

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

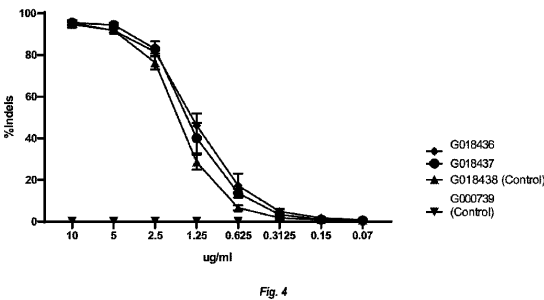
(11)公表番号
特表2024-506016
(P2024-506016A)

(43)公表日 令和6年2月8日(2024.2.8)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全180頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-547398(P2023-547398)				
(86)(22)出願日	令和4年2月7日(2022.2.7)				
(85)翻訳文提出日	令和5年10月3日(2023.10.3)				
(86)国際出願番号	PCT/US2022/015496				
(87)国際公開番号	WO2022/170193				
(87)国際公開日	令和4年8月11日(2022.8.11)				
(31)優先権主張番号	63/147,221				
(32)優先日	令和3年2月8日(2021.2.8)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				
(71)出願人	518196169 インテリア セラピューティクス, イン コーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー スト リート 4 0, スイート 1 3 0				
(74)代理人	100092783 弁理士 小林 浩				
(74)代理人	100093676 弁理士 小林 純子				
(74)代理人	100120134 弁理士 大森 規雄				
(74)代理人	100186897 弁理士 平川 さやか				
(72)発明者	コーク, ダニエル ライアン 最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 免疫療法のための T 細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン 3 (T I M 3) 組成物及び方法

(57)【要約】
T I M 3 遺伝子内で編集するための、例えば、DNA 配列を改変するための組成物及び方法が提供される。免疫療法のための組成物及び方法が提供される。
【選択図】 図 4



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

c h r 5 : 1 5 7 0 8 5 8 3 2 - 1 5 7 1 0 9 0 4 4 のゲノム座標内に、ヒト T I M 3 配列における遺伝子修飾を含む、操作された細胞。

【請求項 2】

前記遺伝子修飾が、挿入、欠失、及び置換から選択される、請求項 1 に記載の操作された細胞。

【請求項 3】

前記遺伝子修飾が、前記 T I M 3 遺伝子の発現を阻害する、請求項 1 または 2 に記載の操作された細胞。

【請求項 4】

前記遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標：

10

20

30

40

50

【表 1】

TIM3番号	ゲノム座標(hg38)
TIM3-1	chr5:157106867-157106887
TIM3-2	chr5:157106862-157106882
TIM3-3	chr5:157106803-157106823
TIM3-4	chr5:157106850-157106870
TIM3-5	chr5:157104726-157104746
TIM3-6	chr5:157106668-157106688
TIM3-7	chr5:157104681-157104701
TIM3-8	chr5:157104681-157104701
TIM3-9	chr5:157104680-157104700
TIM3-10	chr5:157106676-157106696
TIM3-11	chr5:157087271-157087291
TIM3-12	chr5:157095432-157095452
TIM3-13	chr5:157095361-157095381
TIM3-14	chr5:157095360-157095380
TIM3-15	chr5:157108945-157108965
TIM3-18	chr5:157106751-157106771
TIM3-19	chr5:157095419-157095439
TIM3-22	chr5:157104679-157104699
TIM3-23	chr5:157106824-157106844
TIM3-26	chr5:157087117-157087137
TIM3-29	chr5:157095379-157095399
TIM3-32	chr5:157106864-157106884
TIM3-42	chr5:157095405-157095425
TIM3-44	chr5:157095404-157095424
TIM3-56	chr5:157106888-157106908
TIM3-58	chr5:157087126-157087146
TIM3-59	chr5:157087253-157087273
TIM3-62	chr5:157106889-157106909
TIM3-63	chr5:157106935-157106955
TIM3-66	chr5:157106641-157106661
TIM3-69	chr5:157087084-157087104
TIM3-75	chr5:157104663-157104683
TIM3-82	chr5:157106875-157106895
TIM3-86	chr5:157087184-157087204
TIM3-87	chr5:157106936-157106956
TIM3-88	chr5:157104696-157104716

10

20

30

40

50

または

TIM3-1~TIM3-4、TIM3-6~TIM3-15、TIM3-18、TIM3-19、TIM3-22、TIM3-29、TIM3-42、TIM3-44、TIM3-58、TIM3-62、TIM3-69、TIM3-82、TIM3-86、及びTIM3-88によって標的とされるものから選択されるゲノム座標：chr5:157106867-157106887、chr5:157106862-157106882、chr5:157106803-157106823、chr5:157106850-157106870、chr5:157106668-157106688、chr5:157104681-157104701、chr5:157104681-157104701、chr5:157104680-157104700、chr5:1571

06676-157106696、chr5:157087271-157087291
 、chr5:157095432-157095452、chr5:157095361
 -157095381、chr5:157095360-157095380、chr5
 :157108945-157108965、chr5:157106751-1571
 06771、chr5:157095419-157095439、chr5:1571
 04679-157104699、chr5:157095379-157095399
 、chr5:157095405-157095425、chr5:157095404
 -157095424、chr5:157087126-157087146、chr5
 :157106889-157106909、chr5:157087084-1570
 87104、chr5:157106875-157106895、chr5:1570 10
 87184-157087204、及びchr5:157104696-1571047
 16、または
 TIM3-1~TIM3-5、TIM3-7、TIM3-8、TIM3-12~TIM3
 -15、TIM3-23、TIM3-26、TIM3-32、TIM3-56、TIM3
 -59、TIM3-63、TIM3-66、TIM3-75、及びTIM3-87によっ
 て標的とされるものから選択されるゲノム座標: chr5:157106867-157
 106887、chr5:157106862-157106882、chr5:157
 106803-157106823、chr5:157106850-15710687
 0、chr5:157106668-157106688、chr5:15710468
 1-157104701、chr5:157104681-157104701、chr 20
 5:157095432-157095452、chr5:157095361-157
 095381、chr5:157095360-157095380、chr5:157
 108945-157108965、chr5:157106824-15710684
 4、chr5:157087117-157087137、chr5:15710686
 4-157106884、chr5:157106888-157106908、chr
 5:157087253-157087273、chr5:157106935-157
 106955、chr5:157106641-157106661、chr5:157
 104663-157104683、及びchr5:157106936-157106
 956、または
 TIM3-2、TIM3-4、TIM3-15、TIM3-23、TIM3-56、TI 30
 M3-59、TIM3-63、TIM3-75、及びTIM3-87によって標的とされ
 るものから選択されるゲノム座標: それぞれ、chr5:157106862-1571
 06882、chr5:157106850-157106870、chr5:1571
 08945-157108965、chr5:157106824-157106844
 、chr5:157106888-157106908、chr5:157087253
 -157087273、chr5:157106935-157106955、chr5
 :157104663-157104683、及びchr5:157106936-15
 7106956、または
 TIM3-1~TIM3-4によって標的とされるものから選択されるゲノム座標: ch 40
 r5:157106867-157106887、chr5:157106862-15
 7106882、chr5:157106803-157106823、及びchr5:
 157106850-157106870、または
 TIM3-2、TIM3-4、及びTIM3-15によって標的とされるものから選択され
 るゲノム座標: chr5:157106862-157106882、chr5:157
 106850-157106870、及びchr5:157108945-157108
 965、または
 TIM3-2、TIM3-4、TIM3-15、TIM3-63、及びTIM3-87によ
 って標的とされるものから選択されるゲノム座標: chr5:157106862-15
 7106882、chr5:157106850-157106870、chr5:15
 7108945-157108965、chr5:157106935-1571069 50

55、及びchr5:157106936-157106956y、またはTIM3-2及びTIM3-15によって標的とされるものから選択されるゲノム座標:chr5:157106862-157106882及びchr5:157108945-157108965、またはTIM3-63及びTIM3-87によって標的とされるものから選択されるゲノム座標:chr5:157106935-157106955及びchr5:157106936-157106956、またはTIM3-15によって標的とされるものから選択されるゲノム座標:chr5:157108945-157108965内に少なくとも1個のヌクレオチドの修飾を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の操作された細胞。

10

【請求項5】

前記操作された細胞が、内因性T細胞受容体(TCR)配列のゲノム座標内の遺伝子修飾を含み、前記遺伝子修飾が、TCR遺伝子の発現を阻害し、任意選択で、前記TCR遺伝子が、TRACまたはTRBCである、請求項1～4のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項6】

以下から選択されるゲノム座標内にTRBCの遺伝子修飾を含む、請求項5に記載の操作された細胞。

20

30

40

50

【表 2 - 1】

TRBC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRBC-1	chr7:142791996-142792016
TRBC-2	chr7:142792047-142792067
TRBC-3	chr7:142792008-142792028
TRBC-4	chr7:142791931-142791951
TRBC-5	chr7:142791930-142791950
TRBC-6	chr7:142791748-142791768
TRBC-7	chr7:142791720-142791740
TRBC-8	chr7:142792041-142792061
TRBC-9	chr7:142802114-142802134
TRBC-10	chr7:142792009-142792029
TRBC-11	chr7:142792697-142792717
TRBC-12	chr7:142791963-142791983
TRBC-13	chr7:142791976-142791996
TRBC-14	chr7:142791974-142791994
TRBC-15	chr7:142791970-142791990
TRBC-16	chr7:142791948-142791968
TRBC-17	chr7:142791913-142791933
TRBC-18	chr7:142791961-142791981
TRBC-19	chr7:142792068-142792088
TRBC-20	chr7:142791975-142791995
TRBC-21	chr7:142791773-142791793
TRBC-22	chr7:142791919-142791939
TRBC-23	chr7:142791834-142791854
TRBC-24	chr7:142791878-142791898
TRBC-25	chr7:142802141-142802161
TRBC-26	chr7:142791844-142791864
TRBC-27	chr7:142801154-142801174
TRBC-28	chr7:142791961-142791981
TRBC-29	chr7:142792001-142792021
TRBC-30	chr7:142791979-142791999
TRBC-31	chr7:142792041-142792061
TRBC-32	chr7:142792003-142792023
TRBC-33	chr7:142791984-142792004
TRBC-34	chr7:142792002-142792022
TRBC-35	chr7:142791966-142791986
TRBC-36	chr7:142792007-142792027
TRBC-37	chr7:142791993-142792013

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

TRBC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRBC-38	chr7:142791902-142791922
TRBC-39	chr7:142791724-142791744
TRBC-40	chr7:142791973-142791993
TRBC-41	chr7:142791920-142791940
TRBC-42	chr7:142791994-142792014
TRBC-43	chr7:142791887-142791907
TRBC-44	chr7:142791907-142791927
TRBC-45	chr7:142791952-142791972
TRBC-46	chr7:142791721-142791741
TRBC-47	chr7:142792718-142792738
TRBC-48	chr7:142791729-142791749
TRBC-49	chr7:142791911-142791931
TRBC-50	chr7:142791867-142791887
TRBC-51	chr7:142791899-142791919
TRBC-52	chr7:142791727-142791747
TRBC-53	chr7:142791949-142791969
TRBC-54	chr7:142791933-142791953
TRBC-55	chr7:142791932-142791952
TRBC-56	chr7:142792057-142792077
TRBC-57	chr7:142791940-142791960
TRBC-58	chr7:142791747-142791767
TRBC-59	chr7:142791881-142791901
TRBC-60	chr7:142791779-142791799
TRBC-61	chr7:142792054-142792074
TRBC-62	chr7:142792069-142792089
TRBC-63	chr7:142792712-142792732
TRBC-64	chr7:142791729-142791749
TRBC-65	chr7:142791821-142791841
TRBC-66	chr7:142792052-142792072
TRBC-67	chr7:142791916-142791936
TRBC-68	chr7:142791899-142791919
TRBC-69	chr7:142791772-142791792

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

TRBC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRBC-70	chr7:142792714-142792734
TRBC-71	chr7:142792042-142792062
TRBC-72	chr7:142791962-142791982
TRBC-73	chr7:142791988-142792008
TRBC-74	chr7:142791982-142792002
TRBC-75	chr7:142792049-142792069
TRBC-76	chr7:142791839-142791859
TRBC-77	chr7:142791893-142791913
TRBC-78	chr7:142791945-142791965
TRBC-79	chr7:142791964-142791984
TRBC-80	chr7:142791757-142791777
TRBC-81	chr7:142792048-142792068
TRBC-82	chr7:142791774-142791794
TRBC-83	chr7:142792048-142792068
TRBC-84	chr7:142791830-142791850
TRBC-85	chr7:142791909-142791929
TRBC-86	chr7:142791912-142791932
TRBC-87	chr7:142791766-142791786
TRBC-88	chr7:142791880-142791900
TRBC-89	chr7:142791919-142791939

10

20

【請求項 7】

以下から選択されるゲノム座標内に T R A C の遺伝子修飾を含むか、

30

40

50

【表 3 - 1】

TRAC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRAC-90	chr14:22547524-22547544
TRAC-91	chr14:22550581-22550601
TRAC-92	chr14:22550608-22550628
TRAC-93	chr14:22550611-22550631
TRAC-94	chr14:22550622-22550642
TRAC-95	chr14:22547529-22547549
TRAC-96	chr14:22547512-22547532
TRAC-97	chr14:22547525-22547545
TRAC-98	chr14:22547536-22547556
TRAC-99	chr14:22547575-22547595
TRAC-100	chr14:22547640-22547660
TRAC-101	chr14:22547647-22547667
TRAC-102	chr14:22547777-22547797
TRAC-103	chr14:22549638-22549658
TRAC-104	chr14:22549646-22549666
TRAC-105	chr14:22550600-22550620
TRAC-106	chr14:22550605-22550625
TRAC-107	chr14:22550625-22550645
TRAC-108	chr14:22539116-22539136
TRAC-109	chr14:22539120-22539140
TRAC-110	chr14:22547518-22547538
TRAC-111	chr14:22539082-22539102
TRAC-112	chr14:22539061-22539081
TRAC-113	chr14:22539097-22539117
TRAC-114	chr14:22547697-22547717
TRAC-115	chr14:22550571-22550591
TRAC-116	chr14:22550631-22550651
TRAC-117	chr14:22550658-22550678
TRAC-118	chr14:22547712-22547732
TRAC-119	chr14:22550636-22550656
TRAC-120	chr14:22550636-22550656
TRAC-121	chr14:22550582-22550602
TRAC-122	chr14:22550606-22550626
TRAC-123	chr14:22550609-22550629
TRAC-124	chr14:22547691-22547711
TRAC-125	chr14:22547576-22547596
TRAC-126	chr14:22549648-22549668

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

TRAC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRAC-127	chr14:22549660-22549680
TRAC-128	chr14:22547716-22547736
TRAC-129	chr14:22547514-22547534
TRAC-130	chr14:22550662-22550682
TRAC-131	chr14:22550593-22550613
TRAC-132	chr14:22550612-22550632
TRAC-133	chr14:22547521-22547541
TRAC-134	chr14:22547540-22547560
TRAC-135	chr14:22539121-22539141
TRAC-136	chr14:22547632-22547652
TRAC-137	chr14:22547674-22547694
TRAC-138	chr14:22549643-22549663
TRAC-139	chr14:22547655-22547675
TRAC-140	chr14:22547667-22547687
TRAC-141	chr14:22539085-22539105
TRAC-142	chr14:22549634-22549654
TRAC-143	chr14:22539064-22539084
TRAC-144	chr14:22547639-22547659
TRAC-145	chr14:22547731-22547751
TRAC-146	chr14:22547734-22547754
TRAC-147	chr14:22547591-22547611
TRAC-148	chr14:22547657-22547677
TRAC-149	chr14:22547519-22547539
TRAC-150	chr14:22549674-22549694
TRAC-151	chr14:22547678-22547698
TRAC-152	chr14:22539087-22539107
TRAC-153	chr14:22547595-22547615
TRAC-154	chr14:22547633-22547653
TRAC-155	chr14:22547732-22547752
TRAC-156	chr14:22547656-22547676
TRAC-157	chr14:22539086-22539106

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

TRAC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRAC-158	chr14:22547491-22547511
TRAC-159	chr14:22547618-22547638
TRAC-160	chr14:22549644-22549664
TRAC-161	chr14:22547522-22547542
TRAC-162	chr14:22539089-22539109
TRAC-163	chr14:22539062-22539082
TRAC-164	chr14:22547597-22547617
TRAC-165	chr14:22547677-22547697
TRAC-166	chr14:22549645-22549665
TRAC-167	chr14:22550610-22550630
TRAC-168	chr14:22547511-22547531
TRAC-169	chr14:22550607-22550627
TRAC-170	chr14:22550657-22550677
TRAC-171	chr14:22550604-22550624
TRAC-172	chr14:22539132-22539152
TRAC-173	chr14:22550632-22550652
TRAC-174	chr14:22547571-22547591
TRAC-175	chr14:22547711-22547731
TRAC-176	chr14:22547666-22547686
TRAC-177	chr14:22547567-22547587
TRAC-178	chr14:22547624-22547644
TRAC-185	chr14:22547501-22547521
TRAC-213	chr14:22547519-22547539
TRAC-214	chr14:22547556-22547576
TRAC-215	chr14:22547486-22547506
TRAC-216	chr14:22547487-22547507
TRAC-217	chr14:22547493-22547513
TRAC-218	chr14:22547502-22547522

10

20

30

40

50

または前記遺伝子修飾が、chr14:22547524-22547544、chr14:22547529-22547549、chr14:22547525-22547545、chr14:22547536-22547556、chr14:22547501-22547521、chr14:22547556-22547576、及びchr14:22547502-22547522から選択されるゲノム座標内にある、請求項4～6のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項8】

前記細胞が、遺伝子修飾を含み、前記遺伝子修飾が、1つ以上のMHCクラスIタンパク質の発現を阻害する、請求項1～7のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項9】

1つ以上のMHCクラスIタンパク質の発現を阻害する前記遺伝子修飾が、B2M配列における遺伝子修飾であり、前記遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標内にある、請求項8に記載の操作された細胞。

