示した。

【0351】

【表 3 6】

表 3 6 : 同種 P B M C に応答した増殖

T Cell Type	試料名	TRAC RNP + TRBC RNP			TRAC RNP		
		平均%CTV 低蛍光細胞	SD	n	平均%CTV 低蛍光細胞	SD	n
CD4-	AV12-TCR-C	18%	13%	3	52%	2%	3
	AV11-TCR-A	16%	3%	3	70%	2%	3
	AV13-TCR-B	21%	5%	3	61%	2%	3
CD4+	AV12-TCR-C	14%	1%	3	36%	3%	3
	AV11-TCR-A	16%	7%	3	40%	2%	3
	AV13-TCR-B	22%	2%	3	32%	1%	3

10

【 0 3 5 2】

全ての鋳型は s s A A V として送達され、A A V 2 の 5 ' I T R および 3 ' I T R を含むことを留意されたい。ホモロジーアームは上記の通りである。多くが、追加で、下記の通りに、1 または複数のプロモーター、切断、またはポリ A 配列を含む。以下で、「*」は終止コドンを示している。

20

30

40

50

【表 3 7】

表 3 7

鋳型	導入遺伝子	プロモーターまたは(プロモーターレス/ペプチド)	TCR ORF配置	ポリ A
AV1 (配列番号613)	TCR-C	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV2 (配列番号614)	TCR-C	Ef1a-短	β -P2A- α -*	bGH
AV3 (配列番号615)	TCR-C	MND-1	β -P2A- α -*	bGH
AV4 (配列番号616)	TCR-C	MND-2	β -P2A- α -*	bGH
AV5 (配列番号617)	TCR-C	PGK	β -P2A- α -*	bGH
AV6 (配列番号618)	TCR-C	MND-1	β -P2A- α -*	bGH
AV7 (配列番号619)	TCR-C	PGK	β -P2A- α -*	bGH
AV8 (配列番号620)	TCR-C	MND-2	β -P2A- α -*	bGH
AV9 (配列番号621)	EGFP	EF1a	n/a	SV40
AV10 (配列番号622)	EGFP	(T2A)	n/a	bGH
AV11 (配列番号623)	TCR-A	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV12 (配列番号624)	TCR-C	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV13 (配列番号625)	TCR-B	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV14 (配列番号626)	TCR-F	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV15 (配列番号627)	TCR-G	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV16 (配列番号628)	TCR-H	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV18 (配列番号629)	TCR-D	EF1a	β -P2A- α -*	bGH
AV19 (配列番号630)	TCR-C	(T2A)	β -P2A- α -*	bGH
AV20 (配列番号631)	TCR-E	(T2A)	β -P2A- α -*	bGH
AV21 (配列番号632)	TCR-B	(T2A)	β -P2A- α -*	bGH

表 3 7 で定められた鋳型の要素は、以下の通りの配列に基づいて規定されている：

EF1a (配列番号 6 0 3) ; EF1 (配列番号 6 0 4) ; MND-1 (配列番号 6 0 5) ; MND-2 (配列番号 6 0 6) ; PGK (配列番号 6 0 7) ; T2A

(配列番号 6 0 8) ; P2A (配列番号 6 0 9) ; EGFP (配列番号 6 1 0) ;