【表 4 - 1】

B2M番号:	ゲノム位置(hg38)
B2M-1	chr15:44711469-44711494
B2M-2	chr15:44711472-44711497
B2M-3	chr15:44711483-4471 1508
B2M-4	chr15:44711486-44711511
B2M-5	chr15:44711487-44711512
B2M-6	chr15:44711512-44711537
B2M-7	chr15:44711513-44711538
B2M-8	chr15:44711534-44711559
B2M-9	chr15:44711568-44711593
B2M-10	chr15:44711573-44711598
B2M-11	chr15:44711576-44711601
B2M-12	chr15:44711466-44711491
B2M-13	chr15:44711522-44711547
B2M-14	chr15:44711544-44711569
B2M-15	chr15:44711559-44711584
B2M-16	chr15:44711565-44711590
B2M-17	chr15:44711599-44711624
B2M-18	chr15:44711611-44711636
B2M-19	chr15:44715412-44715437
B2M-20	chr15:44715440-44715465
B2M-21	chr15:44715473-44715498
B2M-22	chr15:44715474-44715499
B2M-23	chr15:44715515-44715540
B2M-24	chr15:44715535-44715560
B2M-25	chr15:44715562-44715587
B2M-26	chr15:44715567-44715592
B2M-27	chr15:44715672-44715697
B2M-28	chr15:44715673-44715698
B2M-29	chr15:44715674-44715699
B2M-30	chr15:44715410-44715435
B2M-31	chr15:44715411-44715436
B2M-32	chr15:44715419-44715444
B2M-33	chr15:44715430-44715455
B2M-34	chr15:44715457-44715482
B2M-35	chr15:44715483-44715508
B2M-36	chr15:44715511-44715536
B2M-37	chr15:44715515-44715540

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

B2M番号:	ゲノム位置(hg38)
B2M-38	chr15:44715629-44715654
B2M-39	chr15:44715630-44715655
B2M-40	chr15:44715631-44715656
B2M-41	chr15:44715632-44715657
B2M-42	chr15:44715653-44715678
B2M-43	chr15:44715657-44715682
B2M-44	chr15:44715666-44715691
B2M-45	chr15:44715685-44715710
B2M-46	chr15:44715686-44715711
B2M-47	chr15:44716326-44716351
B2M-48	chr15:44716329-44716354
B2M-49	chr15:44716313-44716338
B2M-50	chr15:44717599-44717624
B2M-51	chr15:44717604-44717629
B2M-52	chr15:44717681-44717706
B2M-53	chr15:44717682-44717707
B2M-54	chr15:44717702-44717727
B2M-55	chr15:44717764-44717789
B2M-56	chr15:44717776-44717801
B2M-57	chr15:44717786-44717811
B2M-58	chr15:44717789-44717814
B2M-59	chr15:44717790-44717815
B2M-60	chr15:44717794-44717819
B2M-61	chr15:44717805-44717830
B2M-62	chr15:44717808-44717833
B2M-63	chr15:44717809-44717834
B2M-64	chr15:44717810-44717835
B2M-65	chr15:44717846-44717871
B2M-66	chr15:44717945-44717970
B2M-67	chr15:44717946-44717971
B2M-68	chr15:44717947-44717972
B2M-69	chr15:44717948-44717973
B2M-70	chr15:44717973-44717998

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

B2M番号:	ゲノム位置(hg38)
B2M-71	chr15:44717981-44718006
B2M-72	chr15:44718056-44718081
B2M-73	chr15:44718061-44718086
B2M-74	chr15:44718067-44718092
B2M-75	chr15:44718076-44718101
B2M-76	chr15:44717589-44717614
B2M-77	chr15:44717620-44717645
B2M-78	chr15:44717642-44717667
B2M-79	chr15:44717771-44717796
B2M-80	chr15:44717800-44717825
B2M-81	chr15:44717859-44717884
B2M-82	chr15:44717947-44717972
B2M-83	chr15:44718119-44718144

10

20

【請求項 10】

1つ以上のMHCクラスIタンパク質の発現を阻害する前記遺伝子修飾が、HLA-A配列における遺伝子修飾であり、任意選択で、前記遺伝子修飾が、chr6:29942854-chr6:29942913及びchr6:29943518-chr6:29943619から選択されるゲノム座標、任意選択で、chr6:29942864-29942884、chr6:29942868-29942888、chr6:29942876-29942896、chr6:29942877-29942897、chr6:29942883-29942903、chr6:29943126-29943146、chr6:29943528-29943548、chr6:29943529-29943549、chr6:29943530-29943550、chr6:29943537-29943557、chr6:29943549-29943569、chr6:29943589-29943609、及びchr6:29944026-29944046から選択されるゲノム座標内にある、請求項8に記載の操作された細胞。

30

【請求項 11】

前記細胞が、遺伝子修飾を含み、前記遺伝子修飾が、1つ以上のMHCクラスIIタンパク質の発現を阻害する、請求項1～10のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項 12】

1つ以上のMHCクラスIIタンパク質の発現を阻害する前記遺伝子修飾が、CIIITA配列における遺伝子修飾であり、前記遺伝子修飾が、chr:16:10902171-10923242、任意選択で、chr16:10902662-10923285、chr16:10906542-10923285、またはchr16:10906542-10908121、任意選択で、chr16:10908132-10908152、chr16:10908131-10908151、chr16:10916456-10916476、chr16:10918504-10918524、chr16:10909022-10909042、chr16:10918512-10918532、chr16:10918511-10918531、chr16:10895742-10895762、chr16:10916362-10916382、chr16:10916455-10916475、chr16:10909172-10909192、chr16:10906492-10906512、chr16:10909006-10909026、chr16:10922478-10922498、chr16:1

40

50

0895747-10895767、chr16:10916348-10916368
、chr16:10910186-10910206、chr16:10906481-
10906501、chr16:10909007-10909027、chr16:1
0895410-10895430、及びchr16:10908130-109081
50、任意選択で、chr16:10918504-10918524、chr16:1
0923218-10923238、chr16:10923219-10923239
、chr16:10923221-10923241、chr16:10906486-
10906506、chr16:10906485-10906505、chr16:1
0903873-10903893、chr16:10909172-10909192
、chr16:10918423-10918443、chr16:10916362- 10
10916382、chr16:10916450-10916470、chr16:1
0922153-10922173、chr16:10923222-10923242
、chr16:10910176-10910196、chr16:10895742-
10895762、chr16:10916449-10916469、chr16:1
0923214-10923234、chr16:10906492-10906512
、及びchr16:10906487-1090650、または任意選択で、chr16
:10916432-10916452、chr16:10922444-109224
64、chr16:10907924-10907944、chr16:1090698
5-10907005、chr16:10908073-10908093、chr16
:10907433-10907453、chr16:10907979-109079 20
99、chr16:10907139-10907159、chr16:1092243
5-10922455、chr16:10907384-10907404、chr16
:10907434-10907454、chr16:10907119-109071
39、chr16:10907539-10907559、chr16:1090781
0-10907830、chr16:10907315-10907335、chr16
:10916426-10916446、chr16:10909138-109091
58、chr16:10908101-10908121、chr16:1090779
0-10907810、chr16:10907787-10907807、chr16
:10907454-10907474、chr16:10895702-108957
22、chr16:10902729-10902749、chr16:1091849 30
2-10918512、chr16:10907932-10907952、chr16
:10907623-10907643、chr16:10907461-109074
81、chr16:10902723-10902743、chr16:1090762
2-10907642、chr16:10922441-10922461、chr16
:10902662-10902682、chr16:10915626-109156
46、chr16:10915592-10915612、chr16:1090738
5-10907405、chr16:10907030-10907050、chr16
:10907935-10907955、chr16:10906853-109068
73、chr16:10906757-10906777、chr16:1090773
0-10907750、及びchr16:10895302-10895322から選択 40
されるゲノム座標内にある、請求項11に記載の操作された細胞。

【請求項13】

前記細胞が、TIM3タンパク質の細胞表面発現が低減されているか、または前記細胞
が、TIM3タンパク質の細胞表面発現が低減されており、かつTRACタンパク質もし
しくはTRBCタンパク質の細胞表面発現が低減されている、請求項1～12のいずれか1
項に記載の操作された細胞。

【請求項14】

chr1:160830160-160862887のゲノム座標内に、ヒト2B4/
CD244配列における遺伝子修飾を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の操作
された細胞。

【請求項 15】

2B4 / CD244における前記遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標：

【表 5】

2B4番号	ゲノム座標(hg38)
2B4-1	chr1:160841611-160841631
2B4-2	chr1:160841865-160841885
2B4-3	chr1:160862624-160862644
2B4-4	chr1:160862671-160862691
2B4-5	chr1:160841622-160841642
2B4-6	chr1:160841819-160841839
2B4-7	chr1:160841823-160841843
2B4-8	chr1:160841717-160841737
2B4-9	chr1:160841859-160841879
2B4-10	chr1:160841806-160841826
2B4-11	chr1:160841834-160841854
2B4-12	chr1:160841780-160841800
2B4-13	chr1:160841713-160841733
2B4-14	chr1:160841631-160841651
2B4-15	chr1:160841704-160841724
2B4-16	chr1:160841584-160841604
2B4-17	chr1:160841679-160841699
2B4-18	chr1:160841874-160841894
2B4-19	chr1:160841750-160841770
2B4-20	chr1:160841577-160841597
2B4-21	chr1:160841459-160841479
2B4-22	chr1:160841466-160841486
2B4-23	chr1:160841461-160841481
2B4-24	chr1:160841460-160841480
2B4-25	chr1:160841360-160841380
2B4-26	chr1:160841304-160841324
2B4-27	chr1:160841195-160841215
2B4-28	chr1:160841305-160841325

10

20

30

または

2B4-1～2B4-5によって標的とされるものから選択されるゲノム座標：chr1:160841611-160841631、chr1:160841865-160841885、chr1:160862624-160862644、chr1:160862671-160862691、及びchr1:160841622-160841642、または

2B4-1及び2B4-2によって標的とされるものから選択されるゲノム座標：chr1:160841611-160841631及びchr1:160841865-160841885、または

2B4-3、2B4-4、2B4-10、及び2B4-17によって標的とされるものから選択されるゲノム座標：chr1:160862624-160862644、chr1:

40

50

1 : 1 6 0 8 6 2 6 7 1 - 1 6 0 8 6 2 6 9 1、chr1 : 1 6 0 8 4 1 8 0 6 - 1 6 0 8 4 1 8 2 6、及びchr1 : 1 6 0 8 4 1 6 7 9 - 1 6 0 8 4 1 6 9 9 内にある、請求項 1 4 に記載の操作された細胞。

【請求項 1 6】

chr12 : 6 7 7 2 4 8 3 - 6 7 7 8 4 5 5 のゲノム座標内に、ヒト L A G 3 配列における遺伝子修飾を含む、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 1 7】

L A G 3 における前記遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標：

【表 6】

LAG3番号	ゲノム座標(hg38)
LAG3-1	chr12:6773938-6773958
LAG3-2	chr12:6774678-6774698
LAG3-3	chr12:6772894-6772914
LAG3-4	chr12:6774816-6774836
LAG3-5	chr12:6774742-6774762
LAG3-6	chr12:6775380-6775400
LAG3-7	chr12:6774727-6774747
LAG3-8	chr12:6774732-6774752
LAG3-9	chr12:6777435-6777455
LAG3-10	chr12:6774771-6774791
LAG3-11	chr12:6772909-6772929
LAG3-12	chr12:6774735-6774755
LAG3-13	chr12:6773783-6773803
LAG3-14	chr12:6775292-6775312
LAG3-15	chr12:6777433-6777453
LAG3-16	chr12:6778268-6778288
LAG3-17	chr12:6775444-6775464
LAG3-24	chr12:6777783-6777803
LAG3-26	chr12:6777784-6777804
LAG3-41	chr12:6778252-6778272
LAG3-59	chr12:6777325-6777345
LAG3-83	chr12:6777329-6777349

10

20

30

または

L A G 3 - 1 ～ L A G 3 - 1 5 によって標的とされるものから選択されるゲノム座標：chr12 : 6 7 7 3 9 3 8 - 6 7 7 3 9 5 8、chr12 : 6 7 7 4 6 7 8 - 6 7 7 4 6 9 8、chr12 : 6 7 7 2 8 9 4 - 6 7 7 2 9 1 4、chr12 : 6 7 7 4 8 1 6 - 6 7 7 4 8 3 6、chr12 : 6 7 7 4 7 4 2 - 6 7 7 4 7 6 2、chr12 : 6 7 7 5 3 8 0 - 6 7 7 5 4 0 0、chr12 : 6 7 7 4 7 2 7 - 6 7 7 4 7 4 7、chr12 : 6 7 7 4 7 3 2 - 6 7 7 4 7 5 2、chr12 : 6 7 7 7 4 3 5 - 6 7 7 7 4 5 5、chr12 : 6 7 7 4 7 7 1 - 6 7 7 4 7 9 1、chr12 : 6 7 7 2 9 0 9 - 6 7 7 2 9 2 9、chr12 : 6 7 7 4 7 3 5 - 6 7 7 4 7 5 5、chr12 : 6 7 7 3 7 8 3 - 6 7 7 3 8 0 3、chr12 : 6 7 7 5 2 9 2 - 6 7 7 5 3 1 2、及びchr12 : 6 7 7 7 4 3 3 - 6 7 7 7 4 5 3、または

40

L A G 3 - 1 ～ L A G 3 - 1 1 によって標的とされるものから選択されるゲノム座標：c

50

h r 1 2 : 6 7 7 3 9 3 8 - 6 7 7 3 9 5 8、c h r 1 2 : 6 7 7 4 6 7 8 - 6 7 7 4 6 9 8、c h r 1 2 : 6 7 7 2 8 9 4 - 6 7 7 2 9 1 4、及びc h r 1 2 : 6 7 7 4 8 1 6 - 6 7 7 4 8 3 6、c h r 1 2 : 6 7 7 4 7 4 2 - 6 7 7 4 7 6 2、c h r 1 2 : 6 7 7 5 3 8 0 - 6 7 7 5 4 0 0、c h r 1 2 : 6 7 7 4 7 2 7 - 6 7 7 4 7 4 7、c h r 1 2 : 6 7 7 4 7 3 2 - 6 7 7 4 7 5 2、c h r 1 2 : 6 7 7 7 4 3 5 - 6 7 7 7 4 5 5、c h r 1 2 : 6 7 7 4 7 7 1 - 6 7 7 4 7 9 1、及びc h r 1 2 : 6 7 7 2 9 0 9 - 6 7 7 2 9 2 9、または

L A G 3 - 1 ~ L A G 3 - 4 によって標的とされるものから選択されるゲノム座標 : c h r 1 2 : 6 7 7 3 9 3 8 - 6 7 7 3 9 5 8、c h r 1 2 : 6 7 7 4 6 7 8 - 6 7 7 4 6 9 8、c h r 1 2 : 6 7 7 2 8 9 4 - 6 7 7 2 9 1 4、及びc h r 1 2 : 6 7 7 4 8 1 6 - 6 7 7 4 8 3 6、または

L A G 3 - 1、L A G 3 - 4、L A G 3 - 5、及びL A G 3 - 9 によって標的とされるものから選択されるゲノム座標 : c h r 1 2 : 6 7 7 3 9 3 8 - 6 7 7 3 9 5 8、c h r 1 2 : 6 7 7 4 8 1 6 - 6 7 7 4 8 3 6、c h r 1 2 : 6 7 7 4 7 4 2 - 6 7 7 4 7 6 2、及びc h r 1 2 : 6 7 7 7 4 3 5 - 6 7 7 7 4 5 5 内にある、請求項 1 6 に記載の操作された細胞。

【請求項 1 8】

c h r 2 : 2 4 1 8 4 9 8 8 1 - 2 4 1 8 5 8 9 0 8 のゲノム座標内に、ヒト P D - 1 配列における遺伝子修飾を含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 1 9】

前記遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標：

【表 7】

PD1番号	ゲノム座標(hg38)
PD1-29	chr2:241852703-241852723
PD1-43	chr2:241858807-241858827
PD1-5	chr2:241858789-241858809
PD1-6	chr2:241858788-241858808
PD1-8	chr2:241858755-241858775
PD1-11	chr2:241852919-241852939
PD1-12	chr2:241852915-241852935
PD1-22	chr2:241852755-241852775
PD1-23	chr2:241852751-241852771
PD1-24	chr2:241852750-241852770
PD1-36	chr2:241852264-241852284
PD1-57	chr2:241852201-241852221
PD1-58	chr2:241852749-241852769
PD1-17	chr2:241852821-241852841
PD1-38	chr2:241852265-241852285
PD1-56	chr2:241851221-241851241
PD1-41	chr2:241852188-241852208

または

それぞれ、c h r 2 : 2 4 1 8 5 2 9 1 9 - 2 4 1 8 5 2 9 3 9、c h r 2 : 2 4 1 8 5 2 9 1 5 - 2 4 1 8 5 2 9 3 5、c h r 2 : 2 4 1 8 5 2 7 5 0 - 2 4 1 8 5 2 7 7 0、c h r 2 : 2 4 1 8 5 2 2 6 4 - 2 4 1 8 5 2 2 8 4、c h r 2 : 2 4 1 8 5 2 2 6 5 -

2 4 1 8 5 2 2 8 5、chr2:2 4 1 8 5 8 8 0 7-2 4 1 8 5 8 8 2 7、chr2:2 4 1 8 5 2 2 0 1-2 4 1 8 5 2 2 2 1、chr2:2 4 1 8 5 8 7 8 9-2 4 1 8 5 8 8 0 9、chr2:2 4 1 8 5 8 7 8 8-2 4 1 8 5 8 8 0 8、chr2:2 4 1 8 5 8 7 5 5-2 4 1 8 5 8 7 7 5、chr2:2 4 1 8 5 2 7 5 5-2 4 1 8 5 2 7 7 5、chr2:2 4 1 8 5 2 7 5 1-2 4 1 8 5 2 7 7 1、及びchr2:2 4 1 8 5 2 7 0 3-2 4 1 8 5 2 7 2 3から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、chr2:2 4 1 8 5 8 7 8 8-2 4 1 8 5 8 8 0 8、chr2:2 4 1 8 5 8 7 5 5-2 4 1 8 5 8 7 7 5、chr2:2 4 1 8 5 2 9 1 9-2 4 1 8 5 2 9 3 9、chr2:2 4 1 8 5 2 9 1 5-2 4 1 8 5 2 9 3 5、chr2:2 4 1 8 5 2 7 5 1-2 4 1 8 5 2 7 7 1、chr2:2 4 1 8 5 8 8 0 7-2 4 1 8 5 8 8 2 7、及びchr2:2 4 1 8 5 2 7 0 3-2 4 1 8 5 2 7 2 3から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、chr2:2 4 1 8 5 8 7 8 9-2 4 1 8 5 8 8 0 9、chr2:2 4 1 8 5 2 9 1 9-2 4 1 8 5 2 9 3 9、chr2:2 4 1 8 5 2 9 1 5-2 4 1 8 5 2 9 3 5、chr2:2 4 1 8 5 2 7 5 5-2 4 1 8 5 2 7 7 5、chr2:2 4 1 8 5 2 7 5 1-2 4 1 8 5 2 7 7 1、及びchr2:2 4 1 8 5 8 8 0 7-2 4 1 8 5 8 8 2 7から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、chr2:2 4 1 8 5 8 7 8 8-2 4 1 8 5 8 8 0 8、chr2:2 4 1 8 5 8 7 5 5-2 4 1 8 5 8 7 7 5、chr2:2 4 1 8 5 2 7 5 1-2 4 1 8 5 2 7 7 1、及びchr2:2 4 1 8 5 2 7 0 3-2 4 1 8 5 2 7 2 3から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、chr2:2 4 1 8 5 8 7 8 8-2 4 1 8 5 8 8 0 8及びchr2:2 4 1 8 5 2 7 0 3-2 4 1 8 5 2 7 2 3から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、chr2:2 4 1 8 5 8 7 8 8-2 4 1 8 5 8 8 0 8、chr2:2 4 1 8 5 2 7 5 1-2 4 1 8 5 2 7 7 1、chr2:2 4 1 8 5 2 7 0 3-2 4 1 8 5 2 7 2 3、chr2:2 4 1 8 5 2 1 8 8-2 4 1 8 5 2 2 0 8、及びchr2:2 4 1 8 5 2 2 0 1-2 4 1 8 5 2 2 2 1から選択されるゲノム座標、または
それぞれ、chr2:2 4 1 8 5 8 7 8 8-2 4 1 8 5 8 8 0 8、chr2:2 4 1 8 5 2 7 0 3-2 4 1 8 5 2 7 2 3、及びchr2:2 4 1 8 5 2 2 0 1-2 4 1 8 5 2 2 2 1から選択されるゲノム座標、または
chr2:2 4 1 8 5 8 8 0 7-2 4 1 8 5 8 8 2 7のゲノム座標内に少なくとも1個のヌクレオチドの修飾を含む、請求項18に記載の操作された細胞。