SV40ポリA (配列番号 6 1 1) ; bGHポリA (配列番号 6 1 2)。

10

20

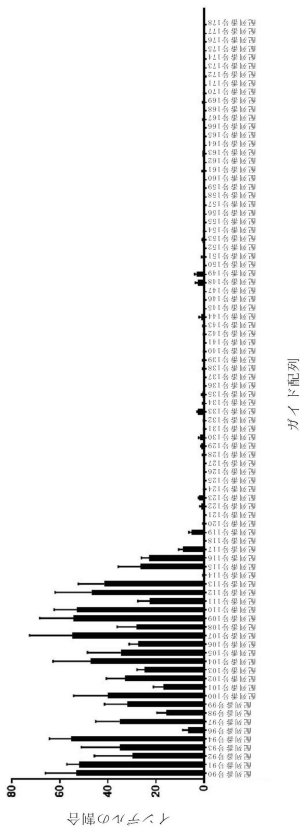
30

40

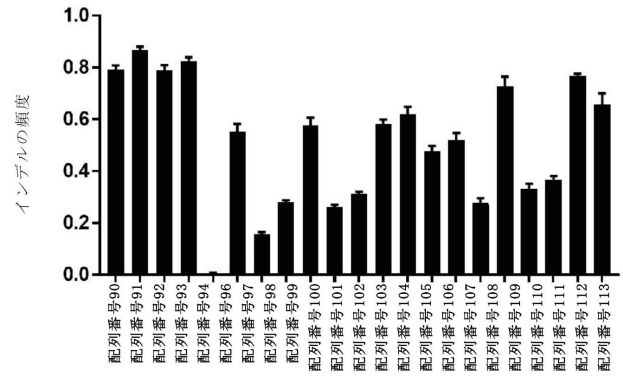
50

【図面】

【図 1】



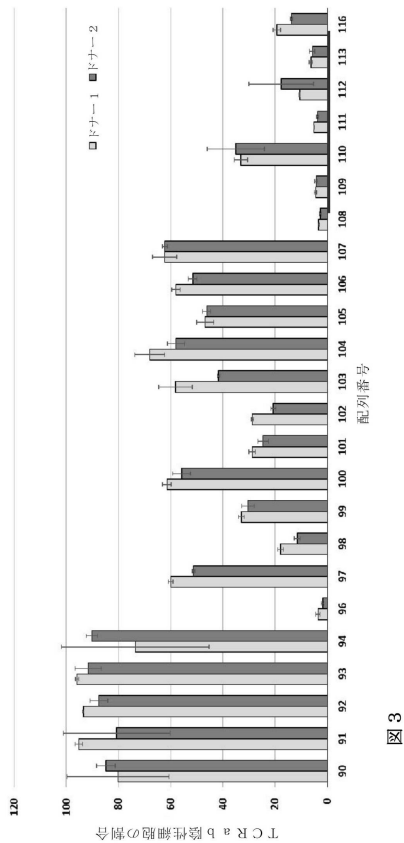
【図 2】



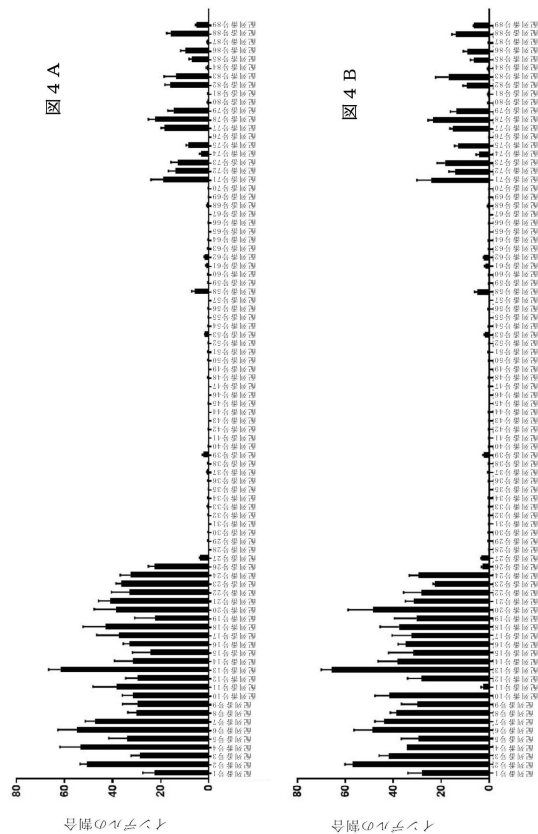
10

20

【図 3】



【図 4】



30

40

50

【図 5】

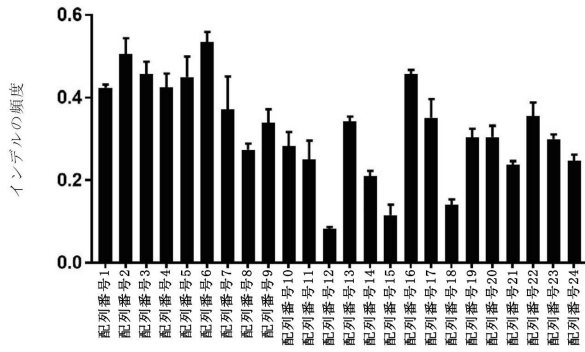


図 5

【図 6】

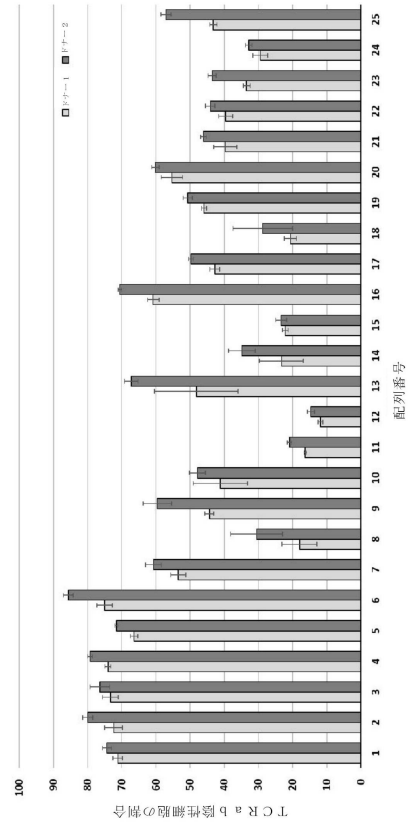


図 6

【図 7】

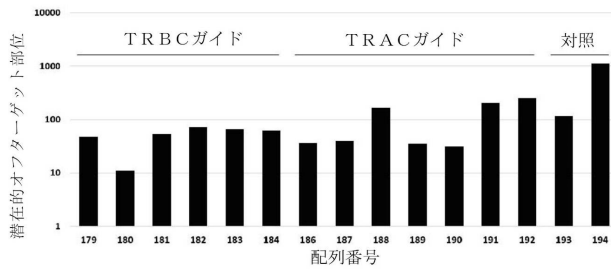


図 7 A

【図 8】

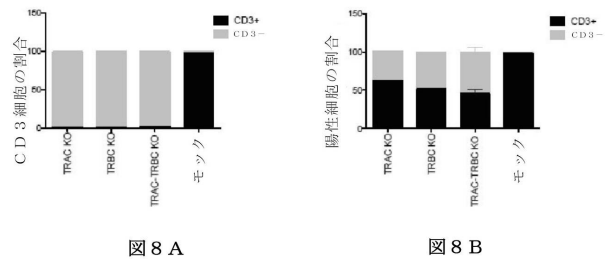


図 8 A

図 8 B

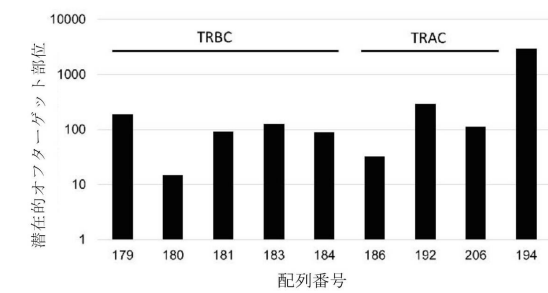


図 7 B

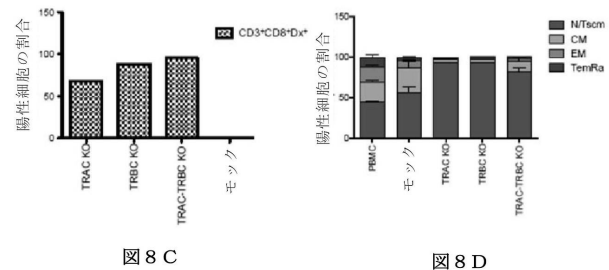


図 8 C

図 8 D

10

20

30

40

50

【図 9】

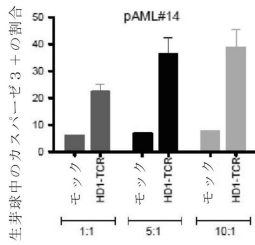


図 9 A

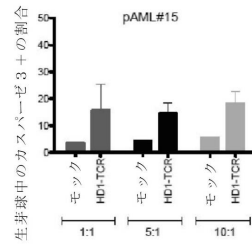


図 9 B

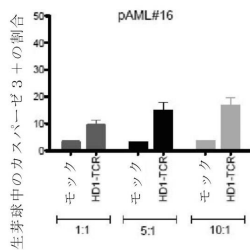


図 9 C

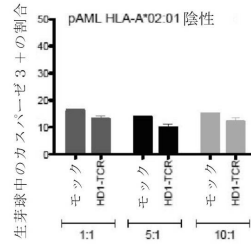


図 9 D

【図 10】

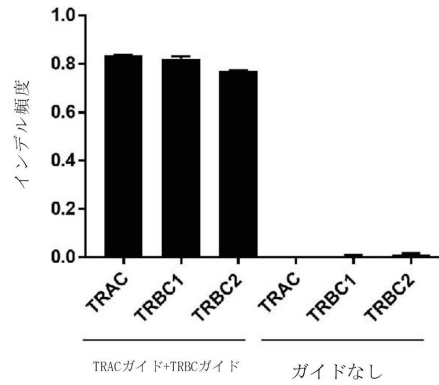


図 10

10

【図 11】

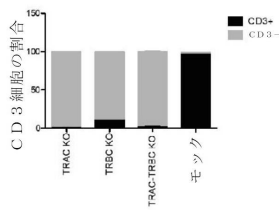


図 11 A

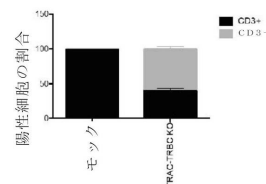


図 11 B

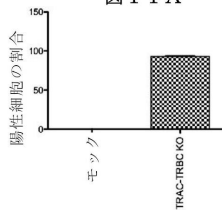


図 11 C

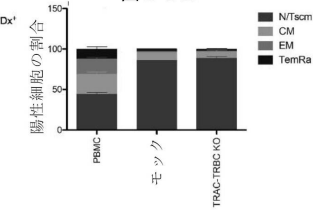


図 11 D

【図 12】

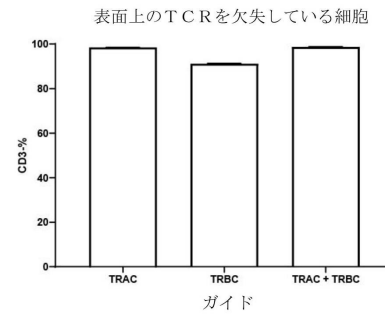


図 12 A

表面上の T C R を欠失している細胞

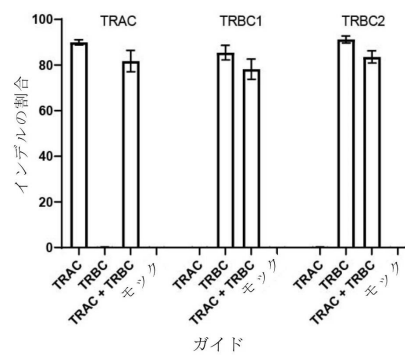


図 12 B

20

30

40

50

【図 1 3】

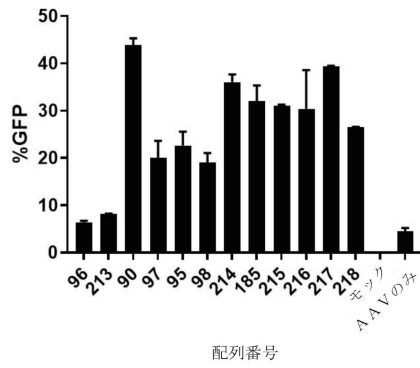


図 1 3 A

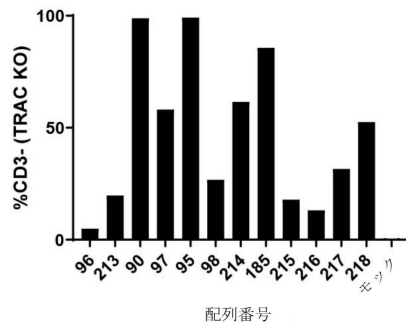


図 1 3 B

【図 1 4】

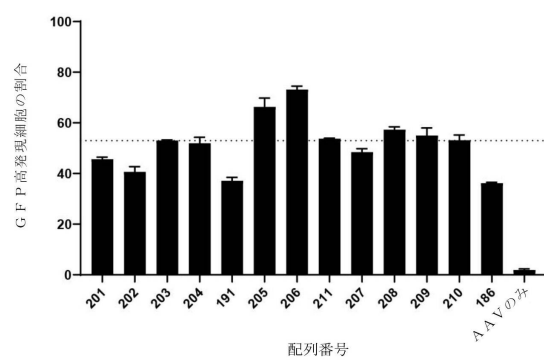


図 1 4 A