【請求項20】

前記遺伝子修飾が、インデルを含む、請求項1～19のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項21】

前記遺伝子修飾が、異種コード配列の挿入を含む、請求項1～20のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項22】

前記遺伝子修飾が、置換を含み、任意選択で、前記置換が、CからTへの置換またはAからGへの置換を含む、請求項1～19及び21のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項23】

前記遺伝子修飾により、遺伝子修飾前に、全長タンパク質のアミノ酸配列を有する前記全長タンパク質の翻訳を妨げる、前記核酸配列の変化がもたらされ、任意選択で、前記遺伝子修飾により、前記全長タンパク質のコード配列における早期終止コドンをもたらす前記核酸配列の変化がもたらされるか、または前記ゲノム遺伝子座からのpre-mRNAのスプライシングの変化がもたらされる、請求項1～22のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【請求項24】

前記細胞が、前記操作された細胞の前記表面上で発現される標的化受容体をコードする

外因性核酸を含み、任意選択で、前記標的化受容体が、C A RまたはT C Rである、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 2 5】

前記操作された細胞が、T 細胞である、請求項 1 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞。

【請求項 2 6】

請求項 1 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞を含む、薬学的組成物。

【請求項 2 7】

請求項 1 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞を含む、細胞集団。

【請求項 2 8】

請求項 1 ～ 2 7 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与する、方法。

【請求項 2 9】

請求項 1 ～ 2 7 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物を、養子細胞移植（A C T）療法として対象に投与する、方法。

【請求項 3 0】

A C T 療法として使用するための、請求項 1 ～ 2 7 のいずれか 1 項に記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物。

【請求項 3 1】

a. 配列番号 1 ～ 1 5、1 8、1 9、2 2、2 3、2 6、2 9、3 2、4 2、4 4、5 6、5 8、5 9、6 2、6 3、6 6、6 9、7 5、8 2、8 6、8 7、及び 8 8 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

b. 配列番号 1 ～ 1 5、1 8、1 9、2 2、2 3、2 6、2 9、3 2、4 2、4 4、5 6、5 8、5 9、6 2、6 3、6 6、6 9、7 5、8 2、8 6、8 7、及び 8 8 の配列から選択されるヌクレオチド配列の少なくとも 1 7、1 8、1 9、または 2 0 個の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むガイド配列、

c. 配列番号 1 ～ 1 5、1 8、1 9、2 2、2 3、2 6、2 9、3 2、4 2、4 4、5 6、5 8、5 9、6 2、6 3、6 6、6 9、7 5、8 2、8 6、8 7、及び 8 8 から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 9 5 % 同一または少なくとも 9 0 % 同一のヌクレオチド配列を含むガイド配列、

d. 配列番号 1 ～ 4、6 ～ 1 5、1 8、1 9、2 2、2 9、4 2、4 4、5 8、6 2、6 9、8 2、8 6、及び 8 8 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

e. 配列番号 1 ～ 5、7、8、1 2 ～ 1 5、2 3、2 6、3 2、5 6、5 9、6 3、6 6、7 5、及び 8 7 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

f. 配列番号 2、4、1 5、2 3、5 6、5 9、6 3、7 5、及び 8 7 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

g. 配列番号 1 ～ 4 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

h. 配列番号 2、4、及び 1 5 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

i. 配列番号 2、4、1 5、6 3、及び 8 7 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

j. 配列番号 2 及び 1 5 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

k. 配列番号 6 3 及び 8 7 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、及び

l. 配列番号 1 5 のヌクレオチド配列を含むガイド配列、から選択されるヌクレオチド配列を含む T I M 3 配列に特異的にハイブリダイズする、T I M 3 ガイド R N A。

【請求項 3 2】

R N A ガイド D N A 結合剤を、配列番号 1 ～ 1 5、1 8、1 9、2 2、2 3、2 6、2 9、3 2、4 2、4 4、5 6、5 8、5 9、6 2、6 3、6 6、6 9、7 5、8 2、8 6、8 7、及び 8 8 によって標的とされるものから選択される、または配列番号 1 ～ 4、6 ～ 1 5、1 8、1 9、2 2、2 9、4 2、4 4、5 8、6 2、6 9、8 2、8 6、及び 8 8 によって標的とされるゲノム座標から選択される、または配列番号 1 ～ 5、7、8、1

10

20

30

40

50

2～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び87によって標的とされるゲノム座標から選択される、または2、4、15、23、56、59、63、75、及び87によって標的とされるゲノム座標から選択される、または配列番号1～4によって標的とされるゲノム座標から選択される、または配列番号2、4、及び15によって標的とされるゲノム座標から選択される、または配列番号2、4、15、63、及び87によって標的とされるゲノム座標から選択される、または配列番号2及び15によって標的とされるゲノム座標から選択されるゲノム座標、または配列番号63及び87によって標的とされるゲノム座標、または配列番号15によって標的とされるゲノム座標内の染色体位置に指向するガイド配列を含む、TIM3ガイドRNA。

【請求項33】

前記ガイドRNAが、単一ガイドRNA (sgRNA) である、請求項31または32に記載のガイドRNA。

【請求項34】

前記ガイド配列に対して3'に配列番号201のヌクレオチド配列をさらに含み、前記ガイドRNAが、5'末端修飾または3'末端修飾を含む、請求項33に記載のガイドRNA。

【請求項35】

5'末端修飾または3'末端修飾及びgRNAの保存部分をさらに含み、前記保存部分が、

A. 配列番号201に対して、短縮されたヘアピン1領域、または置換されかつ任意選択で短縮されたヘアピン1領域であって、

1. 以下のヌクレオチド対：H1-1及びH1-12、H1-2及びH1-11、H1-3及びH1-10、またはH1-4及びH1-9のうちの少なくとも1つが、前記置換されかつ任意選択で短縮されたヘアピン1においてワトソン-クリック対形成ヌクレオチドで置換されており、前記ヘアピン1領域が、任意選択で、

a. H1-5～H1-8のうちのいずれか1つもしくは2つ、

b. 以下のヌクレオチド対：H1-1及びH1-12、H1-2及びH1-11、H1-3及びH1-10、ならびにH1-4及びH1-9のうちの1つ、2つ、もしくは3つ、または

c. ヘアピン1領域の1～8個のヌクレオチドを欠いているか、あるいは

2. 前記短縮されたヘアピン1領域が、4～8個のヌクレオチド、好ましくは4～6個のヌクレオチドを欠いており、

a. 位置H1-1、H1-2、もしくはH1-3のうちの1つ以上が、配列番号201に対して欠失もしくは置換されているか、または

b. 位置H1-6～H1-10のうちの1つ以上が、配列番号201に対して置換されているか、または

3. 前記短縮されたヘアピン1領域が、5～10個のヌクレオチド、好ましくは5～6個のヌクレオチドを欠いており、位置N18、H1-12、もしくはnのうちの1つ以上が、配列番号201に対して置換されている、前記ヘアピン1領域、あるいは

B. 短縮された上部ステム領域であって、前記短縮された上部ステム領域が、1～6個のヌクレオチドを欠いており、前記短縮された上部ステム領域の6、7、8、9、10、または11個のヌクレオチドが、配列番号201に対して4個以下の置換を含む、前記短縮された上部ステム領域、あるいは

C. LS6、LS7、US3、US10、B3、N7、N15、N17、H2-2、及びH2-14のうちのいずれか1つ以上における配列番号201に対する置換であって、置換基ヌクレオチドが、アデニンが後に続くピリミジンでもなく、ピリミジンが前に存在するアデニンでもない、前記置換、あるいは

D. 上部ステム領域であって、前記上部ステムの修飾が、配列番号201に対して前記上部ステム領域におけるUS1～US12のうちのいずれか1つ以上の修飾を含む、前記上部ステム領域のうちの1つ以上を含む、請求項33に記載のガイドRNA。

【請求項 36】

前記ガイドRNAが、mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUU
 UUA GAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA
 AGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGm
 UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*m
 U*mU（配列番号300）のパターンに従って修飾され、「N」が、任意の天然または
 非天然のヌクレオチドであってよく、mが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、
 *が、ヌクレオチド残基間のホスホロチオエート連結であり、前記Nが、集合的に任意の
 先行請求項に記載のガイド配列のヌクレオチド配列であり、任意選択で、各Nが、独立し
 て、任意の天然または非天然のヌクレオチドであり、前記ガイド配列が、前記TIM3遺
 伝子に対してCas9を標的とする、請求項33または34に記載のガイドRNA。

10

【請求項 37】

前記ガイドRNAが、修飾を含む、請求項33～36のいずれか1項に記載のガイドRNA。

【請求項 38】

前記修飾が、(i) 2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチド、(ii) 2'-F修飾ヌクレオチド、(iii) ヌクレオチド間のホスホロチオエート(PS)結合、(iv) 前記ガイドRNAの5'末端にある最初の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾、(v) 前記ガイドRNAの3'末端にある最後の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上での修飾、(vi) 前記ガイドRNAの最初の4個のヌクレオチドの各々の間のPS結合、(vii) 前記ガイドRNAの最後の4個のヌクレオチドの各々の間のPS結合、(viii) 前記ガイドRNAの前記5'末端にある最初の3個のヌクレオチドの各々での2'-O-Me修飾ヌクレオチド、(ix) 前記ガイドRNAの前記3'末端にある最後の3個のヌクレオチドの各々での2'-O-Me修飾ヌクレオチド、または(i)～(ix)のうちの1つ以上の組み合わせを含む、請求項37に記載のガイドRNA。

20

【請求項 39】

請求項31～38のいずれか1項に記載のガイドRNA、及びRNAガイドDNA結合剤を含む組成物であって、前記RNAガイドDNA結合剤が、ポリペプチドRNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤ポリペプチドをコードする核酸であり、任意選択で、前記RNAガイドDNA結合剤が、Cas9ヌクレアーゼである、前記組成物。

30

【請求項 40】

前記組成物が、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項31～38のいずれか1項に記載のガイドRNA、または請求項39に記載の組成物。

【請求項 41】

前記ガイドRNAが、脂質ナノ粒子(LNP)と会合している、請求項31～40のいずれか1項に記載のガイドRNAまたは組成物。

【請求項 42】

細胞内のTIM3配列において遺伝子修飾を行う方法であって、前記細胞を、請求項31～41のいずれか1項に記載のガイドRNAまたは組成物と接触させることを含む、前記方法。

40

【請求項 43】

TCR配列においてTCR遺伝子の発現を阻害するための遺伝子修飾を行うことをさらに含む、請求項42に記載の方法。

【請求項 44】

免疫療法のための細胞集団を調製する方法であって、

a. TIM3ガイドRNAまたは請求項31～41のいずれか1項に記載の組成物を有する集団内の細胞中のTIM3配列において遺伝子修飾を行うことと、

b. 前記集団の前記細胞中のTCR配列において遺伝子修飾を行い、前記集団内の前記細胞の前記表面上の前記TCRタンパク質の発現を低減することと、

50

c. 培養物中の前記細胞集団を増殖することと、を含む、前記方法。

【請求項 45】

請求項 42～44 のいずれか 1 項に記載の方法によって作製される、細胞集団。

【請求項 46】

前記細胞集団が、エキスピボで改変される、請求項 45 に記載の細胞集団。

【請求項 47】

請求項 45 または 46 に記載の細胞集団を、それを必要とする対象に投与する、方法。

【請求項 48】

請求項 45 または 46 に記載の集団を、養子細胞移植（ACT）療法として対象に投与する、方法。

【請求項 49】

ACT 療法として使用するための、請求項 45 または 46 に記載の細胞集団。

【請求項 50】

TIM3 遺伝子の遺伝子修飾を含む細胞集団であって、前記集団内の細胞の少なくとも 40%、45%、50%、55%、60%、65%、好ましくは少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、または 95% が、内因性 TIM3 配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、前記細胞集団。

【請求項 51】

TIM3 の発現が、例えば、前記 TIM3 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも 40%、45%、50%、55%、60%、65%、好ましくは少なくとも 70%、75%、80%、85%、90%、もしくは 95%、または前記アッセイの検出限界未満まで減少する、請求項 50 に記載の細胞集団。

【請求項 52】

前記集団内の細胞の少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% が、前記内因性 TIM3 配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、請求項 50 または 51 に記載の細胞集団。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

本出願は、2021 年 2 月 8 日に提出された米国仮出願第 63/147,221 号の 35 U.S.C. 119 (e) に基づく利益を主張し、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本出願は、電子形式の配列表とともに提出される。配列表は、2022 年 2 月 3 日に作成された「01155-0041-00PCT__Seq__List__ST25.txt」と題するファイルとして提供され、サイズは 133,120 バイトである。配列表の電子形式の情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

緒言及び概要

T 細胞疲弊は、慢性抗原刺激に対する T 細胞の応答を説明するために使用されてきた広義の用語である。これは、慢性ウイルス感染の設定において最初に観察されたが、腫瘍に対する免疫応答においても研究されてきた。T 細胞疲弊機序の特性及び特徴は、チェックポイント遮断及び養子 T 細胞移植療法の成功に決定的な意味を有し得る。

【0004】

T 細胞疲弊は、慢性感染症及びがんの特徴である、長期の抗原刺激によるエフェクター機能の進行性の喪失である。連続的な抗原刺激に加えて、微小環境に存在する抗原提示細胞及びサイトカインもまた、この疲弊した表現型に寄与し得る。したがって、T 細胞疲弊は、T 細胞のエフェクター機能が低下し、阻害性受容体の発現が持続する T 細胞機能不全の状態である。これにより、感染症または腫瘍の最適な制御が妨げられる。さらに、疲弊した T 細胞は、機能性エフェクターまたはメモリー T 細胞の転写状態とは異なる転写状態

10

20

30

40

50

を有する。治療的処置は、疲弊したT細胞を救出する可能性を有する（Goldberg, M. V. & Drake, C. G., 2011, Wherry, E. J. & Kurachi M., 2015）。

【0005】

疲弊したT細胞は、典型的には、プログラム細胞死1（PD CD1またはPD-1）などの共阻害性受容体を発現する。遺伝子産物は、免疫チェックポイント系の構成要素として作用する。T細胞疲弊は、これらの受容体を遮断することによって逆転され得る。

【0006】

TIM-3（T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン3）は、I型膜貫通タンパク質であり、T細胞における免疫チェックポイントとして作用する。慢性感染の間、T細胞は、TIM-3ならびにT細胞の免疫応答を下方制御する他の免疫チェックポイント遺伝子を発現する。TIM-3は、発がんに関与している。胃癌、結腸直腸癌、肝臓癌、及び膵臓癌の患者では、TIM-3腫瘍発現は、腫瘍浸潤、生存率の低下、及び転移と相関している。Th1、Th17、ナチュラルキラー（NK）、及びナチュラルキラーT（NKT）細胞、ならびに調節T細胞（Treg）を含む多くの免疫細胞型において、TIM-3タンパク質の発現が観察されている。TIM-3は、PD-1と共発現される抗原提示細胞（APC）上で発現され得る。TIM-3は、カルシウム-カルパイン-カスパーゼ-1経路を介してCD4+及びCD8+細胞のアポトーシスを引き起こす、ガレクチン-9に結合することが示されている。TIM-3のガレクチン-9への結合は、Y265細胞内TIM-3ドメインをリン酸化する。さらに、TIM-3を発現する細胞は、マウスの腫瘍浸潤T細胞において観察されている。TIM-3は、Th1媒介性自己免疫を直接阻害することができ、未知の機序を介して、骨髄由来サプレッサー細胞（MDSC）の増殖を誘導することによって間接的に免疫抑制を促進することが示されている。TIM-3を遮断すると、リンパ球によるIFNγの産生を増加させることができるが、この作用の分子的基础は不明である。

【0007】

例えば、例えば、CRISPR/Cas系を使用して生成されたTIM3配列、例えば、ゲノム遺伝子座における遺伝子修飾（例えば、挿入、欠失、置換）を有する細胞の調製方法において、使用するための化合物及び組成物、ならびにTIM3配列における遺伝子修飾を有する細胞、及び例えば、免疫腫瘍学及び感染症における、例えば、免疫応答を促進するための様々な方法におけるそれらの使用を本明細書に提供する。TIM3発現を低減し得るTIM3遺伝子修飾を有する細胞は、T細胞受容体（TCR）遺伝子座、例えば、TRACまたはTRBC遺伝子座；MHCクラスI分子、例えば、B2M及びHLA-A遺伝子座の発現を低減するゲノム遺伝子座；MHCクラスII分子、例えば、CIITA遺伝子座の発現を低減するゲノム遺伝子座；ならびにチェックポイント阻害剤遺伝子座、例えば、CD244（2B4）遺伝子座、LAG3遺伝子座、及びPD-1遺伝子座を含む追加のゲノム配列における遺伝子修飾を含み得る。本開示は、TIM3配列の遺伝子修飾を有する細胞、及び任意選択で本明細書に提供される他のゲノム遺伝子座を含む細胞集団に関する。細胞は、養子T細胞移植療法において使用されてもよい。本開示は、治療、例えば、がん治療及び免疫療法で使用するためのTIM3配列の遺伝子修飾を伴う細胞の組成物及び使用に関する。本開示は、gRNA分子、CRISPR系、細胞、及び細胞のゲノム編集に有用な方法に関する。