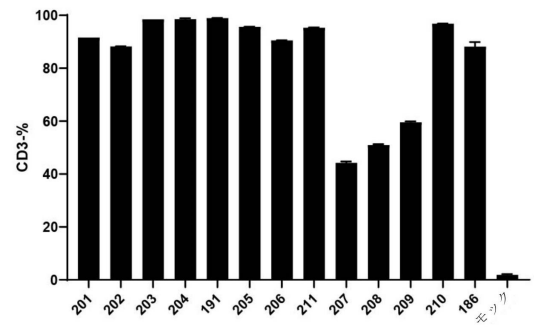


図 1 4 B

【図 1 5】

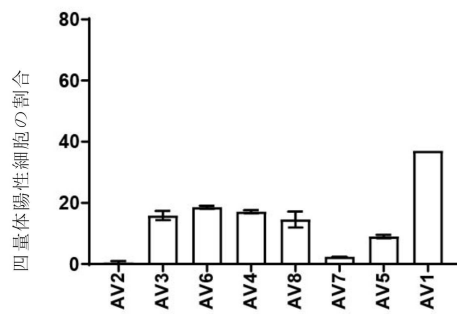


図 1 5 A

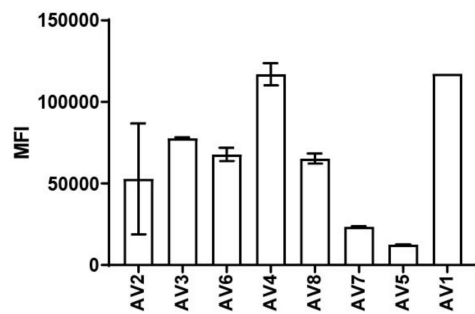


図 1 5 B

【図 1 6】

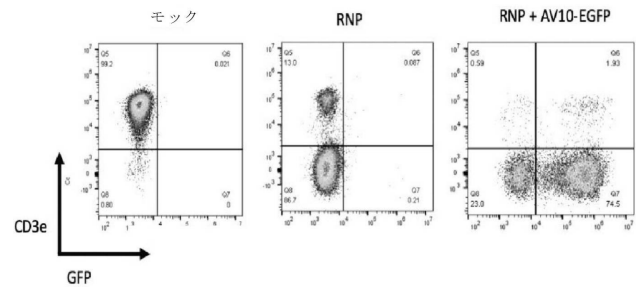


図 1 6 A

図 1 6 B

図 1 6 C

10

20

30

40

50

【図 17】

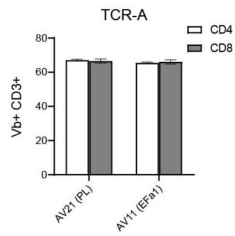


図 17 A

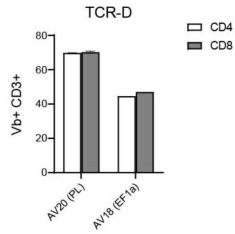


図 17 B

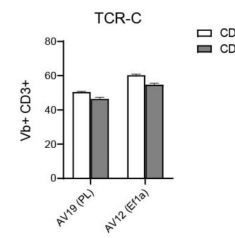


図 17 C

【図 18】

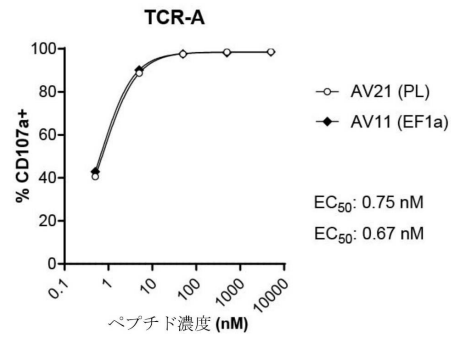


図 18 A

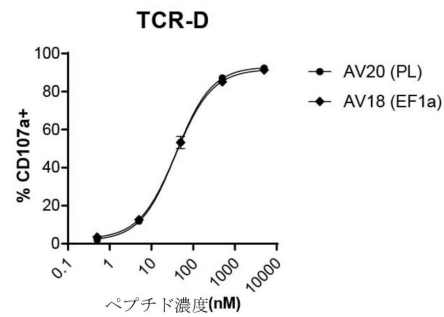


図 18 B

【図 19】

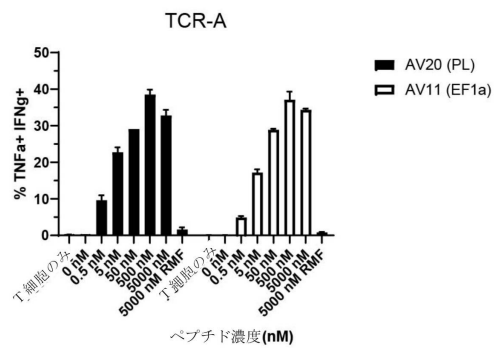


図 19 A

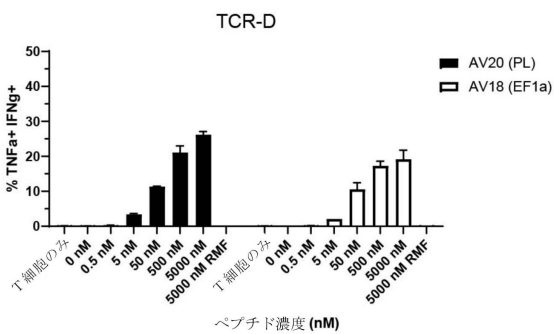


図 19 B

【図 20】

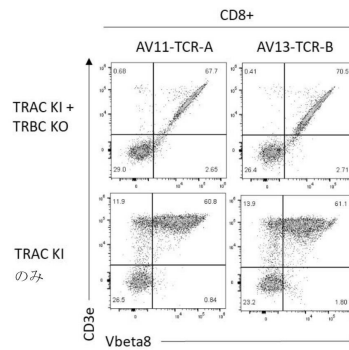


図 20 A

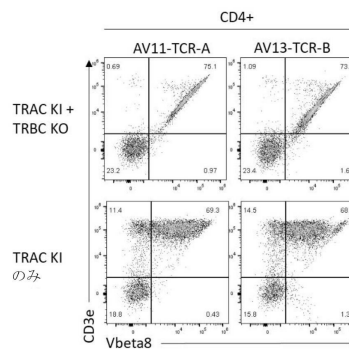