【0008】

chr5:157085832-157109044のゲノム座標内に、ヒトTIM3配列における遺伝子修飾を含む、操作された細胞が本明細書に提供される。さらなる実施形態が、特許請求の範囲及び図面全体を通して提供され、記載される。

【0009】

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に記載の組成物または製剤の使用も開示される。対象は、ヒトまたは動物（例えば、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、カニクイザル）であってもよい。好ましくは、対象は、ヒトである。

【0010】

TIM3 遺伝子配列に遺伝子修飾（例えば、挿入、置換、または欠失）をもたらす際に使用するための、上記組成物または製剤のうちのいずれかも開示される。特定の実施形態では、配列内の遺伝子修飾は、ゲノム遺伝子座の遺伝子修飾の前に、例えば、フレームシフトまたはナンセンス変異を形成することによって、全長タンパク質の翻訳を防止する核酸配列の変化をもたらす、その結果、翻訳は早期に終結する。遺伝子修飾は、スプライス部位、すなわち、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位における挿入、置換、または欠失を含むことができ、その結果、異常なスプライシングは、フレームシフト変異、ナンセンス変異、または切断された mRNA をもたらす、その結果、翻訳は早期に終結する。遺伝子修飾はまた、コードされたタンパク質の翻訳または折り畳みを妨害し、早期の翻訳終結をもたらす可能性がある。

10

【0011】

配列内の遺伝子修飾の生成に使用するために本明細書で提供される組成物は、好ましくは、配列からのタンパク質の発現、例えば、タンパク質の細胞表面発現の低減をもたらす。

【0012】

別の態様では、本発明は、対象に免疫療法を提供する方法であって、本明細書に記載される有効量の細胞、例えば、前述の細胞態様及び実施形態のうちのいずれかの細胞を対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0013】

方法の実施形態では、方法は、本明細書に記載される細胞または細胞集団を投与する前のリンパ枯渇を含む。方法の実施形態では、方法は、本明細書に記載される有効量の細胞、例えば、前述の細胞態様及び実施形態のうちのいずれかの細胞を対象に投与する前に、リンパ消耗剤または免疫抑制剤を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。

20

【0014】

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、活性化免疫療法として分類される。細胞ベースの免疫療法は、いくつかのがんの治療に有効であることが実証されている。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）、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、腫瘍細胞の表面に発現する異常な抗原に応答して作用するようにプログラムすることができる。したがって、がん免疫療法は、免疫系の成分が腫瘍または他のがん細胞を破壊するのを可能にする。

30

【0015】

免疫療法はまた、慢性感染症、例えば、B型肝炎及びC型肝炎ウイルス感染症、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症、結核感染症、ならびにマラリア感染症の治療に有用であり得る。トランスジェニックTCRまたはCARなどの標的化受容体を含む免疫エフェクター細胞は、本明細書に記載されるものなどの免疫療法において有用である。

【0016】

別の態様では、本発明は、免疫療法のための細胞（例えば、細胞集団）を調製する方法であって、（a）例えば、本明細書に開示されるgRNA分子（本明細書に記載される）、または2つ以上のgRNA分子を当該細胞に導入することによって、T細胞受容体（TCR）の1つ以上または全ての構成要素の発現を低減または排除することによって細胞を修飾することと、（b）当該細胞を増殖することと、を含む、方法を提供する。本発明の細胞は、例えば、標的化受容体、例えば、TCR／CD3ゼータ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操作に好適である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、非内因性TCRまたはCAR配列から選択される標的化受容体である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、野生型またはバリエーションTCRである。本発明の細胞はまた、代替の抗原結合部分をコードする異種配列の導入、例えば、代替の（非内因性）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

40

50

操作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、さらなる操作にも好適であり得る。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知られている。

【0017】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の細胞を調製する方法、例えば、細胞を調製する方法の前述の態様及び実施形態のうちのいずれかの方法によって調製された細胞（例えば、細胞集団）を投与することを含む、対象を治療する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】次世代（NGS）シーケンシングによって測定した、4人のドナー（「826」

10

「112」、「262」及び「315」）の各々からの試料の編集の程度を示す。
【図2A】フローサイトメトリーによって測定した、再刺激T細胞におけるTIM3タンパク質発現の程度を示す。y軸は、TIM3陽性細胞のパーセンテージを示し、誤差バーは、この測定の標準偏差（SD）を示す。ドナー「262」及び「315」に由来する試料の結果を示す。

【図2B】フローサイトメトリーによって測定した、再刺激T細胞におけるTIM3タンパク質発現の程度を示す。y軸は、TIM3陽性細胞のパーセンテージを示し、誤差バーは、この測定の標準偏差（SD）を示す。ドナー「112」及び「826」に由来する試料の結果を示す。

【図3A】NGSシーケンシングによって測定した、T細胞中の編集の程度を示す。

20

【図3B】フローサイトメトリーによって測定した、再刺激TIM3+細胞のパーセントを示し、誤差バーは、この測定のSEMを示す。

【図4】T細胞におけるTIM3ガイドRNAによる編集の用量応答曲線を示す。

【図5A】CD8+WT1 TCR発現操作された細胞の中の幹細胞メモリーT細胞（Tscm）を示す。

【図5B】CD8+WT1 TCR発現操作された細胞の中の中央メモリーT細胞（Tcm）を示す。

【図5C】CD8+WT1 TCR発現操作された細胞の中のエフェクターメモリーT細胞（Tem）を示す。

【図6A】操作されたT細胞における第3の連続編集のためにNGSを介して設定された第1のプライマーで決定されたインデル頻度を示す。

30

【図6B】操作されたT細胞における第3の連続編集のためにNGSを介して設定された第2の異なるプライマーで決定されたインデル頻度を示す。

【図7A】WT1を発現するAML細胞を操作されたT細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。A、B、及びCは、それぞれ、AML細胞株pAML1、pAML2、またはpAML3で5：1のE：Tを使用したアッセイを示す。

【図7B】WT1を発現するAML細胞を操作されたT細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。A、B、及びCは、それぞれ、AML細胞株pAML1、pAML2、またはpAML3で5：1のE：Tを使用したアッセイを示す。

40

【図7C】WT1を発現するAML細胞を操作されたT細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。A、B、及びCは、それぞれ、AML細胞株pAML1、pAML2、またはpAML3で5：1のE：Tを使用したアッセイを示す。

【図7D】WT1を発現するAML細胞を操作されたT細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。D、E、及びFは、それぞれ、AML細胞株pAML1、pAML2、またはpAML3で1：1のE：Tを使用したアッセイを示す。

【図7E】WT1を発現するAML細胞を操作されたT細胞に曝露した後の、赤色及び緑

50

色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。D、E、及びFは、それぞれ、AML細胞株 p A M L 1、p A M L 2、または p A M L 3 で 1 : 1 の E : T を使用したアッセイを示す。

【図 7 F】 W T 1 を発現する A M L 細胞を操作された T 細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。D、E、及び F は、それぞれ、AML細胞株 p A M L 1、p A M L 2、または p A M L 3 で 1 : 1 の E : T を使用したアッセイを示す。

【図 7 G】 W T 1 を発現する A M L 細胞を操作された T 細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。G、F、及び I は、それぞれ、AML細胞株 p A M L 1、p A M L 2、または p A M L 3 で 1 : 5 の E : T を使用したアッセイを示す。

【図 7 H】 W T 1 を発現する A M L 細胞を操作された T 細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。G、F、及び I は、それぞれ、AML細胞株 p A M L 1、p A M L 2、または p A M L 3 で 1 : 5 の E : T を使用したアッセイを示す。

【図 7 I】 W T 1 を発現する A M L 細胞を操作された T 細胞に曝露した後の、赤色及び緑色の両方で蛍光を発する平均画像面積を示す。G、F、及び I は、それぞれ、AML細胞株 p A M L 1、p A M L 2、または p A M L 3 で 1 : 5 の E : T を使用したアッセイを示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

ここで、本発明の特定の実施形態を詳細に参照し、本発明の実施形態の例は添付の図面で例示される。本教示を様々な実施形態と併せて記載するが、本教示をそれらの実施形態に限定することを意図するものではない。逆に、本教示は、当業者によって理解されるように、様々な代替、改変物、及び均等物を包含する。

【0020】

本教示を詳細に説明する前に、本開示は、特定の組成物またはプロセスステップに限定されるものではなく、したがって変化し得ると理解されるべきである。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の参照物を含めることに留意されたい。したがって、例えば、「コンjugate (a c o n j u g a t e)」への言及は、複数のコンjugateを含み、「細胞 (a c e l l)」への言及は、複数の細胞（例えば、細胞集団）を含む等である。

【0021】

数値範囲には、その範囲を定義する数値が含まれる。測定値及び測定可能な値は、有意な桁及び測定に関連する誤差を考慮して、おおよその値であると理解される。いくつかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも 10^3 、 10^4 、 10^5 、または 10^6 個の細胞、好ましくは 10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、または 10^8 個の細胞の集団を指す。

【0022】

「含む (c o m p r i s e)」、「含む (c o m p r i s e s)」、「含む (c o m p r i s i n g)」、「含有する (c o n t a i n)」、「含有する (c o n t a i n s)」、「含有する (c o n t a i n i n g)」、「含む (i n c l u d e)」、「含む (i n c l u d e s)」、及び「含む (i n c l u d i n g)」の使用は、限定することを意図するものではない。上述の概略的な説明と、以下の詳細な説明はいずれも例示であり、単に説明するためのものであり、その教示を限定するものではないことが理解されるべきである。本明細書に特に記載されていない限り、様々な構成要素を「含む (c o m p r i s i n g)」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「からなる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素を「含む (c o m p r i s i n g)」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。

様々な構成要素「から本質的になる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれらを「含む (c o m p r i s i n g) 」ものであると想定される (この互換性は、特許請求の範囲におけるこれらの用語の使用には適用されない)。

【 0 0 2 3 】

「または」という用語は、文脈が別途明確に示さない限り、明細書において包括的な意味で、すなわち、「及び／または」に等しい意味で使用される。

【 0 0 2 4 】

「約」という用語は、リストの前に使用されると、リストの各メンバーを修飾する。「約」という用語は、当該技術分野内の許容される変動または誤差、例えば、平均からの2標準偏差、または測定を行うために使用される方法の感度を包含すると理解される。「約」が数列の第1の値の前に存在するとき、数列の各値を修飾することが理解され得る。

【 0 0 2 5 】

範囲は、その範囲の最後の数値及びその間の全ての論理値を含むと理解される。例えば、5～10個のヌクレオチドは、5、6、7、8、9、または10個のヌクレオチドとして理解され、5～10%は、5%及び10%までの全ての可能な値を含有すると理解される。

【 0 0 2 6 】

20ヌクレオチド配列の少なくとも17個のヌクレオチドは、提供される配列の17、18、19、または20個ヌクレオチドを含むと理解され、したがって明確に理解されるため、1つが特異的に提供されなくても上限を提供する。同様に、最大3個のヌクレオチドは、0、1、2、または3個のヌクレオチドを包含すると理解され、1つが特異的に提供されなくても下限を提供する。「少なくとも」、「最大」、または他の同様の言語が数字を修飾するとき、数列の各数字を修飾することが理解され得る。

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用される場合、「それ以下」または「それ未満」は、語句に隣接する値、及び文脈から論理的であるように、ゼロまでの論理的により低い値または整数として理解される。例えば、「2個以下のヌクレオチド塩基対」の二重鎖領域は、2、1、または0個のヌクレオチド塩基対を有する。一連の数字または範囲の前に「以下」または「未満」が存在する場合、一連または範囲内の数字の各々が修飾されることを理解されたい。

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用される場合、範囲は、上限及び下限の両方を含む。

【 0 0 2 9 】

本出願における配列と、指示された受入番号または受入番号における位置との間に矛盾が生じた場合、本出願における配列が優勢である。

【 0 0 3 0 】

化学名と構造との間に矛盾がある場合、構造が優勢である。

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用される場合、「分析物を検出する」等は、存在する場合、分析物を検出することができるアッセイを実施することとして理解され、分析物は、アッセイの検出レベルを上回る量で存在する。

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用される場合、値の最大量が100% (例えば、100%阻害または100%カプセル化) で表される場合、値は検出方法によって制限されることが理解される。例えば、100%阻害は、アッセイの検出レベルを下回るレベルへの阻害として理解され、100%カプセル化は、カプセル化のために意図された材料を小胞の外側で検出することができないとして理解される。

【 0 0 3 3 】

本明細書に使用される節の見出しは、構成目的のものに過ぎず、決して所望の主題を限定すると解釈されるべきではない。参照により組み込まれる任意の材料が、本明細書で定

10

20

30

40

50

義される任意の用語または本明細書の任意の他の明示的な内容と矛盾する場合、本明細書が優先する。

【0034】

I. 定義

特に明記しない限り、本明細書で使用される以下の用語及び句は、以下の意味を有することを意図する。

【0035】

「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は、骨格に沿って一緒に連結された窒素系複素環式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（従来のRNA、DNA、混合RNA-DNA、及びそれらの類似体であるポリマーを含む）を含む、多量体化合物を指すために本明細書で使用される。核酸「骨格」は、糖ホスホジエステル連結、ペプチド-核酸結合（「ペプチド核酸」またはPNA、PCT第95/32305号）、ホスホロチオエート連結、メチルホスホネート連結、またはそれらの組み合わせのうちの1つ以上を含む、様々な連結から構成され得る。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'メトキシまたは2'ハロゲン化物置換を有する類似の化合物であり得る。RNAは、例えば、修飾として、1つ以上のデオキシリボースヌクレオチドを含み得、同様に、DNAは、1つ以上のリボヌクレオチドを含み得る。窒素系塩基は、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、シュードウリジン、もしくはN1-メチルシュードウリジンなどの修飾ウリジン）；イノシン；プリンもしくはピリミジンの誘導体（例えば、N⁴-メチルデオキシグアノシン、デアザーもしくはアザープリン、デアザーもしくはアザーピリミジン、5位もしくは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、6、もしくは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、及びO⁴-アルキル-ピリミジン；米国特許第5,378,825号及びPCT第WO93/13121号）であってもよい。一般的な考察については、The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36、Adams et al. 編集、第11版、1992を参照）。核酸は、骨格がポリマーの位置（複数可）に窒素系塩基を含まない1つ以上の「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もしくはDNA糖、塩基及び連結のみを含むことができるか、または従来の構成要素及び置換の両方（例えば、2'メトキシ置換基を有する従来のヌクレオシド、または従来のヌクレオシド及び1つ以上のヌクレオシド類似体の両方を含有するポリマー）を含むことができる。核酸は、RNA模倣糖構造にロックされた二環式フラノース単位を有し、相補的なRNA及びDNA配列に対するハイブリダイゼーション親和性を高める、1つ以上のLNAヌクレオチドモノマーを含有する類似体である「ロックド核酸」（LNA）を含む（Vester and Wengel, 2004, Biochemistry 43(42):13233-41）。RNA及びDNAは異なる糖部分を有し、RNA内のウラシルもしくはその類似体及びDNA内のチミンもしくはその類似体の存在によって異なり得る。

【0036】

「ガイドRNA」、「gRNA」、及び単に「ガイド」は、例えば、単一ガイドRNA、またはcrRNA及びtrRNAの組み合わせ（tracrRNAとしても知られる）のいずれかを指すために、本明細書で互換的に使用される。crRNA及びtrRNAは、単一RNA分子（単一ガイドRNA、sgRNA）として会合し得るか、または例えば、2つの別々のRNA鎖（デュアルガイドRNA、dgRNA）において会合し得る。「ガイドRNA」または「gRNA」は、各々のタイプを指す。trRNAは、天然に存在する配列、または修飾もしくは変化を伴うtrRNA配列であり得る。

【0037】

本明細書で使用される場合、「ガイド配列」は、標的配列に対して相補的であり、RNAガイドDNA結合剤による結合または修飾（例えば、切断）のための標的配列に対して

ガイドRNAを指向させるように機能する、ガイドRNA内の配列を指す。「ガイド配列」は、「標的化配列」または「スペーサー配列」とも称され得る。ガイド配列は、例えば、*Streptococcus pyogenes*（すなわち、Spy Cas9）及び関連するCas9ホモログ／オルソログの場合、20塩基対の長さであり得る。例えば、15、16、17、18、19、21、22、23、24、または25ヌクレオチド長のような、より短い配列またはより長い配列もまたガイドとして使用できる。例えば、いくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号1～88から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、標的配列は、例えば、遺伝子内または染色体上にあり、例えば、ガイド配列に対して相補的である。いくつかの実施形態において、ガイド配列とそれに対応する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75%、80%、85%、90%、もしくは95%であるか、または100%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1～88から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%、または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、ガイド配列及び標的領域は、100%相補的または同一であり得る。他の実施形態では、ガイド配列及び標的領域とは、参照配列に応じて、少なくとも1個のミスマッチ、すなわち、同一ではないか、または相補的ではない1個のヌクレオチドを含有していてもよい。例えば、ガイド配列及び標的配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含有していてもよく、標的配列の全長は、17、18、19、20個、またはそれ以上のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ガイド配列及び標的領域は、1～4個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、少なくとも17、18、19、20個、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列及び標的領域は、1、2、3、または4個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、20個のヌクレオチドを含む。すなわち、ガイド配列及び標的領域は、17、18、19、20個、またはそれ以上の塩基対を有する二重鎖領域を形成してもよい。特定の実施形態では、二重鎖領域は、1、2、3、または4個のミスマッチを含んでもよく、その結果、ガイド鎖及び標的配列は完全に相補的ではない。例えば、ガイド鎖及び標的配列は、2個のミスマッチを含む、20を超えるヌクレオチド領域にわたって相補的であってもよく、その結果、ガイド配列及び標的配列は、90%相補的であり、20個のうち18個の塩基対の二重鎖領域を提供する。

10

20

30

【0038】

RNAガイドDNA結合剤の核酸基質は二本鎖核酸であるため、RNAガイドDNA結合剤の標的配列は、ゲノムDNAのプラス鎖とマイナス鎖（すなわち、与えられる配列と、配列の逆相補体）の両方を含む。したがって、ガイド配列が、「標的配列に対して相補的」であると言われる場合、標的配列のセンス鎖またはアンチセンス鎖に結合するようにガイドRNAを指向させ得ると理解されるべきである。したがって、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に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列におけるUのTへの置換を除いて、標的配列の特定のヌクレオチド（例えば、PAMを含まない標的配列）と同一である。

40

【0039】

本明細書で使用される場合、「RNAガイドDNA結合剤」は、RNA及びDNA結合活性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結合サブユニットを意味し、DNA結合活性は、配列特異的であり、RNAの配列に依存する。例示的なRNAガイドDNA結合剤には、Casクリベース（cleavage）／ニッカーゼ及びその不活性化形態（dCas DNA結合剤）が含まれる。本明細書で使用されるとき、「Casヌクレアーゼ」は、Casクリベース、Casニッカーゼ、及びdCas DNA結合剤を包含する。dCas DNA結合剤は、非機能性ヌクレアーゼドメイン（RuvCまたはHNHドメイン）を含む不活性型ヌクレアーゼであり得る。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、例えば、

50

FokIドメインとの融合を介して、DNA切断を可能にするように修飾されたdCas DNA結合剤を包含する。Casクリベース／ニッカーゼ及びdCas DNA結合剤には、III型CRISPRシステムのCsmまたはCmr複合体、そのCas10、Csm1、または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、及びクラス2 Casヌクレアーゼが含まれる。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DNA結合活性を有する一本鎖ポリペプチドである。クラス2 Casヌクレアーゼには、さらにRNAガイドDNAクリベースまたはニッカーゼ活性を有するクラス2 Casクリベース／ニッカーゼ（例えば、H840A、D10A、またはN863Aバリエーション）、及びクリベース／ニッカーゼ活性が不活性化されている、クラス2 dCas DNA結合剤が含まれる。クラス2 Casヌクレアーゼには、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9（例えば、N497A、R661A、Q695A、Q926Aバリエーション）、HypaCas9（例えば、N692A、M694A、Q695A、H698Aバリエーション）、eSPCas9（1.0）（例えば、K810A、K1003A、R1060Aバリエーション）、及びeSPCas9（1.1）（例えば、K848A、K1003A、R1060Aバリエーション）タンパク質、ならびにそれらの修飾物が含まれる。Cpf1タンパク質、Zetsche et al., Cell, 163:1-13 (2015)は、Cas9と相同であり、RuvC様ヌクレアーゼドメインを含む。ZetscheのCpf1配列は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。例えば、Zetscheの表S1及びS3を参照のこと。例えば、Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11):722-36 (2015)、Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015)を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0040】

Cas9分子の例示的なヌクレオチド及びポリペプチド配列を以下に提供する。代替の天然に存在するバリエーションを含む、Cas9ポリペプチド配列をコードする代替のヌクレオチド配列を同定するための方法は、当該技術分野において既知である。本明細書に提供されるアミノ酸配列をコードするCas9核酸配列、アミノ酸配列、または核酸配列のうちのいずれかに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する配列も企図される。

【0041】

Cas9の例示的なオープンリーディングフレーム（配列番号112）

AUGGACAAAGAAAGUACUCCAUCGGGCCUGGACAUUCGGGCACCA
ACUCCGUGGGGCGUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUAACAAGGU
GCCCUCCAAGAAAGUUCAAGGUGCUGGGGCAACACCGACCGG
CACUCCAUCAAGAAAGAAACCUGAUUCGGCGGCCUGCUGUUCG
ACUCCGGCGAGACCGCGCGAGGCCACCCGGCGUGAAGCGGGAC
CGCCCGGGCGGGCGGUACAACCCGGCGGGAAGAAACCGGGAUCUGC
UACCUGCAGGAGGAUCUUCUCCAACGAGGAUGGCCAAGGUGG
ACGACUCCUUCUUCACCGGGCUGGAGGAGUCCUUCUCCUGGU
GGAGGAGGACAAGAAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGC
AACAUUCGUGGACGAGGUGGGCCUACCAACGAGGAAGUAACCCCA
CCAUCUAACCAACCUUGCAGGAAGAAAGCUGGUGGACUCCAACCGA
CAAGGCCGACCUUGCAGGCGUGAUCUAACCUUGGCCCUUGGCCAC
AUGAUCAAGUUCCGGGGGCCACUUCUUGAUCGAGGGGCGACC
UGAACCCCGACAAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCA
GCUGGUGCAGACCUACAACCAAGCUGUUCGAGGAGAAACCCC
AUCAAACGCCUCCGGCGUGGACGCCCAAGGCCAUCCUGUCCG
CCCGGGCUGUCCAAGUCCCGGGCGGCGUGGAGAAACCUGAUCGC
CCAGCUGCCCGGGCGAGAAAGAAAGAACGGGCCUGUUCGGCAAC

50

CCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCCGGCCUUCAUCAAGCGGCAG
CUGGUGGAGACCCGGCAGAUCAACCAAGCACGUGGCCCCAGA
UCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGA
CAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCAACCCUGAAGUCC
AAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUC CAGUUCUACA
AGGUGC GGGAGAUCAACAACUACCACCGCCACGACGC
CUACCUGAACGCCCGUGGUGGGCACCGCCUGAUCAAGAAAG
UACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACA
AGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCCGCCAAGUCCGAGCA
GGAGAUCCGGCAAGGCCCACCGCCCAAGUACUUCUUCUACUCC
AACAUCAUGAACUUCUUCACAGACCGAGAUCAACCCUGGCCA
ACGGCGAGAUCCGGAAAGCGGGCCCCUGAUCCGAGACCAACGG
CGAGACCGGGCGAGAUCCGUGUGGGACAAGGGGCCGGGACUUC
GCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUUGCCCCAGGUGAACA
UCGUGAAGAAAGACCGAGGUGCAGACCGGGCGGCCUUCUCCAA
GGAGUCCAUCCUGCCCCAAGCGGGAACUCCGACAAAGCUGAUCC
GCCCGGAAGAAAGGACUGGGGACCCCCAAGAAAGUACGGCGGGCU
UCGACUCCCCCACCGUGGGCCUACUCCGUGCUGGUGGGUGGGC
CAAGGUGGAGAAAGGGCAAGUCCCAAGAAAGCUGAAGUCCGUG
AAGGAGCUGCUGGGCAUCAACCAUCAUGGAGCGGGUCCUCCU
UCGAGAAAGAACCCCAUCGACUUC CUGGAGGGCCAAGGGGCUA
CAAGGAGGUGAAGAAAGGACCGUAUCAUCAAGCUGCCCCAAG
UACUCCCCUGUUCGAGCUGGAGAAACGGGCCGGGAAGCGGGAUGC
UGGCCCUCCGCCCGGGCGAGCUGCAGAAAGGGGCAACGAGCUGGC
CCUGCCCCUCCAAGUACGUGAACUUC CUGUACCUGGCCCUCC
CACUACGAGAAAGCUGAAGGGGCUCCCCCGAGGACAAACGAGC
AGAAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAAGCACUACCUGGA
CGAGAUCAUCGAGCAGAUCCCGAGUUCUCCAAGCGGGGUG
AUCCUGGCCCGACGCCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCU
ACAACAAGCACCGGGGACAAGCCCCAUCCGGGGAGCAGGGCCGA
GAAACAUCAUCCACCCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGGCC
CCCGGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCAACCAUCGACCGGA
AGCGGUACACCUC CACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCU
GAUCCACCAAGUCCAUCAACCGGCCUGUACGAGACCCGGGAUC
GACCUGUCC CAGCUGGGGCGGGCGACGGCGGGCGGCCUCCCCA
AGAAAGAAAGCGGAAGGUGUGA

【0042】

C a s 9 の例示的なアミノ酸配列（配列番号113）

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGN TDR
HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRR YTRRK NRIC
YLQEIFS NEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERHP IFG
NIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAH
MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLFEENP
INASGVDAKATLSARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNGLFGN
LIA LSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDL DNLLA
QIGDQYADLFLAAKNLSDA ILLSDILRVNTEITKAPLSAS
MIKRYDEHHQDLTL LKALVRQQLP EKYKEIFFDQSKNGYA
GYIDGGASQEEFYKF I KPILEKMDGTEELLV KLNREDLLR
KQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDNREKI
EKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEE

VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTV
YNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVT
VKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKI
IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERLKT YA
HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQS GKTIL
DFLKSDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL
HEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIV
IEMARENQT TQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHP
VENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV DH
IVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMK 10
NYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ
LVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKK
YPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYS
NIMNFFFKTEIT LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDF
ATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI
ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSV
KELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI IKLPK
YSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF LYLAS
HYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKR V 20
ILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGA
PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRI
DLSQLGGDGGGSPKKKRKV

【0043】

Cas 9 の例示的なオープンリーディングフレーム（配列番号114）

AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGGAACAA
ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGA AUACAAGGU
CCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGA
CACAGCAUCAAGAAGAAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCG
ACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACUGAAGAGAAAC 30
AGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAAACAGAAUCUGC
UACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCG
ACGACAGCUUCUUCACACAGACUGGAAAGAAAGCUUCCUGGU
CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA
AACAUUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGA
CAAUCUAACCACCUGAGAAAGAAAGCUGGUCGACAGCACAGA
CAAGGCAGACCUGAGACUGAUUCUACCUGGCACUGGCACAC
AUGAUCAAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUUCGAAGGAGACC
UGAACCCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCA
GCUGGUCCAGACAUAACAACAGCUGUUCGAAGAAAACCCG 40
AUCAAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAAGGCAAUCCUGAGCG
CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAAAACCUGAUCGC
ACAGCUGCCCGGAGAAAGAAAGAAACGGACUGUUCGGAAAC
CUGAUCGCAACUGAGCCUGGGACUGACACCCGAACUUCAAGA
GCAACUUCGACCUUGGCAGAAAGACGCAAAAGCUGCAGCUGAG
CAAGGACACAUAACGACGACGACCUUGGACAACCUUGCUGGCA
CAGAUCCGGAGACCAGUACGACGACCUUGUUCUUGGCAGCAA
AGAACCUUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAG
AGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCCGCUGAGCGCAAGC
AUGAUCAAAGAGAUACGACGAAACACCCAGGACCUGACAC 50

U G C U G A A G G C A C U G G U C A G A C A G C A G C U G C C G G A A A A G U A
C A A G G A A A U C U U C U U C G A C C A G A G C A A G A A C G G A U A C G C A
G G A U A C A U C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A U U C U A C A
A G U U C A U C A A G C C G A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A C A G A
A G A A C U G C U G G U C A A G C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U G A G A
A A G C A G A G A A C A U U C G A C A A C G G A A G C A U C C C G C A C C A G A
U C C A C C U G G G A G A A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G A C A G G A
A G A C U U C U A C C C G U U C C U G A A G G A C A A C A G A G A A A A G A U C
G A A A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C G U C G G A C
C G C U G G C A A G A G G A A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A C A A G
A A A G A G C G A A G A A A C A A U C A C A C C G U G G A A C U U C G A A G A A
G U C G U C G A C A A G G G A G C A A G C G C A C A G A G C U U C A U C G A A A
G A A U G A C A A A C U U C G A C A A G A A A C C U G C C G A A C G A A A A G G U
C C U G C C G A A G C A C A G C C U G C U G U A C G A A U A C U U C A C A G U C
U A C A A C G A A C U G A C A A A G G U C A A G U A C G U C A C A G A A A G G A A
U G A G A A A G C C G G C A U U C C U G A G C G G A G A A C A G A A G A A G G C
A A U C G U C G A C C U G C U G U U C A A G A C A A A C A G A A A G G U C A C A
G U C A A G C A G C U G A A G G A A G A C U A C U U C A A G A A G A U C G A A U
G C U U C G A C A G C G U C G A A A U C A G C G G A G U C G A A G A C A G A U U
C A A C G C A A G C C U G G G A A C A U A C C A C G A C C U G C U G A A G A U C
A U C A A G G A C A A G G A C U U C C U G G A C A A C G A A G A A A A C G A A G
A C A U C C U G G A A G A C A U C G U C C U G A C A C U G A C A C U G U U C G A
A G A C A G A G A A A U G A U C G A A G A A A G A C U G A A G A C A U A C G C A
C A C C U G U U C G A C G A C A A G G U C A U G A A G C A G C U G A A G A G A A
G A A G A U A C A C A G G A U G G G G A A G A C U G A G C A G A A A G C U G A U
C A A C G G A A U C A G A G A C A A G C A G A G C G G A A A G A C A A U C C U G
G A C U U C C U G A A G A G C G A C G G A U U C G C A A A C A G A A A C U U C A
U G C A G C U G A U C C A C G A C G A C A G C C U G A C A U U C A A G G A A G A
C A U C C A G A A A G G C A C A G G U C A G C G G A C A G G G A G A C A G C C U G
C A C G A A C A C A U C G C A A A C C U G G C A G G A A G C C C G G C A A U C A
A G A A G G G A A U C C U G C A G A C A G U C A A G G U C G U C G A C G A A C U
G G U C A A G G U C A U G G G A A G A C A C A A G C C G G A A A A C A U C G U C
A U C G A A A A U G G C A A G A G A A A A C C A G A C A A C A C A G A A A G G G A C
A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A U G A A G A G A A U C G A A G A A G G
A A U C A A A G G A A C U G G G A A G C C A G A U C C U G A A G G A A C A C C C G
G U C G A A A A C A C A C A G C U G C A G A A C G A A A A G C U G U A C C U G U
A C U A C C U G C A G A A C G G A A G A G A C A U G U A C G U C G A C C A G G A
A C U G G A C A U C A A C A G A C U G A G C G A C U A C G A C G U C G A C C A C
A U C G U C C C G C A G A G C U U C C U G A A G G A C G A C A G C A U C G A C A
A C A A G G U C C U G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G G A A A G A G
C G A C A A C G U C C C G A G C G A A G A A G U C G U C A A G A A G A U G A A G
A A C U A C U G G A G A C A G C U G C U G A A C G C A A A G C U G A U C A C A C
A G A G A A A G U U C G A C A A C C U G A C A A A G G C A G A G A G A G G A G G
A C U G A G C G A A C U G G A C A A G G C A G G A U U C A U C A A G A G A C A G
C U G G U C G A A A C A A G A C A G A U C A C A A A G C A C G U C G C A C A G A
U C C U G G A C A G C A G A A U G A A C A C A A A G U A C G A C G A A A A C G A
C A A G C U G A U C A G A G A A G U C A A G G U C A U C A C A C U G A A A G A G C
A A G C U G G U C A G C G A C U U C A G A A A G G A C U U C C A G U U C U A C A
A G G U C A G A G A A A U C A A C A A C U A C C A C C A C G C A C A C G A C G C
A U A C C U G A A C G C A G U C G U C G G A A C A G C A C U G A U C A A G A A G

10

20

30

40

50

U A C C C G A A G C U G G A A A G C G A A U U C G U C U A C G G A G A C U A C A
A G G U C U A C G A C G U C A G A A A G A U G A U C G C A A A G A G C G A A C A
G G A A A U C G G A A A G G C A A C A G C A A A G U A C U U C U U C U A C A G C
A A C A U C A U G A A C U U C U U C A A G A C A G A A A U C A C A C U G G G C A A
A C G G A G A A A U C A G A A A G A G A C C G C U G A U C G A A A C A A A C G G
A G A A A C A G G A G A A A U C G U C U G G G A C A A G G G A A G A G A C U U C
G C A A C A G U C A G A A A G G U C C U G A G C A U G C C G C A G G U C A A C A
U C G U C A A G A A G A C A G A A G U C C A G A C A G G A G G A U U C A G C A A
G G A A A G C A U C C U G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C U G A U C
G C A A G A A A G A A G G A C U G G G A C C C G A A G A A G U A C G G A G G A U 10
U C G A C A G C C C G A C A G U C G C A U A C A G C G U C C U G G U C G U C G C
A A A G G U C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C U G A A G A G C G U C
A A G G A A C U G C U G G G A A U C A C A A U C A U G G A A A G A A G C A G C U
U C G A A A A G A A C C C G A U C G A C U U C C U G G A A G C A A A G G G A U A
C A A G G A A G U C A A G A A G G A C C U G A U C A U C A A G C U G C C G A A G
U A C A G C C U G U U C G A A C U G G A A A A C G G A A G A A A G A G A A U G C
U G G C A A G C G C A G G A G A A C U G C A G A A G G G A A A C G A A C U G G C
A C U G C C G A G C A A A G U A C G U C A A C U U C C U G U A C C U G G C A A G C
C A C U A C G A A A A G C U G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C G A A C
A G A A G C A G C U G U U C G U C G A A C A G C A C A A G C A C U A C C U G G A 20
C G A A A U C A U C G A A C A G A U C A G C G A A U U C A G C A A G A G A G U C
A U C C U G G C A G A C G C A A A C C U G G A C A A G G U C C U G A G C G C A U
A C A A C A A G C A C A G A G A C A A A G C C G A U C A G A G A A C A G G C A G A
A A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C A C U G A C A A A C C U G G G A G C A
C C G G C A G C A U U C A A G U A C U U C G A C A C A A C A A U C G A C A G A A
A G A G A U A C A C A A G C A C A A A G G A A G U C C U G G A C G C A A C A C U
G A U C C A C C A G A G C A U C A C A G G A C U G U A C G A A A C A A G A A U C
G A C C U G A G C C A G C U G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A G C C C G A
A G A A G A A G A G A A A G G U C U A G

【0044】

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、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casヌクレアーゼ、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)とともに含むガイドRNAを指す。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、Cas9などのRNAガイドDNA結合剤を標的配列へとガイドし、ガイドRNAは、標的配列とハイブリダイズし、薬剤が標的配列に結合し、その場合、この薬剤はクリベースまたはニッカーゼであり、結合の後に切断またはニッキングを行うことができる。

【0045】

本明細書で使用される場合、「標的配列」は、gRNAのガイド配列に対して相補性を有する、すなわち、ガイド配列に対してガイド配列の特異的結合を可能にするのに十分に相補的である、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DNA結合剤が、標的配列内で結合し、潜在的に(薬剤の活性に応じて)ニックを形成するか、または切断するように指向される。

【0046】

本明細書で使用される場合、第2の配列に対する第1の配列のアラインメントにより、第2の配列の位置の全体での全てが第1の配列によって一致することが示される場合、第1の配列は、第2の配列と「同一」であるか、または「100%の同一性を有する」とみなされる。例えば、配列AAGAは、配列AAGに対して100%の同一性を有するが、その理由は、アラインメントが、第1の配列の3つの全ての位置においてギャップなしで一致があるという点で100%の同一性を与えるからである。100%未満の同一性は、