図 20 B

10

20

30

40

50

【図 2 1 - 1】

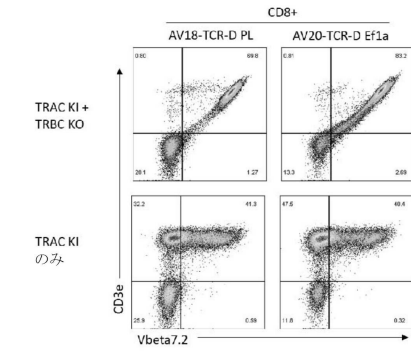


図 2 1 A

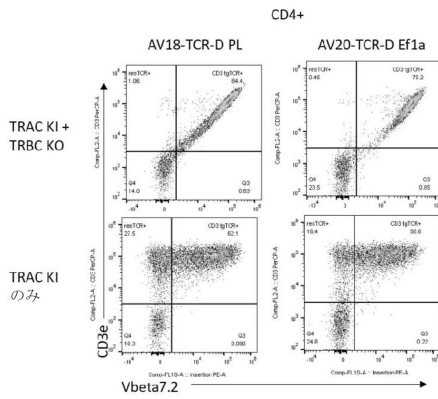


図 2 1 B

【図 2 1 - 2】

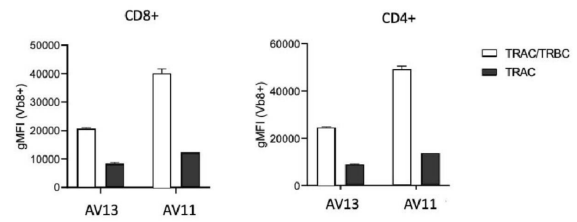


図 2 1 C

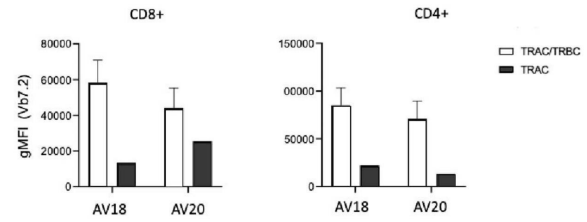


図 2 1 D

10

20

【図 2 2】

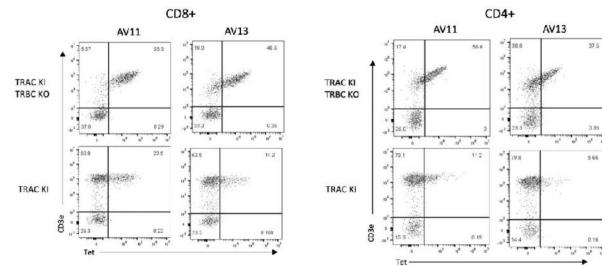


図 2 2

【図 2 3】

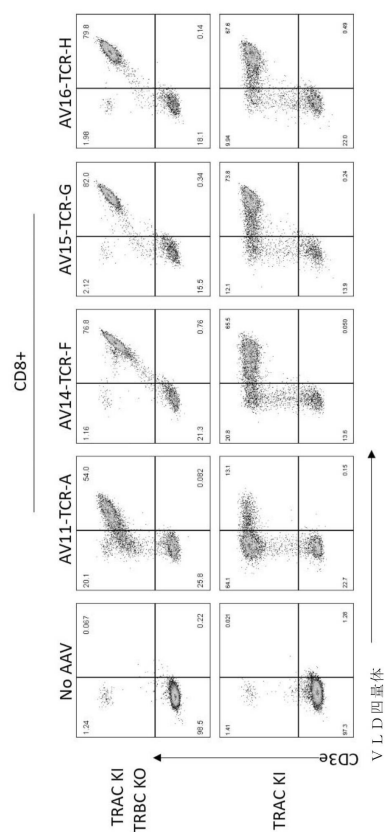


図 2 3

30

40

50

【図 2 4】

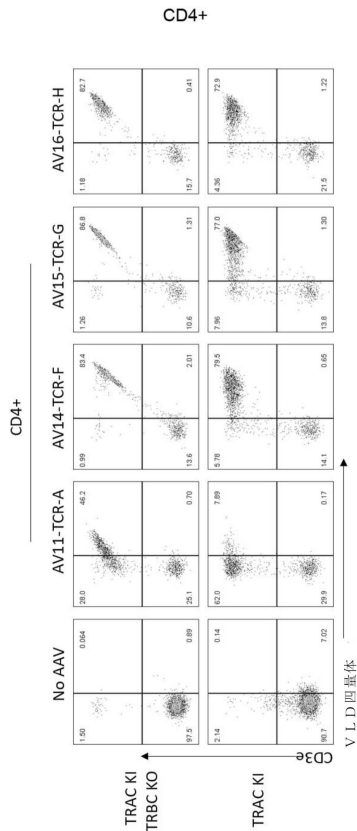


図 2 4

【図 2 5】

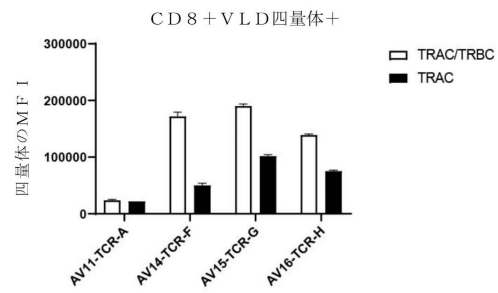


図 2 5

10

20

【図 2 6】

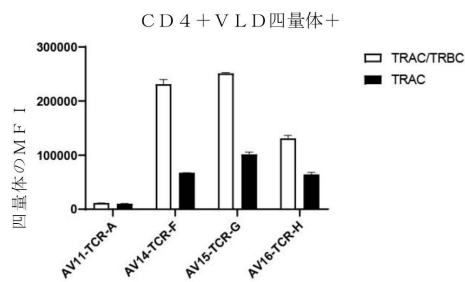


図 2 6

【図 2 7 - 1】

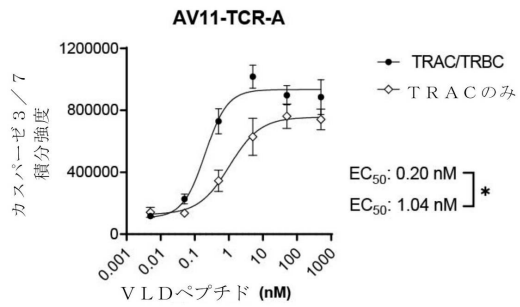


図 2 7 A

30

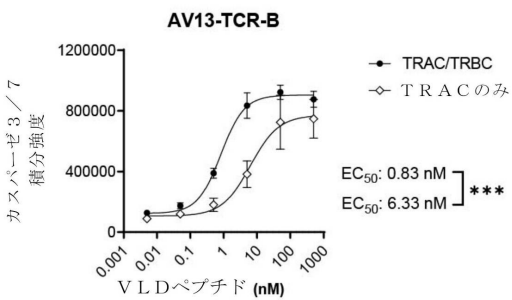
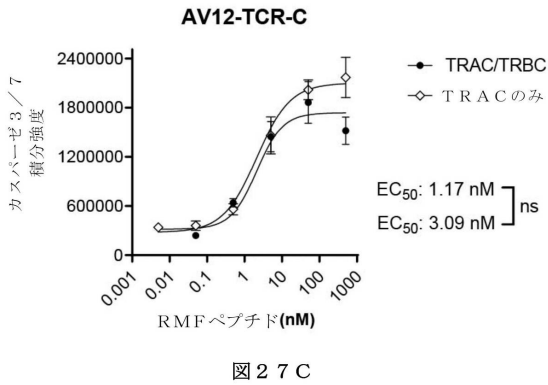