10

20

30

40

50

通常の方法を使用して計算することができる。例えば、第1の配列の3つの位置のうちの2つが第2の配列と一致するため、A C Gは、A A G Aと67%の同一性を有するであろう ($2/3 = 67\%$)。RNAとDNAとの間の差（一般に、チミジンをウリジンに交換すること、またはその逆）、及び修飾ウリジンなどのヌクレオシド類似体の存在は、関連するヌクレオチド（チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンなど）が同じ相補体（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンの全てについてのアデノシン；別の例は、シトシン及び5-メチルシトシンであり、これらの両方が相補体としてグアノシンまたは修飾グアノシンを有する）を有する限り、ポリヌクレオチド間の同一性または相補性の差に寄与しない。したがって、例えば、Xがいずれかの修飾ウリジン、例えば、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、または5-メトキシウリジンである配列5'-A X Gは、両方とも同じ配列（5'-C A U）に完全に相補的である点において、A U Gと100%同一であるとみなされる。例示的なアラインメントアルゴリズムは、当該技術分野において周知である、S m i t h - W a t e r m a n及びN e e d l e m a n - W u n s c hアルゴリズムである。当業者は、アラインメントされる配列の所与の対について、どのようなアルゴリズム及びパラメータ設定の選択が適切であるかを理解するであろう。一般的に類似する長さ及び予想される同一性がアミノ酸については50%超の配列、またはヌクレオチドについては75%超の配列に関して、www.ebi.ac.ukウェブサーバでEBIによって提供されるN e e d l e m a n - W u n s c hアルゴリズムインターフェースのデフォルト設定を用いたN e e d l e m a n - W u n s c hアルゴリズムが一般的に適切である。

10

20

【0047】

同様に、本明細書で使用される場合、第1の配列のヌクレオチドの全てが、ギャップなしで第2の配列に対して相補的であるとき、第1の配列は、第2の配列に対して「完全に相補的」または100%相補的であるとみなされる。例えば、配列U C Uは、ギャップなしで、第1の配列からの核酸塩基の各々が第2の配列のヌクレオチドと塩基対合しているため、配列A A G Aに対して完全に相補的であるとみなされるであろう。配列U G Uは、第1の配列の3つの核酸塩基のうちの2つが第2の配列の核酸塩基と塩基対合しているため、配列A A G Aに対して67%相補的であるとみなされる。当業者は、例えば、N C B I B L A S Tインターフェース (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) またはN e e d l e m a n - W u n s c hアルゴリズムを使用して、任意の配列の対について相補性パーセントを決定するために、様々なパラメータ設定でアルゴリズムが利用可能であることを理解するであろう。

30

【0048】

「mRNA」は、ポリペプチドへと翻訳することができる（すなわち、リボソーム及びアミノアシル化tRNAによる翻訳のための基質として機能し得る）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ために本明細書で使用される。mRNAは、リボース残基またはその類似体を含むリン酸糖骨格（例えば、2'-メトキシリボース残基）を含むことができる。いくつかの実施形態では、mRNA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、またはそれらの組み合わせから本質的になる。

40

【0049】

本明細書に記載のガイドRNA組成物及び方法に有用な例示的なガイド配列を、表1及び本出願全体に示す。例えば、表1がガイド配列を示す場合、このガイド配列をガイドRNAで使用して、RNAガイド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を標的配列に指向することができる。標的配列は、ゲノム座標として表1に提供され、ゲノムDNAのプラス鎖とマイナス鎖（すなわち、与えられる配列と、配列の逆相補体）の両方を含む。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に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列におけるUのTへの置換を除いて、標的配列の特定のヌクレオチド（例えば、PAMを含まない標的配列）と同一である。

【0050】

50

本明細書で使用される場合、「インデル」は、標的核酸内の二本鎖切断（DSB）の部位において挿入されるか、または欠失するかのいずれかである多数のヌクレオチドからなる挿入／欠失変異を指す。

【0051】

本明細書で使用される場合、「発現を阻害する」は、特定の遺伝子産物（例えば、タンパク質、mRNA、またはその両方）の発現の減少を指す。タンパク質（すなわち、遺伝子産物）の発現は、目的の組織または細胞集団からのタンパク質の総細胞量を、細胞集団の個々のメンバーとしてのタンパク質の発現を、例えば、タンパク質を発現する細胞のパーセントを定義するための細胞選別によって、または集団中の細胞におけるタンパク質の発現を、例えば、ELISAもしくはウェスタンブロットによって、検出することによって測定することができる。発現の阻害は、全長遺伝子産物または任意の遺伝子産物が、もはや発現されなくなるような、遺伝子配列、例えば、ゲノム配列の遺伝子修飾、例えば、遺伝子のノックダウンから生じ得る。特定の遺伝子修飾は、全長遺伝子産物の翻訳を妨げるフレームシフトまたはナンセンス変異の導入をもたらし得る。スプライス部位、例えば、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位に十分に近い位置での遺伝子修飾は、スプライシングを破壊するために、全長タンパク質の翻訳を妨げることができる。発現の阻害は、遺伝子産物、例えば、プロモーター配列、3' UTR配列、例えば、キャッピング配列、5' UTR配列、例えば、ポリA配列の発現に必要なゲノム配列内の調節配列における遺伝子修飾に起因し得る。また、発現の阻害は、遺伝子産物の翻訳に必要な調節因子の発現または活性、例えば、遺伝子産物の産生を妨げることによって起因し得る。例えば、全長転写因子の発現を阻害する転写因子配列の遺伝子修飾は、下流効果を有し、転写因子によって制御される1つ以上の遺伝子産物の発現の発現を阻害することができる。したがって、発現の阻害は、ゲノムまたはmRNA配列の変化によって予測することができる。したがって、発現の阻害をもたらすと予想される変異は、目的の組織または細胞集団から単離されたmRNAのシーケンシングを含む既知の方法によって検出することができる。発現の阻害は、タンパク質の所定の発現レベル、すなわち、少なくとも特定のレベルで目的のタンパク質を発現する集団内の細胞のパーセントまたは数の減少を有する集団内の細胞のパーセントとして決定することができる。発現の阻害はまた、例えば、細胞または組織試料、例えば、生検試料における全体的なタンパク質レベルの減少を決定することによって評価することができる。特定の実施形態では、分泌タンパク質の発現の阻害は、流体試料、例えば、細胞培地または体液中で評価することができる。タンパク質は、タンパク質レベルの分析を可能にするために、体液、例えば、血液または尿中に存在し得る。特定の実施形態では、タンパク質レベルは、タンパク質活性または代謝産物のレベル、例えば、尿または血液中のタンパク質活性または代謝産物のレベルによって決定され得る。いくつかの実施形態では、「発現の阻害」は、特定の遺伝子産物の発現のいくつかの喪失、例えば、転写されるmRNAの量の減少、または細胞集団によって発現されるタンパク質の量の減少を指し得る。いくつかの実施形態では、「阻害」は、特定の遺伝子産物、例えば、細胞表面におけるTIM3遺伝子産物の発現のある程度の喪失を指し得る。ノックダウンのレベルは、同じタイプの対象試料における開始レベルに対して相対的であることが理解される。例えば、タンパク質レベルのルーチンモニタリングは、組織試料（例えば、生検試料）よりも、対象（例えば、血液または尿）からの流体試料においてより容易に実施される。ノックダウンのレベルは、アッセイされている試料についてであることが理解される。同様に、連続した組織試料、例えば、肝臓組織が得られ得る動物研究において、ノックダウン標的は、他の組織において発現され得る。したがって、ノックダウンのレベルは、必ずしも全身的なノックダウンのレベルではなく、試料採取される組織、細胞型、または流体内のノックダウンのレベルである。

【0052】

本明細書で使用される場合、「遺伝子修飾」は、例えば、CRISPR/Cas9 gRNA及びCas9系によって誘導される、DNAレベルでの変化である。遺伝子修飾は、典型的には、定義された配列またはゲノム遺伝子座内で、挿入、欠失、または置換（す

10

20

30

40

50

なわち、塩基配列置換、すなわち、変異)を含み得る。遺伝子修飾は、DNAの核酸配列を変化させる。遺伝子修飾は、単一のヌクレオチド位置にあり得る。遺伝子修飾は、複数のヌクレオチド、例えば、2、3、4、5個以上のヌクレオチド、典型的には、互いに近接している、例えば、連続ヌクレオチドであってよい。遺伝子修飾は、コード配列、例えば、エクソン配列内にあり得る。遺伝子修飾は、スプライス部位、すなわち、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位に十分に近い位置にあり、スプライシングを破壊することができる。遺伝子修飾は、ゲノム遺伝子座に内因性ではないヌクレオチド配列の挿入、例えば、異種のオープンリーディングフレームまたは遺伝子のコード配列の挿入を含むことができる。本明細書で使用される場合、好ましくは、遺伝子修飾は、ゲノム遺伝子座の遺伝子修飾の前に、全長タンパク質のアミノ酸配列を有する全長タンパク質の翻訳を防止する。全長タンパク質または遺伝子産物の翻訳の防止は、任意の長さのタンパク質または遺伝子産物の翻訳の防止を含む。例えば、早期終止コドンの生成をもたらすフレームシフト変異によって、またはナンセンス変異の生成によって、全長タンパク質の翻訳を防止することができる。全長タンパク質の翻訳は、スプライシングの破壊によって防止することができる。

10

【0053】

本明細書で使用される場合、「異種コード配列」は、細胞内の外因性ソースとして導入された(例えば、TCR遺伝子座を含むセーフハーバー遺伝子座などのゲノム遺伝子座に挿入された)コード配列を指す。すなわち、導入されたコード配列は、少なくともその挿入部位に関して異種である。そのような異種コード配列遺伝子から発現されるポリペプチドは、「異種ポリペプチド」と称される。異種コード配列は、天然に存在するか、または操作することができ、野生型またはバリエーションであり得る。異種コード配列は、異種ポリペプチドをコードする配列(例えば、内部リボソーム侵入部位)以外のヌクレオチド配列を含み得る。異種コード配列は、野生型またはバリエーション(例えば、変異体)として、ゲノム内で天然に存在するコード配列であり得る。例えば、細胞は(野生型またはバリエーションとして)目的のコード配列を含有するが、同じコード配列またはそのバリエーションを、例えば、高発現の遺伝子座での発現のための外因性ソースとして導入することができる。異種gコード配列はまた、ゲノム中に天然に存在しないか、またはゲノム中に天然に存在しない異種ポリペプチドを発現するコード配列であり得る。「異種コード配列」、「外因性コード配列」、及び「導入遺伝子」は、互換的に使用される。いくつかの実施形態では、異種コード配列または導入遺伝子は、外因性核酸配列を含み、例えば、核酸配列は、レシピエント細胞に内因性ではない。いくつかの実施形態では、異種コード配列または導入遺伝子は、外因性核酸配列、例えば、レシピエント細胞内に天然に存在しない核酸配列を含む。例えば、異種コード配列は、その挿入部位に関して、及びそのレシピエント細胞に関して異種であり得る。

20

30

【0054】

「セーフハーバー」遺伝子座は、遺伝子が細胞に著しい有害な影響を及ぼすことなく挿入され得るゲノム内の遺伝子座である。本明細書で使用するためにヌクレアーゼ(複数可)によって標的とされるセーフハーバー遺伝子座の非限定的な例としては、AAVS1(PPP1R12C)、TCR、B2Mが挙げられる。いくつかの実施形態では、TRC遺伝子、例えば、TRAC遺伝子などのノックダウンを標的とする遺伝子座または遺伝子座(複数)における挿入は、細胞にとって有利である。他の好適なセーフハーバー遺伝子座は、当該技術分野において既知である。

40

【0055】

本明細書で使用される場合、「標的化受容体」は、細胞、例えば、T細胞の表面上に存在して、標的部位、例えば、生物内の特定の細胞または組織への細胞の結合を可能にする受容体を指す。標的化受容体としては、キメラ抗原受容体(CAR)、T細胞受容体(TCR)、及びタンパク質の細胞外受容体部分の結合時にT細胞を活性化することができる内部シグナル伝達ドメイン内の少なくとも膜貫通ドメインを通して作動可能に連結された細胞表面分子の受容体が挙げられるが、これらに限定されない。

50

【0056】

本明細書で使用される場合、キメラ抗原受容体は、細胞外抗原認識ドメイン、例えば、抗原が結合されるときにT細胞を活性化する細胞内シグナル伝達ドメインに作動可能に連結される、s c F v、V H H、ナノボディを指す。C A Rは、抗原認識ドメイン、細胞外ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、及び細胞内T細胞シグナル伝達ドメインの4つの領域で構成される。そのような受容体は、当該技術分野において周知である（例えば、各々の内容の対応する部分が参照により本明細書に組み込まれる、W O 2 0 2 0 0 9 2 0 5 7、W O 2 0 1 9 1 9 1 1 1 4、W O 2 0 1 9 1 4 7 8 0 5、W O 2 0 1 8 2 0 8 8 3 7を参照のこと）。アダプター分子を介した標的細胞への免疫細胞の結合を促進する逆ユニバーサルC A R（例えば、その内容全体が本明細書に組み込まれる、W O 2 0 1 9 2 3 8 7 2 2を参照のこと）も企図される。C A Rは、抗体が開発され得る任意の抗原を標的とすることができ、典型的には、標的とされる細胞または組織の表面上に表示される分子を対象とする。

10

【0057】

本明細書で使用される場合、「治療」は、対象における疾患または障害のための投与または治療の任意の適用を指し、その疾患を阻害すること、その進行を止めること、その疾患の1つ以上の症状を緩和すること、その疾患を治癒させること、その疾患の1つ以上の症状を防止すること、またはその疾患の1つ以上の症状の再発を防止することを含む。自己免疫応答または炎症応答または障害を治療することは、疾患特異的症状の緩和をもたらす特定の障害に関連する炎症を緩和することを含み得る。本明細書に記載される操作されたT細胞による治療は、追加の治療薬、例えば、治療される適応症の標準的なケアの前、後、またはそれと組み合わせて使用され得る。

20

【0058】

ヒト野生型T I M 3 配列は、N C B I G e n e I D : 8 4 8 6 8 ; E n s e m b l : E N S G 0 0 0 0 0 1 3 5 0 7 7 で利用可能である。T I M 3 3、T細胞免疫グロブリンムチン3、腎臓傷害分子-3、C D 3 6 6 抗原、C D 3 6 6、K I M - 3、S P T C L、T i m - 3、A型肝炎ウイルス細胞受容体、T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質、T細胞免疫グロブリンムチンファミリーメンバー、T細胞免疫グロブリンムチン受容体、T細胞膜タンパク質、H A V c r - 2、T I M D - 3、及びT I M D 3 は、T I M - 3 の遺伝子同義語である。

30

【0059】

本明細書で使用される場合、「T細胞受容体」または「T C R」は、T細胞における受容体を指す。一般に、T C Rは、2つのT C Rポリペプチド鎖、 α 及び β を含有するヘテロ二量体受容体分子である。 α 及び β 鎖T C Rポリペプチドは、様々なC D 3 分子と複合体化し、抗原結合後に炎症及び自己免疫を含む免疫応答（複数可）を誘発することができる。本明細書で使用される場合、T C Rのノックダウンは、任意のT C R遺伝子の部分的または全体的なノックダウン、例えば、単独で、または他のT C R遺伝子（複数可）の部分的または全体のノックダウンとの組み合わせで、T R B C 1 遺伝子の一部の欠失を指す。

40

【0060】

「T R A C」は、T細胞受容体 α 鎖を指すために使用される。ヒト野生型T R A C 配列は、N C B I G e n e I D : 2 8 7 5 5 ; E n s e m b l : E N S G 0 0 0 0 0 2 7 7 3 4 で利用可能である。T細胞受容体アルファ定数、T C R A、I M D 7、T R C A 及びT R A は、T R A C の遺伝子同義語である。

【0061】

「T R B C」は、T細胞受容体 β 鎖、例えば、T R B C 1 及びT R B C 2 を指すために使用される。「T R B C 1」及び「T R B C 2」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、これらは、T R B C 1 またはT R B C 2 遺伝子の遺伝子産物である。

【0062】

50

ヒト野生型TRBC1配列は、NCBI Gene ID: 28639; Ensembl: ENSG00000211751で利用可能である。T細胞受容体ベータ定数、V__セグメント翻訳産物、BV05S1J2.2、TCRBC1、及びTCRBは、TRBC1の遺伝子同義語である。

【0063】

ヒト野生型TRBC2配列は、NCBI Gene ID: 28638; Ensembl: ENSG00000211772で利用可能である。T細胞受容体ベータ定数、V__セグメント翻訳産物、及びTCRBC2は、TRBC2の遺伝子同義語である。

【0064】

「T細胞」は、抗原への曝露後の免疫応答において中心的な役割を果たす。例えば、T細胞が、エンジニアリングによって、例えば、幹細胞から、または分化転換によって、例えば、体細胞をリプログラミングすることによって形成されるとき、T細胞は、天然に存在し得るか、または非天然であり得る。T細胞は、細胞表面上のT細胞受容体の存在によって他のリンパ球と区別することができる。この定義には、ヘルパーCD4+T細胞、細胞傷害性CD8+T細胞、メモリーT細胞、及び調節CD4+T細胞を含む、従来の適応性T細胞、ならびにナチュラルキラーT細胞、粘膜関連不変T細胞、及びガンマデルタT細胞を含む自然様T細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、T細胞は、CD4+である。いくつかの実施形態では、T細胞は、CD3+/CD4+である。

【0065】

本明細書で使用される場合、「MHC」または「MHCタンパク質」は、主要な組織適合性複合体分子（または複数）を指し、例えば、MHCクラスI分子（例えば、ヒトにおけるHLA-A、HLA-B、及びHLA-C）ならびにMHCクラスII分子（例えば、ヒトにおけるHLA-DP、HLA-DQ、及びHLA-DR）を含む。

【0066】

「CIITA」または「CIITA」または「C2TA」は、本明細書で使用される場合、「クラスII主要組織適合性複合体トランスアクチベーター」の核酸配列またはタンパク質配列を指し、ヒト遺伝子は、受託番号NC__000016.10（範囲10866208...10941562）、参照GRCh38.p13を有する。核内のCIITAタンパク質は、MHCクラスII遺伝子転写の陽性調節因子として作用し、MHCクラスIIタンパク質発現に必要である。

【0067】

「β2M」または「B2M」は、本明細書で使用される場合、「β-2ミクログロブリン」の核酸配列またはタンパク質配列を指し、ヒト遺伝子は、受託番号NC__000015（範囲44711492...44718877）、参照GRCh38.p13を有する。B2Mタンパク質は、核化細胞の表面上のヘテロ二量体としてMHCクラスI分子と関連しており、MHCクラスIタンパク質発現に必要である。

【0068】

「HLA-A」という用語は、HLA-Aタンパク質の文脈で本明細書で使用される場合、重鎖（HLA-A遺伝子によってコードされる）及び軽鎖（すなわち、ベーター2ミクログロブリン）からなるヘテロ二量体である、MHCクラスIタンパク質分子を指す。

「HLA-A」または「HLA-A遺伝子」という用語は、核酸の文脈で本明細書で使用される場合、HLA-Aタンパク質分子の重鎖をコードする遺伝子を指す。HLA-A遺伝子は、「HLAクラスI組織適合性、Aアルファ鎖」とも称され、ヒト遺伝子は、受託番号NC__000006.12（29942532...29945870）を有する。HLA-A遺伝子は、集団全体にわたって何千もの異なるバージョン（「対立遺伝子とも称される」）を有することが知られている（また個体は、HLA-A遺伝子の2つの異なる対立遺伝子を受け取ることができる）。配列情報を含むHLA-A対立遺伝子の公開データベースは、IPD-IMGT/HLA: www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/でアクセスすることができる。HLA-Aの全ての対立遺伝子は、「HLA-A」及び「HLA-A遺伝子」という用語によって包含される。

【0069】

本明細書で使用される場合、「ゲノム座標内」という用語は、与えられたゲノム座標範囲の境界を含む。例えば、chr6:29942854-chr6:29942913が与えられた場合、座標chr6:29942854-chr6:29942913が包含される。本出願を通して、参照されるゲノム座標は、国立バイオテクノロジー情報センターのウェブサイトで入手可能なゲノム参照コンソーシアムからのヒトゲノムのGRCh38(hg38とも称される)アセンブリにおけるゲノム注釈に基づいている。1つのアセンブリと別のアセンブリとの間でゲノム座標を変換するためのツール及び方法は、当該技術分野において既知であり、同じ機関によって、または同じアルゴリズムを使用して生成された以前のアセンブリへの変換(例えば、GRCh38からGRCh37への)、及び異なる機関またはアルゴリズムによって生成されたアセンブリの変換(例えば、GRCh38から国際ヒトゲノムシーケンシングコンソーシアムによって生成されたNCBI33への)を含む、本明細書に提供されるゲノム座標をヒトゲノムの別のアセンブリの対応する座標に変換するために使用され得る。当該技術分野において既知の利用可能な方法及びツールとしては、国立バイオテクノロジー情報センターのウェブサイトで入手可能なNCBIゲノム再マッピングサービス、UCSC Genome Browserのウェブサイトで入手可能なUCSC LiftOver、及びEnsembl.orgのウェブサイトで入手可能なAssembly Converterが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0070】

本明細書で使用される「スプライス部位」は、アクセプタースプライス部位もしくはドナースプライス部位(以下に定義する)を構成する3個のヌクレオチド、またはスプライス部位の一部である当該技術分野で既知の任意の他のヌクレオチドを指す。例えば、Burrset et al., Nucleic Acids Research 28(21):4364-4375(2000)(乳類ゲノムにおけるカノニカル及び非標準的なスプライス部位を記載する)を参照のこと。「アクセプタースプライス部位」を構成する3個のヌクレオチドは、イントロンの3'における2つの保存された残基(例えば、ヒトにおけるAG)及び境界ヌクレオチド(すなわち、AGのエクソン3'の第1のヌクレオチド)である。アクセプタースプライス部位の「スプライス部位境界ヌクレオチド」は、以下の図では「Y」と表記され、本明細書では「アクセプタースプライス部位境界ヌクレオチド」または「スプライスアクセプター部位境界ヌクレオチド」とも称され得る。「アクセプタースプライス部位」、「スプライスアクセプター部位」、「アクセプタースプライス配列」、または「スプライスアクセプター配列」という用語は、本明細書では互換的に使用され得る。

20

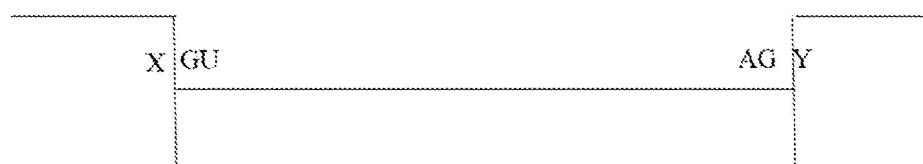
30

【0071】

「ドナースプライス部位」を構成する3個のヌクレオチドは、イントロン及び境界ヌクレオチド(すなわち、GTのエクソン5'の第1のヌクレオチド)の5'末端における2つの保存された残基(例えば、ヒトにおけるGT(遺伝子)またはGU(pre-mRNAなどのRNAにおける))である。ドナースプライス部位の「スプライス部位境界ヌクレオチド」は、以下の図では「X」と表記され、本明細書では「ドナースプライス部位境界ヌクレオチド」または「スプライスドナー部位境界ヌクレオチド」とも称され得る。「ドナースプライス部位」、「スプライスドナー部位」、「ドナースプライス配列」、または「スプライスドナー配列」という用語は、本明細書では互換的に使用され得る。

40

50



50

【0077】

s g R N A の場合、ガイド配列は、S p y C a s 9 s g R N A 配列をさらに含んでもよい。S p y C a s 9 s g R N A 配列の例は、ガイド配列の3'末端に含まれる以下の表（配列番号201 G U U U U A G A G C U A G A A A U A G C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A A G U G G C A C C G A G U C G G U G C - 「例示的な S p y C a s 9 s g R N A - 1」）に示され、以下の表に示されるようなドメインを備えている。L S は、下部ステムである。B は、バルジである。U S は、上部ステムである。H 1 及び H 2 は、それぞれ、ヘアピン1 及びヘアピン2 である。H 1 及び H 2 は、総称して、ヘアピン領域と称される。構造のモデルは、参照により本明細書に組み込まれる、W O 2 0 1 9 2 3 7 0 6 9 の図 1 0 A に提供される。

10

【0078】

例示的な S p y C a s 9 s g R N A - 1 のヌクレオチド配列は、特定の化学修飾、配列置換及び切断のためのテンプレート配列として機能し得る。

【0079】

特定の実施形態では、g R N A は、例えば、s g R N A または d g R N A であり、任意選択で、化学修飾を含む。いくつかの実施形態では、修飾 s g R N A は、ガイド配列及び S p y C a s 9 s g R N A 配列、例えば、例示的な S p y C a s 9 s g R N A - 1 を含む。s g R N A などの g R N A は、ガイド配列の5'末端またはガイド配列の3'末端、例えば、例示的な S p y C a s 9 s g R N A - 1、末端ヌクレオチドのうちの1つ以上、例えば、3'末端または5'末端におけるヌクレオチドのうちの1、2、3、または4つにおける修飾を含み得る。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル（2'-O-Me）修飾ヌクレオチド、2'-O-（2-メトキシエチル）（2'-O-moe）修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ（2'-F）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート（P S）連結、及び反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-O-Me 修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、P S 連結を含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-O-Me 修飾ヌクレオチド及び P S 連結を含む。

20

【0080】

特定の実施形態では、（配列番号201「例示的な S p y C a s 9 s g R N A - 1」）を例として使用して、例示的な S p y C a s 9 s g R N A - 1 は、以下のうちの1つ以上をさらに含む。

30

【0081】

A. 短縮されたヘアピン1 領域、または置換されかつ任意選択で短縮されたヘアピン1 領域であって、

1. 以下のヌクレオチド対：H 1 - 1 及び H 1 - 1 2、H 1 - 2 及び H 1 - 1 1、H 1 - 3 及び H 1 - 1 0、または H 1 - 4 及び H 1 - 9 のうちの少なくとも1つが、ヘアピン1 においてワトソン-クリック対形成ヌクレオチドで置換されており、ヘアピン1 領域が、任意選択で、

a. H 1 - 5 ~ H 1 - 8 のうちのいずれか1つもしくは2つ、

40

b. 以下のヌクレオチド対：H 1 - 1 及び H 1 - 1 2、H 1 - 2 及び H 1 - 1 1、H 1 - 3 及び H 1 - 1 0、ならびに H 1 - 4 及び H 1 - 9 のうちの1つ、2つ、もしくは3つ、または

c. ヘアピン1 領域の1 ~ 8 個のヌクレオチドを欠いているか、あるいは

2. 短縮されたヘアピン1 領域が、4 ~ 8 個のヌクレオチド、好ましくは4 ~ 6 個のヌクレオチドを欠いており、

a. 位置 H 1 - 1、H 1 - 2、もしくは H 1 - 3 のうちの1つ以上が、例示的な S p y C a s 9 s g R N A - 1 に対して欠失もしくは置換されているか、または

b. 位置 H 1 - 6 ~ H 1 - 1 0 のうちの1つ以上が、例示的な S p y C a s 9 s g R N A - 1 に対して置換されているか、あるいは

50

3. 短縮されたヘアピン1領域が、5～10個のヌクレオチド、好ましくは5～6個のヌクレオチドを欠いており、位置N18、H1-12、もしくはnのうちの1つ以上が、例示的なSpyCas9 sgRNA-1に対して置換されている、短縮されたヘアピン1領域、あるいは

【0082】

B. 短縮された上部ステム領域であって、短縮された上部ステム領域が、1～6個のヌクレオチドを欠いており、短縮された上部ステム領域の6、7、8、9、10、または11個のヌクレオチドが、例示的なSpyCas9 sgRNA-1に対して4個以下の置換を含む、短縮された上部ステム領域、あるいは

【0083】

C. LS6、LS7、US3、US10、B3、N7、N15、N17、H2-2及びH2-14のうちのいずれか1つ以上における例示的なSpyCas9 sgRNA-1と比較した置換であって、置換基ヌクレオチドが、アデニンが後に続くピリミジンでもなく、ピリミジンが前に存在するアデニンでもない、置換、あるいは

【0084】

D. 上部ステム領域を有する例示的なSpyCas9 sgRNA-1であって、上部ステム修飾が、上部ステム領域におけるUS1～US12のうちのいずれか1つ以上の修飾を含み、

1. 修飾ヌクレオチドが、任意選択で、2'-O-メチル(2'-OMe)修飾ヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(2'-O-moe)修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート(PS)連結、反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、もしくはそれらの組み合わせから選択されるか、または

2. 修飾ヌクレオチドが、任意選択で、2'-OMe修飾ヌクレオチドを含む、例示的なSpyCas9 sgRNA-1。

【0085】

特定の実施形態では、例示的なSpyCas9 sgRNA-1(配列番号201)、または例示的なSpyCas9 sgRNA-1を含むsgRNAなどのsgRNAは、3'テール、例えば、1、2、3、4個、またはそれ以上のヌクレオチドの3'テールをさらに含む。特定の実施形態では、テールは、1個以上の修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル(2'-OMe)修飾ヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(2'-O-moe)修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート(PS)連結、反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-OMe修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド間にPS連結を含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-OMe修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド間にPS連結を含む。

【0086】

特定の実施形態では、ヘアピン領域は、1個以上の修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル(2'-OMe)修飾ヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(2'-O-moe)修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート(PS)連結、反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-OMe修飾ヌクレオチドを含む。

【0087】

特定の実施形態では、上部ステム領域は、1個以上の修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル(2'-OMe)修飾ヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(2'-O-moe)修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート(PS)連結、

10

20

30

40

50

反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-OMe修飾ヌクレオチドを含む。

【0088】

特定の実施形態では、例示的なSpyCas9 sgRNA-1は、1つ以上のYAジヌクレオチドを含み、Yは、ピリミジンであり、YAジヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル(2'-OMe)修飾ヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシエチル)(2'-O-moe)修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート(PS)連結、反転した脱塩基修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-OMe修飾ヌクレオチドを含む。 10

【0089】

特定の実施形態では、例示的なSpyCas9 sgRNA-1は、1つ以上のYAジヌクレオチドを含み、Yは、ピリミジンであり、YAジヌクレオチドは、置換ヌクレオチド、すなわち、配列置換ヌクレオチドを含み、ピリミジンは、プリンで置換される。特定の実施形態において、ピリミジンが単一ガイド内にワトソン-クリック塩基対を形成するとき、置換されたピリミジンヌクレオチドのワトソン-クリックベースのヌクレオチドは、ワトソン-クリック塩基対を維持するために置換される。

20

30

40

50

【表 1】

例示的な s p y C a s 9 s g R N A - 1 (配列番号 2 0 1)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
G	U	U	U	U	A	G	A	G	C	U	A	G	A	A	A	U	A	G	C	A	A	G	U	U	A	A	A	A	U	
LS1-LS6						B1-B2			US1-US12													B2-B6			LS7-LS12					

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
A	A	G	G	C	U	A	G	U	C	C	G	U	U	A	U	C	A	A	C	U	U	G	A	A	A	A	A	G	U
ネクサス																		H1-1 ~ H1-12											

61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
G	G	C	A	C	C	G	A	G	U	C	G	G	U	G	C
H2-1 ~ H2-15															
N															

【表 2 - 1】

表 1 : T I M 3 ガイド配列及び染色体座標

ガイド識別番号	配列番号	TIM3識別番号	ガイド配列	ゲノム座標(hg38)
CR008839	1	TIM3-1	GACGGGCACGA GGUUCCUG	chr5:157106867- 157106887
CR008910	2	TIM3-2	AACCUCGUGCC CGUCUGCUG	chr5:157106862- 157106882
CR008898	3	TIM3-3	GGUGCUCAGGA CUGAUGAAA	chr5:157106803- 157106823
CR008906	4	TIM3-4	GCUCCUUUGCC CCAGCAGAC	chr5:157106850- 157106870
CR008894	5	TIM3-5	AGUCGGUGCAG GGGUGACCU	chr5:157104726- 157104746
CR008877	6	TIM3-6	UUAUGCCUGGG AUUUGGAUC	chr5:157106668- 157106688
CR008883	7	TIM3-7	UCCAAGGAUG CUUACCACC	chr5:157104681- 157104701
CR008862	8	TIM3-8	GGUGGUAAGCA UCCUUGGAA	chr5:157104681- 157104701
CR008861	9	TIM3-9	UCCAAGGAUGC UUACCACCA	chr5:157104680- 157104700
CR008840	10	TIM3-10	UGCUGCCGGAU CCAAAUCCC	chr5:157106676- 157106696
CR008915	11	TIM3-11	GGAGGUUGGCC AAAGAGAUG	chr5:157087271- 157087291
CR008856	12	TIM3-12	CCACAUUGGCC AAUGAGUUA	chr5:157095432- 157095452

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

ガイド識別番号	配列番号	TIM3識別番号	ガイド配列	ゲノム座標(hg38)
CR008829	13	TIM3-13	AUAGGCAUCU ACAUCGGAGC	chr5:157095361- 157095381
CR008830	14	TIM3-14	UAGGCAUCUA CAUCGGAGCA	chr5:157095360- 157095380
CR008913	15	TIM3-15	AGCAGCAGGA CACAGUCAA	chr5:157108945- 157108965
CR008831	16	TIM3-16	CCGUAACUCA UUGGCCAAUG	chr5:157095429- 157095449
CR008832	17	TIM3-17	UCUAGAGUCC CGUAACUCAU	chr5:157095420- 157095440
CR008833	18	TIM3-18	CUAAAUAGGG AUUCCGCAA	chr5:157106751- 157106771
CR008834	19	TIM3-19	UGAGUUACGG GACUCUAGAU	chr5:157095419- 157095439
CR008835	20	TIM3-20	UCCAGAGUCC CGUAAGUCAU	chr5:157095393- 157095413
CR008836	21	TIM3-21	AGACGGGCAC GAGGUUCCCU	chr5:157106866- 157106886
CR008837	22	TIM3-22	CCAAGGAUGC UUACCACCAG	chr5:157104679- 157104699
CR008838	23	TIM3-23	UGUGUUUGAA UGUGGCAACG	chr5:157106824- 157106844
CR008841	24	TIM3-24	CAUCCAGAU CUGGCUAAAU	chr5:157106765- 157106785
CR008842	25	TIM3-25	GCCAAUGACU UACGGGACUC	chr5:157095397- 157095417

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

ガイド識別番号	配列番号	TIM3識別番号	ガイド配列	ゲノム座標(hg38)
CR008843	26	TIM3-26	CGACAACCCA AAGGUUGUGA	chr5:157087117- 157087137
CR008844	27	TIM3-27	GUUGUUUCUG ACAUUAGCCA	chr5:157104746- 157104766
CR008845	28	TIM3-28	CUGCCCCAUG CAUAGUUACC	chr5:157104646- 157104666
CR008846	29	TIM3-29	UCUGGAGCAA CCAUCAGAAU	chr5:157095379- 157095399
CR008847	30	TIM3-30	GAACCUCGUG CCCGUCUGCU	chr5:157106863- 157106883
CR008848	31	TIM3-31	GCGACAACCC AAAGGUUGUG	chr5:157087116- 157087136
CR008849	32	TIM3-32	GGAACCUCGU GCCCCGUCUGC	chr5:157106864- 157106884
CR008850	33	TIM3-33	CUGGUUUGAU GACCAACUUC	chr5:157106626- 157106646
CR008851	34	TIM3-34	CAGACGGGCA CGAGGUUCCC	chr5:157106865-157106885
CR008852	35	TIM3-35	GCAGCAACCC UCACAACCUU	chr5:157087127-157087147
CR008853	36	TIM3-36	AAUGUGGCAA CGUGGUGCUC	chr5:157106816-157106836
CR008854	37	TIM3-37	AUUGCAAAGC GACAACCCAA	chr5:157087108-157087128
CR008855	38	TIM3-38	UUCUACACCC CAGCCGCCCC	chr5:157106886-157106906

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

ガイド識別番号	配列番号	TIM3識別番号	ガイド配列	ゲノム座標(hg38)
CR008857	39	TIM3-39	AUCCCCAUUU AGCCAGUAUC	chr5:157106759-157106779
CR008858	40	TIM3-40	CUUACUGUUA GAUUUAUAUC	chr5:157098852-157098872
CR008859	41	TIM3-41	GAUGUAGAUG CCUAUUCUGA	chr5:157095366-157095386
CR008860	42	TIM3-42	CUAGAUUGGC CAAUGACUUA	chr5:157095405-157095425
CR008863	43	TIM3-43	CACAUUGGCC AAUGAGUUAC	chr5:157095431-157095451
CR008864	44	TIM3-44	UAGAUUGGCC AAUGACUUAC	chr5:157095404-157095424
CR008865	45	TIM3-45	ACGUUGCCAC AUUCAACAC	chr5:157106823-157106843
CR008866	46	TIM3-46	AUGCUUACCA CCAGGGGACA	chr5:157104673-157104693
CR008867	47	TIM3-47	GUGGAAUACA GAGCGGAGGU	chr5:157106931- 157106951
CR008868	48	TIM3-48	UCUACACCCC AGCCGCCCCA	chr5:157106885- 157106905
CR008869	49	TIM3-49	CUGUUAGAUU UAUAUCAGGG	chr5:157098856- 157098876
CR008870	50	TIM3-50	CCCCUGGUGG UAAGCAUCCU	chr5:157104676- 157104696
CR008871	51	TIM3-51	AUCGGAGCAG GGAUCUGUGC	chr5:157095349- 157095369