図 2 7 B

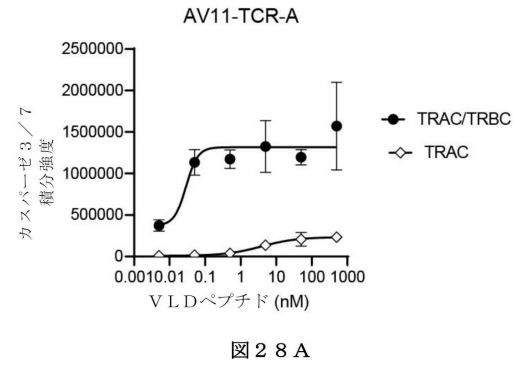
40

50

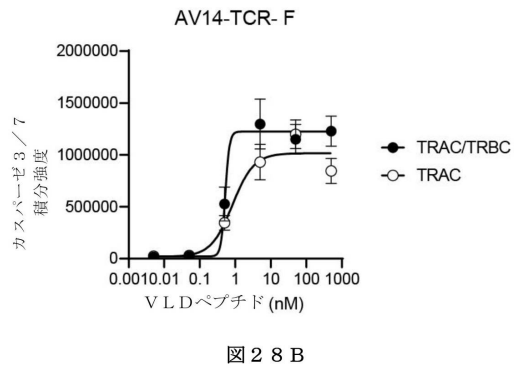
【図 27-2】



【図 28-1】

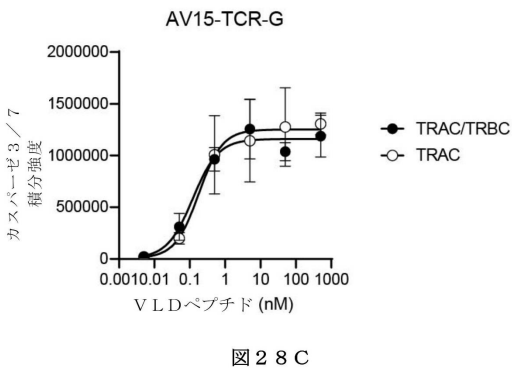


10



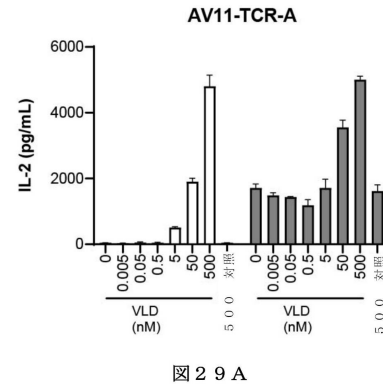
20

【図 28-2】

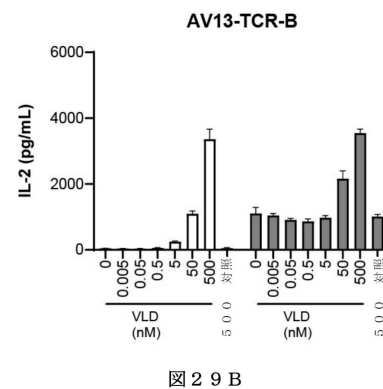
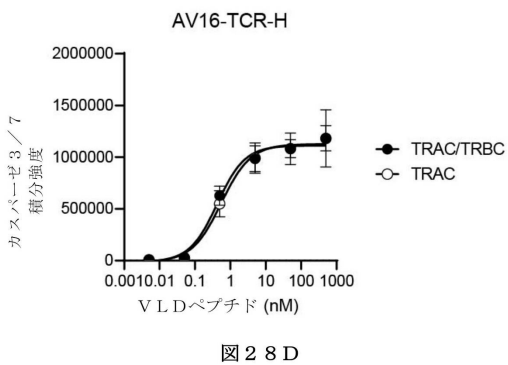


30

【図 29-1】

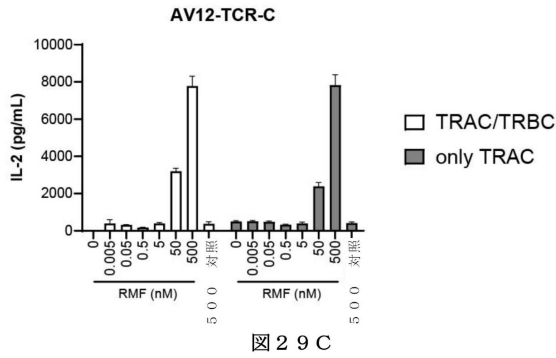


40

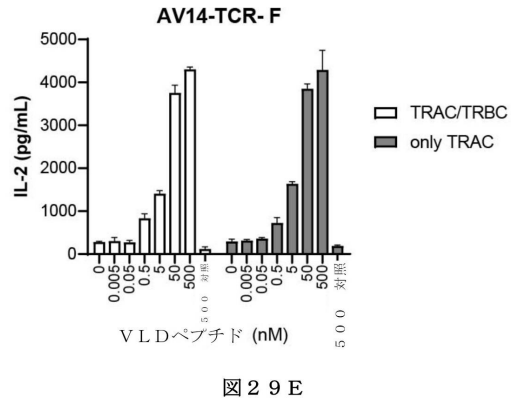


50

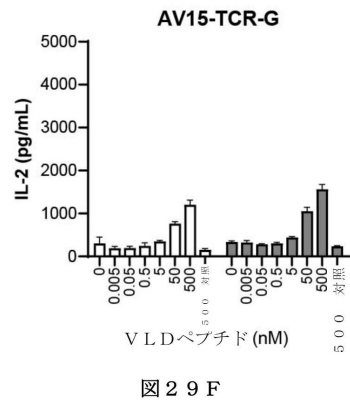
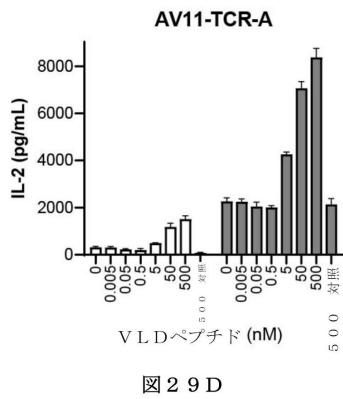
【図 29-2】



【図 29-3】

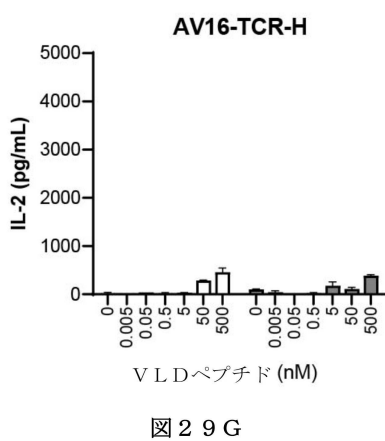


10

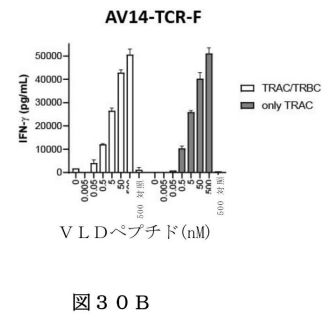
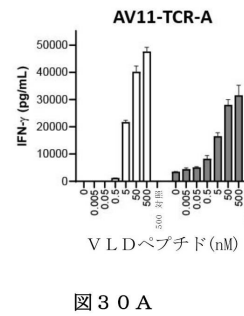


20

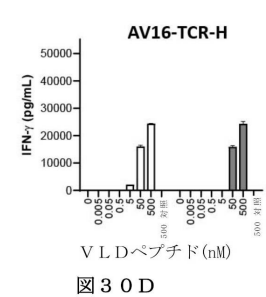
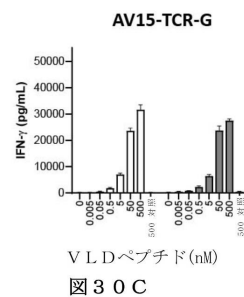
【図 29-4】



【図 30】



30



40

50

【図 3 1】

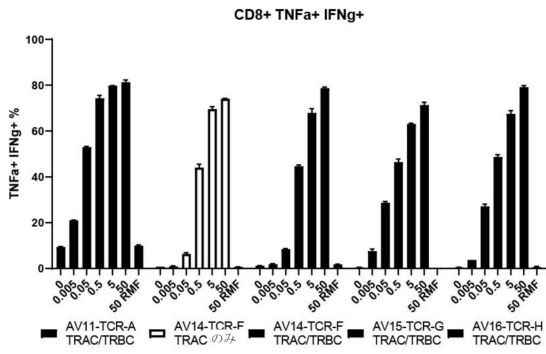


図 3 1 A

【図 3 2】

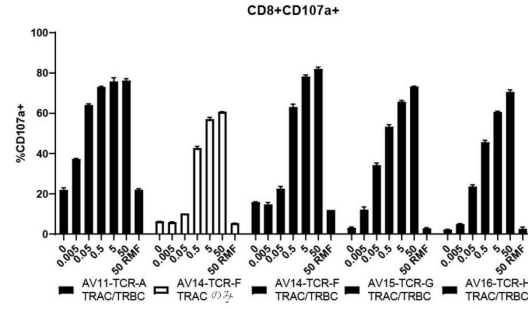


図 3 2 A

10

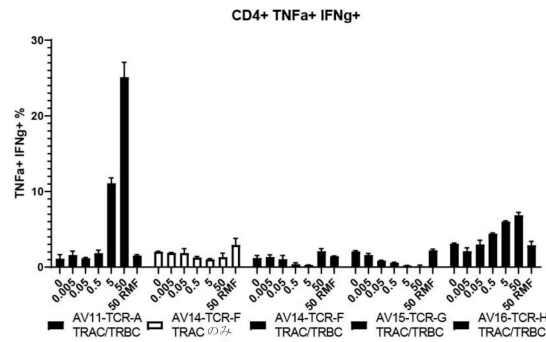


図 3 1 B

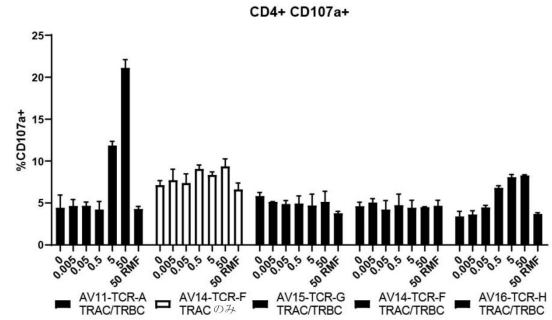


図 3 2 B

20

【図 3 3 - 1】

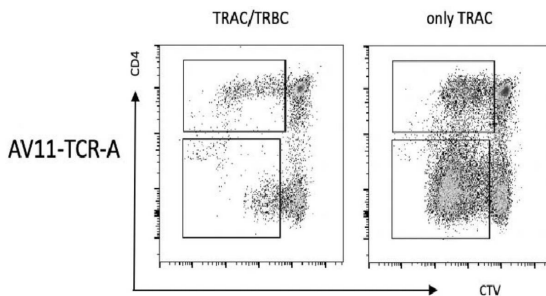


図 3 3 A

図 3 3 B

【図 3 3 - 2】

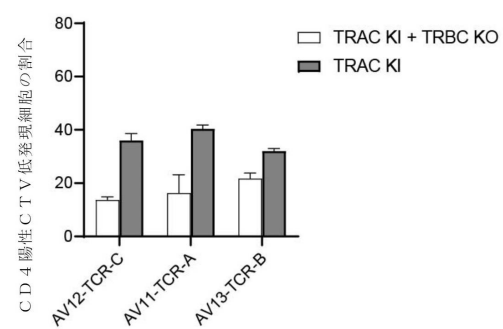


図 3 3 D

30

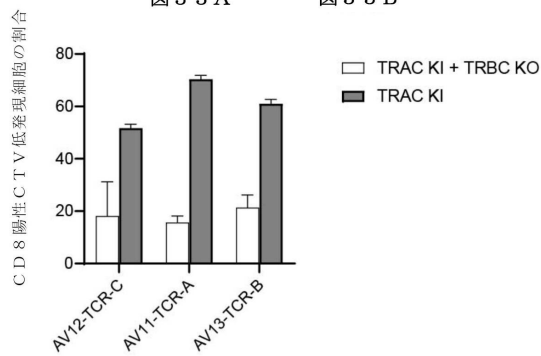


図 3 3 C

40

50

【配列表】

2022512703000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/056399

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/113 C12N15/90 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/161276 A2 (EDITAS MEDICINE INC [US]) 22 October 2015 (2015-10-22)	1-4, 19-22, 29-31, 36-39, 44-54, 56, 63-77, 79-82, 84, 86-89, 91-98, 100-138
Y	page 52ff; figure 12; example 3; sequences 390, 49365, 49373 the whole document ----- -/--	9-12,17, 18, 23-28, 58-62,99
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 January 2020		01/04/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Spindler, Mark-Peter

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/056399

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
138(completely); 1-4, 9-12, 15-31, 36-39, 44-54, 56, 58-77, 79-82, 84
86-89, 91-137(partially)

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/056399

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/160721 A1 (HARVARD COLLEGE [US]) 6 October 2016 (2016-10-06)	1-4, 19-22, 29-31, 36-39, 44-54, 56, 63-77, 79-82, 84, 86-89, 91-98, 100-138
Y	claims 1-7; figures 10-12; example 1; sequences 590, 598, 662 the whole document	9-12,17, 18, 23-28, 58-62,99
X	----- CN 107 746 831 A (NANJING BIOHENG BIOTECH CO LTD) 2 March 2018 (2018-03-02)	1-4, 9-12, 19-22, 36-38, 44-54, 56, 63-77, 79-82, 84, 86-89, 91-138
X	claims 1-5; figures 1-6; sequences 7, 9, 14 ----- WO 2014/153470 A2 (SANGAMO BIOSCIENCES INC [US]; OSPEDALE SAN RAFFAELE SRL [IT]) 25 September 2014 (2014-09-25)	44-54, 56, 58-77, 79-82, 126-137
Y	figure 1; examples 7, 8, 14 the whole document	9-12,17, 18, 23-28, 58-62,99
X	----- WO 2016/069282 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 6 May 2016 (2016-05-06)	44-54, 56, 58-77, 79-82, 84,86-88
Y	figures 1, 61; example 11 the whole document	9-12,17, 18, 23-28, 58-62
	----- -/--	

2

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

page 2 of 5

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/056399

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/161273 A1 (ADAPTIVE BIOTECHNOLOGIES CORP [US]; HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]) 6 October 2016 (2016-10-06) figure 4; example 1 the whole document	22,58-61
Y	WO 2017/112944 A1 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]; ADAPTIVE BIOTECHNOLOGIES CORP [US]) 29 June 2017 (2017-06-29) example 1; sequence 117 the whole document	22,58-61
X	JUSTIN EYQUEM ET AL: "Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection", NATURE, vol. 543, no. 7643, 22 February 2017 (2017-02-22), pages 113-117, XP055397283, London ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature21405 cited in the application	44-54
A	abstract; figure 1 the whole document	1-4, 9-12, 15-31, 36-39, 56, 58-77, 79-82, 84, 86-89, 91-138
X	WO 2016/154596 A1 (EDITAS MEDICINE INC [US]) 29 September 2016 (2016-09-29) page 188ff; example 4 the whole document	44-54
A		1-4, 9-12, 15-31, 36-39, 56, 58-77, 79-82, 84, 86-89, 91-138
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/056399

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/093969 A1 (NOVARTIS AG [CH]; INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 8 June 2017 (2017-06-08)	44-54
A	pages 1, 576ff; examples 5, 6 the whole document	1-4, 9-12, 15-31, 36-39, 56, 58-77, 79-82, 84, 86-89, 91-138
X,P	----- WO 2018/191490 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 18 October 2018 (2018-10-18)	1-4, 9-12, 17-22, 29-31, 36-39, 44-54, 56, 58-77, 79-82, 84, 86-89, 91-138
	figure 2A; example 1; sequence 6 the whole document	
X,P	----- WO 2019/086007 A1 (BIORAY LABORATORIES INC [CN]) 9 May 2019 (2019-05-09)	1-4, 9-12, 19-22, 29-31, 36-39, 44-54, 56, 63-77, 79-82, 84, 86-89, 91-138
	claims 1-10; figures 1-5; sequences 16, 17, 42 the whole document	
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/056399

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2019/089610 A1 (PACT PHARMA INC [US]) 9 May 2019 (2019-05-09) figure 6; example 3; sequence 22 the whole document -----	1-4, 9-12, 19-22, 29-31, 36-39, 44-54, 56, 63-77, 79-82, 84, 86-89, 91-138

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/056399

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015161276 A2	22-10-2015	AU 2015247323 A1 CA 2945335 A1 CN 108138183 A EP 3132030 A2 JP 2017513485 A KR 20170009865 A SG 10201809157V A SG 11201608701Q A US 2017175128 A1 WO 2015161276 A2	10-11-2016 22-10-2015 08-06-2018 22-02-2017 01-06-2017 25-01-2017 29-11-2018 29-11-2016 22-06-2017 22-10-2015
WO 2016160721 A1	06-10-2016	AU 2016243583 A1 BR 112017020750 A2 CA 2984237 A1 CN 107847524 A EP 3273976 A1 JP 2018510657 A KR 20180020125 A US 2016348073 A1 WO 2016160721 A1	16-11-2017 26-06-2018 06-10-2016 27-03-2018 31-01-2018 19-04-2018 27-02-2018 01-12-2016 06-10-2016
CN 107746831 A	02-03-2018	NONE	
WO 2014153470 A2	25-09-2014	AU 2014235968 A1 CA 2906970 A1 CN 105208866 A EP 2975942 A2 HK 1218232 A1 JP 6346266 B2 JP 2016515822 A US 2014301990 A1 US 2018214485 A1 WO 2014153470 A2	01-10-2015 25-09-2014 30-12-2015 27-01-2016 10-02-2017 20-06-2018 02-06-2016 09-10-2014 02-08-2018 25-09-2014
WO 2016069282 A1	06-05-2016	AU 2015339743 A1 AU 2015339744 A1 BR 112017008693 A2 CA 2964948 A1 CA 2964953 A1 CN 107206024 A CN 107249606 A EA 201790953 A1 EP 3215166 A1 EP 3215168 A1 JP 2017535261 A JP 2018500006 A KR 20170074245 A KR 20170075013 A US 2017290858 A1 US 2017335331 A1 US 2018312848 A1 WO 2016069282 A1 WO 2016069283 A1	27-04-2017 27-04-2017 27-02-2018 06-05-2016 06-05-2016 26-09-2017 13-10-2017 31-10-2017 13-09-2017 13-09-2017 30-11-2017 11-01-2018 29-06-2017 30-06-2017 12-10-2017 23-11-2017 01-11-2018 06-05-2016 06-05-2016
WO 2016161273 A1	06-10-2016	AU 2016242967 A1 CA 2979726 A1 EP 3277294 A1 US 2018080078 A1	28-09-2017 06-10-2016 07-02-2018 22-03-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/056399

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2016161273 A1	06-10-2016
WO 2017112944 A1	29-06-2017	EP 3394092 A1	31-10-2018
		US 2018369280 A1	27-12-2018
		WO 2017112944 A1	29-06-2017
WO 2016154596 A1	29-09-2016	EP 3274454 A1	31-01-2018
		US 2018112213 A1	26-04-2018
		WO 2016154596 A1	29-09-2016
WO 2017093969 A1	08-06-2017	AU 2016362129 A1	14-06-2018
		BR 112018011089 A2	04-12-2018
		CA 3006432 A1	08-06-2017
		CN 108699557 A	23-10-2018
		EA 201891338 A1	28-12-2018
		EP 3384027 A1	10-10-2018
		JP 2018536436 A	13-12-2018
		KR 20180133840 A	17-12-2018
		PH 12018501159 A1	21-01-2019
		RU 2018124295 A	13-01-2020
		SG 11201804373V A	28-06-2018
		US 2018362975 A1	20-12-2018
		WO 2017093969 A1	08-06-2017
WO 2018191490 A1	18-10-2018	TW 201903145 A	16-01-2019
		US 2019055297 A1	21-02-2019
		WO 2018191490 A1	18-10-2018
WO 2019086007 A1	09-05-2019	CN 109750035 A	14-05-2019
		WO 2019086007 A1	09-05-2019
WO 2019089610 A1	09-05-2019	TW 201934754 A	01-09-2019
		US 2019376086 A1	12-12-2019
		US 2019376091 A1	12-12-2019
		WO 2019089610 A1	09-05-2019

International Application No. PCT/ US2019/ 056399

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 138(completely); 1-4, 9-12, 15-31, 36-39, 44-54, 56, 58-77, 79-82, 84, 86-89, 91-137(partially)

implementations relating to a guide RNA targeting a TRBC1/2 gene region comprising a guide sequence defined by reference to SEQ ID NO: 1

- 2-95. claims: 139-226(completely); 1-4, 9-12, 15-31, 36-39, 44-54, 56, 58-77, 79-82, 84, 86-89, 91-137(partially)

implementations relating to a guide RNA targeting a TRBC1/2 gene region comprising a guide sequence defined by reference to one of SEQ ID NO: 2-89, 179-184, respectively; exact claim numbers vary depending on the invention

- 96-191. claims: 5-8, 32-35, 40-43, 55, 57, 78, 83, 85, 90, 227-322(completely); 1-4, 9-31, 36-39, 44-54, 56, 58-75, 79, 80, 86-89, 91-137(partially)

implementations relating to a guide RNA targeting a TRAC gene region comprising a guide sequence defined by reference to one of SEQ ID NO: 90-178, 185, 213-218, respectively; exact claim numbers vary depending on the invention

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)

A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/89	(2006.01)	C 1 2 N	15/89	Z
C 1 2 N	15/864	(2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z

,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,D
K,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),O
A(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,B
B,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,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ベッカー, エイミー メリッサ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 ゴエル, スルビ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 ヘッセ, サラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 ラスター, トロイ アーロン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 シュルテス, ビルギット

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 ヤジンスキ, ステファニー エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 ヴィネ, プージャ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 CA24 CA44

4C084 AA13 NA14 ZB071 ZB261

4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 BB65 CA04 CA12 NA14 ZB07 ZB26