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

ガイド識別番号	配列番号	TIM3識別番号	ガイド配列	ゲノム座標(hg38)
CR008872	52	TIM3-52	UGGUGCUCAG GACUGAUGAA	chr5:157106804-157106824
CR008873	53	TIM3-53	UCCAUAAGCAA AUAUCCACAU	chr5:157095446-157095466
CR008874	54	TIM3-54	CAUGCAA AUG UCCACUCACC	chr5:157106607-157106627
CR008875	55	TIM3-55	CAACCUCCCU CCCUCAGGAU	chr5:157087259-157087279
CR008876	56	TIM3-56	GGCGGCUGGG GUGUAGAAGC	chr5:157106888-157106908
CR008878	57	TIM3-57	AUCAGAAUAG GCAUCUACAU	chr5:157095367-157095387
CR008879	58	TIM3-58	CAGCAACCCU CACAACCUUU	chr5:157087126-157087146
CR008880	59	TIM3-59	UUGCCAAUCC UGAGGGAGGG	chr5:157087253-157087273
CR008881	60	TIM3-60	AUUAUUGCUA UGUCAGCAGC	chr5:157087149-157087169
CR008882	61	TIM3-61	ACGAGGUUCC CUGGGGCGGC	chr5:157106874-157106894
CR008884	62	TIM3-62	GCGGCUGGGG UGUAGAAGCA	chr5:157106889-157106909
CR008885	63	TIM3-63	AGAAGUGGAA UACAGAGCGG	chr5:157106935-157106955
CR008886	64	TIM3-64	UCGGAGCAGG GAUCUGUGCU	chr5:157095348-157095368

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

ガイド識別番号	配列番号	TIM3識別番号	ガイド配列	ゲノム座標(hg38)
CR008887	65	TIM3-65	ACAGUGGGAU CUACUGCUGC	chr5:157106690-157106710
CR008888	66	TIM3-66	UGAAAAAUUU AACCUGAAGU	chr5:157106641-157106661
CR008889	67	TIM3-67	UGCCCCAGCA GACGGGCACG	chr5:157106857-157106877
CR008890	68	TIM3-68	CUAUGCAGGG UCCUCAGAAG	chr5:157106950-157106970
CR008891	69	TIM3-69	AAAUAAGGUG GUUGGAUCUA	chr5:157087084-157087104
CR008892	70	TIM3-70	CAUUUGCCAA UCCUGAGGGA	chr5:157087250-157087270
CR008893	71	TIM3-71	UCAGGGACAC AUCUCCUUUG	chr5:157106734-157106754
CR008895	72	TIM3-72	UUGGCAA AUG CAGUAGCAGA	chr5:157087240-157087260
CR008896	73	TIM3-73	UUUUCAUCAU UCAUUAUGCC	chr5:157106655-157106675
CR008897	74	TIM3-74	AUCCAGAUAC UGGCUAAAUG	chr5:157106764-157106784
CR008899	75	TIM3-75	ACCUGGGCCA UGUCCCCUGG	chr5:157104663-157104683
CR008900	76	TIM3-76	GCAUUUGCCA AUCCUGAGGG	chr5:157087249-157087269
CR008901	77	TIM3-77	CAGCAGCAGG ACACAGUCAA	chr5:157108944-157108964

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

ガイド識別番号	配列番号	TIM3識別番号	ガイド配列	ゲノム座標(hg38)
CR008902	78	TIM3-78	GUUACCUGGG CCAUGUCCCC	chr5:157104660- 157104680
CR008903	79	TIM3-79	GCCACAUUCA AACACAGGAC	chr5:157106828- 157106848
CR008904	80	TIM3-80	ACAUCCAGAU ACUGGCUAAA	chr5:157106766- 157106786
CR008905	81	TIM3-81	GCCUGUCCUG UGUUUGAAUG	chr5:157106832- 157106852
CR008907	82	TIM3-82	CGAGGUUCCC UGGGGCGGCU	chr5:157106875- 157106895
CR008908	83	TIM3-83	UACUGCAUUU GCCAAUCCUG	chr5:157087245- 157087265
CR008909	84	TIM3-84	GAGGUUCCCU GGGGCGGCUG	chr5:157106876- 157106896
CR008911	85	TIM3-85	CAUUCAUUAU GCCUGGGAUU	chr5:157106662- 157106682
CR008912	86	TIM3-86	AGAGAACGUA UAUGAAGUGG	chr5:157087184- 157087204
CR008914	87	TIM3-87	CGCUCUGUAU UCCACUUCUG	chr5:157106936- 157106956
CR008916	88	TIM3-88	ACUUCACUGC AGCCUUUCCA	chr5:157104696- 157104716

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 2 : T I M 3 を標的とする s g R N A

ガイド識別番号	配列番号	sgRNA配列	ゲノム座標(hg38)
G015078	89	UGUGUUUGAAUGUGGGCAACGGUUUUAGAGCU AGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	chr5:15710682 4-157106844
G015079	90	CGACAACCCAAAGGUUGUGAGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUU	chr5:15708711 7-157087137
G015080	91	GGAACCUCGUGCCCGUCUGCGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUU	chr5:15710686 4-157106884
G015081	92	GGCGGCUGGGGUGUAGAAGCGUUUUAGAGCU AGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	chr5:15710688 8-157106908
G015082	93	UUGCCAAUCCUGAGGGGAGGGGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUU	chr5:15708725 3-157087273
G015083	94	AGAAGUGGAAUACAGAGCGGGUUUUAGAGCU AGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	chr5:15710693 5-157106955
G015084	95	UGAAAAAUUUAAACCUGAAGUGUUUUAGAGCU AGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU	chr5:15710664 1-157106661
G015085	96	AGUCGGUGCAGGGGUGACCUGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUU	chr5:15710472 6-157104746
G015086	97	ACCUGGGCCAUGUCCCCUGGGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUU	chr5:15710466 3-157104683

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

ガイド識別番号	配列番号	sgRNA配列	ゲノム座標(hg38)
G015087	98	CGCUCUGUAUUCCACUUCUGGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157106936- 157106956
G015088	99	AUAGGCAUCUACAUCGGAGCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157095361- 157095381
G015089	100	CCACAUUGGCCAAUGAGUUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157095432- 157095452
G015090	101	UAGGCAUCUACAUCGGAGCAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157095360- 157095380
G015091	102	AGCAGCAGGACACAGUCAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157108945- 157108965
G015092	103	GCUCCUUUGCCCCAGCAGACGUUUUA GAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157106850- 157106870
G015093	104	GGUGGUAAGCAUCCUUGGAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157104681- 157104701
G015094	105	UUCCAAGGAUGCUUACCACCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157104681- 157104701
G016811	106	AACCUCGUGCCCGUCUGCUGGUUUUA GAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157106862- 157106882

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

ガイド識別番号	配列番号	sgRNA配列	ゲノム座標(hg38)
G016812	107	GACGGGCACGAGGUUCCCUGGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157106867- 157106887
G016813	108	GGUGCUCAGGACUGAUGAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	chr5:157106803- 157106823
G018436 、TIM3- 15の修飾 sgRNA	109	mA*mG*mC*AGCAGGACACAGUCAA GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	chr5:157108945- 157108965
G018437 、TIM3- 4の修飾 sgRNA	110	mG*mC*mU*CCUUUGCCCCAGCAGAC GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	chr5:157106850- 157106870
G020845 、TIM3- 2の修飾 sgRNA	111	mA*mA*mC*CUCGUGCCCGUCUGCUG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	chr5:157106862- 157106882

* = P S 連結、m = 2' - O - Me ヌクレオチド、N = 任意の天然または非天然ヌクレオチド

【0090】

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）であってもよいRNAガイドDNA結合剤を、TIM3中の標的DNA配列に指向させるガイド配列を含む1つ以上のガイドRNA（gRNA）を含む組成物を提供する。gRNAを含むいくつかの実施形態では、gRNAは、例えばsgRNAとして、表1に示されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号1～15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87、及び88；配列番号1～4、6～15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86、及び88；配列番号1～5、7、8、12～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び87；配列番号2、4、15、23、56、59、63、75、及び87；配列番号1～4；配列番号2、4、及び15；配列番号2、4、15、63、及び87；配列番号2及び15；配列番号63及び87；または配列番号15から選択されるガイド配列を含み得る。gRNAは、表1に示されるガイド配列の17、18、19、または20個の

連続ヌクレオチドを含むガイド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、gRNAは、表1に示されるガイド配列、任意選択で、配列番号1～15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87、及び88；配列番号1～4、6～15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86、及び88；配列番号1～5、7、8、12～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び87；配列番号2、4、15、23、56、59、63、75、及び87；配列番号1～4；配列番号2、4、及び15；配列番号2、4、15、63、及び87；配列番号2及び15；配列番号63及び87；または配列番号15の少なくとも17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%、または100%の同一性を有する配列を含むガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、表1に示されるガイド配列、任意選択で、配列番号1～15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87、及び88；配列番号1～4、6～15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86、及び88；配列番号1～5、7、8、12～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び87；配列番号2、4、15、23、56、59、63、75、及び87；配列番号1～4；配列番号2、4、及び15；配列番号2、4、15、63、及び87；配列番号2及び15；配列番号63及び87；または配列番号15に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、または95%、または100%の同一性を有するガイド配列を含む。gRNAは、trRNAをさらに含み得る。本明細書に記載される各実施形態では、gRNAは、単一RNA (sgRNA) として、または別個のRNA (dgRNA) 上で会合したcrRNA及びtrRNAを含んでいてもよい。sgRNAの文脈において、crRNA及びtrRNAの構成要素は、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され得る。

10

20

30

40

50

【0091】

本明細書に記載される各々の実施形態では、ガイドRNAは、「デュアルガイドRNA」または「dgRNA」として2つのRNA分子を含み得る。dgRNAは、例えば、表1に示されるガイド配列を含むcrRNAを含む第1のRNA分子と、trRNAを含む第2のRNA分子と、を含む。第1のRNA分子及び第2のRNA分子は共有結合していてもよいが、crRNA及びtrRNAの部分の間の塩基対形成によってRNA二本鎖を形成してもよい。

【0092】

本明細書に記載される各々の実施形態では、ガイドRNAは、「単一ガイドRNA」または「sgRNA」として単一のRNA分子を含み得る。sgRNAは、表1に示されるガイド配列、あるいはtrRNAに共有結合された、配列番号1～15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87、及び88；配列番号1～4、6～15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86、及び88；配列番号1～5、7、8、12～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び87；配列番号2、4、15、23、56、59、63、75、及び87；配列番号1～4；配列番号2、4、及び15；配列番号2、4、15、63、及び87；配列番号2及び15；配列番号63及び87；または配列番号15から選択されるガイド配列を含むcrRNA（もしくはその部分）を含み得る。sgRNAは、表1に示されるガイド配列の17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または配列番号1～15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87、及び88；配列番号1～4、6～15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86、及び88；配列番号1～5、7、8、12～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び87；配列番号2、4、15、23、56、59、63、75、及び87；配列番号1～4；配列番号2、4

、及び15；配列番号2、4、15、63、及び87；配列番号2及び15；配列番号63及び87；もしくは配列番号15から選択されるガイド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、crRNA及びtrRNAは、リンカーを介して共有結合される。いくつかの実施形態では、sgRNAは、crRNAとtrRNAの部分の間の塩基対形成によって、ステムループ構造を形成する。いくつかの実施形態では、crRNA及びtrRNAは、ホスホジエステル結合ではない1つ以上の結合を介して共有結合される。

【0093】

いくつかの実施形態では、trRNAは、天然に存在するCRISPR/Cas系由来のtrRNA配列の全てまたは一部を含み得る。いくつかの実施形態では、trRNAは、先端切断または修飾された野生型trRNAを含む。trRNAの長さは、使用される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個より多いヌクレオチドを含むか、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つ以上のヘアピン構造もしくはステムループ構造、または1つ以上のバルジ構造などの特定の二次構造を含み得る。

10

【0094】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号1～88、好ましくは配列番号1～15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87、及び88；配列番号1～4、6～15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86、及び88；配列番号1～5、7、8、12～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び87；配列番号2、4、15、23、56、59、63、75、及び87；配列番号1～4；配列番号2、4、及び15；配列番号2、4、15、63、及び87；配列番号2及び15；配列番号63及び87；または配列番号15のうちのいずれか1つのガイド配列を含む、1つ以上のガイドRNAを含む組成物を提供する。

20

【0095】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号89～111のうちのいずれか1つを含む1つ以上のsgRNAを含む組成物を提供する。

【0096】

一態様では、本発明は、配列番号1～88、好ましくは配列番号1～15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87、及び88；配列番号1～4、6～15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86、及び88；配列番号1～5、7、8、12～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び87；配列番号2、4、15、23、56、59、63、75、及び87；配列番号1～4；配列番号2、4、及び15；配列番号2、4、15、63、及び87；配列番号2及び15；配列番号63及び87；または配列番号15の核酸のうちのいずれかと100%、または少なくとも95%もしくは90%同一であるガイド配列を含む、gRNAを含む組成物を提供する。

30

40

【0097】

他の実施形態では、組成物は、配列番号1～88、好ましくは配列番号1～15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87、及び88；配列番号1～4、6～15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86、及び88；配列番号1～5、7、8、12～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び87；配列番号2、4、15、23、56、59、63、75、及び87；配列番号1～4；配列番号2、4、及び15；配列番号2、4、15、63、及び87；配列番号2及び15；配列番号63及び87；または配列番号15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

50

を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号 1～88、好ましくは配列番号 1～15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87、及び 88；配列番号 1～4、6～15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86、及び 88；配列番号 1～5、7、8、12～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び 87；配列番号 2、4、15、23、56、59、63、75、及び 87；配列番号 1～4；配列番号 2、4、及び 15；配列番号 2、4、15、63、及び 87；配列番号 2 及び 15；配列番号 63 及び 87；または配列番号 15 の核酸のうちのいずれかと 100%、または少なくとも 95% もしくは 90% 同一のガイド配列を各々が含む、少なくとも 2 つの gRNA を含む。

10

【0098】

本発明のガイド RNA 組成物は、TIM3 遺伝子内の標的配列を認識する（例えば、それに対してハイブリダイズする）ように設計される。例えば、TIM3 標的配列は、ガイド RNA を含む提供される Cas 開裂によって認識され、切断され得る。いくつかの実施形態では、RNA ガイド DNA 結合剤、例えば、Cas クリベースは、ガイド RNA を TIM3 遺伝子の標的配列に対して指向させてもよく、ガイド RNA のガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、RNA ガイド DNA 結合剤、例えば、Cas クリベースは、標的配列を切断する。

【0099】

いくつかの実施形態では、1 つ以上のガイド RNA の選択は、TIM3 遺伝子内の標的配列に基づいて決定される。

20

【0100】

いかなる特定の理論にも拘束されることなく、遺伝子の特定の領域における変異（例えば、ヌクレアーゼ媒介性 DSB の結果として生じるインデル、すなわち挿入または欠失に起因するフレームシフト変異）は、遺伝子の他の領域における変異よりも許容性が低くてもよく、したがって、DSB の位置は、もたらされ得るタンパク質ノックダウンの量または種類における重要な因子である。いくつかの実施形態では、TIM3 内の標的配列に対して相補的であるか、または相補性を有する gRNA は、RNA ガイド DNA 結合剤を TIM3 遺伝子内の特定の位置に指向させるために使用される。いくつかの実施形態では、gRNA は、TIM3 のエクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5、エクソン 6、エクソン 7、またはエクソン 8 内の標的配列に対して相補的であるか、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ている。

30

【0101】

いくつかの実施形態では、ガイド配列は、ヒト TIM3 遺伝子内に存在する標的配列または標的配列の逆相補体と 100%、または少なくとも 95% もしくは 90% 同一である。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り得る。いくつかの実施形態では、ガイド RNA のガイド配列とそれに対応する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%、85%、90%、もしくは 95%、または 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% 相補的であるか、または同一であり得る。他の実施形態では、標的配列と gRNA のガイド配列は、少なくとも 1 個のミスマッチを含んでいてもよい。例えば、標的配列と gRNA のガイド配列は、1、2、3、または 4 個のミスマッチを含んでいてもよく、ここで、ガイド配列の全長は、約 20 である。いくつかの実施形態では、標的配列と gRNA のガイド配列は、1～4 個のミスマッチを含んでいてもよく、ここで、ガイド配列は、20 個のヌクレオチドである。

40

【0102】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の組成物または製剤は、RNA ガイド DNA 結合剤、例えば、本明細書に記載の Cas ヌクレアーゼ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では、RNA ガイド DNA 結合剤、例えば、Cas ヌクレアーゼをコードする ORF を含む mRNA が提供され

50

るか、使用されるか、または投与される。

【0103】

B. 修飾 gRNA 及び mRNA

いくつかの実施形態では、gRNA は、化学修飾されている。1つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含む gRNA は、標準的な A、G、C、及び U 残基の代わりに、またはそれらに加えて使用される 1つ以上の非天然または天然に存在する成分または構造の存在を記載するために、「修飾」gRNA または「化学修飾」gRNA と呼ばれる。いくつかの実施形態では、修飾 gRNA は、非標準的な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「修飾された」と呼ばれる。修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、(i) ホスホジエステル骨格連結における改変、例えば、非架橋のリン酸酸素の 1つもしくは両方、または、架橋リン酸酸素の 1つ以上の置き換え（例示的な骨格修飾）、(ii) リボース糖の成分、例えば、リボース糖の 2' ヒドロキシルの改変、例えば、置き換え（例示的な糖修飾）、(iii) リン酸部分の「脱リン酸型」リンカーによる大規模な置き換え（例示的な骨格修飾）、(iv) 非標準的な核酸塩基によるものを含め、天然に存在する核酸塩基の修飾または置き換え（例示的な塩基修飾）、(v) リボースリン酸骨格の置き換えまたは修飾（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、修飾もしくは置き換え、または部分、キャップ、もしくはリンカーのコンジュゲーション（そのような 3' または 5' のキャップ修飾は、糖及び／または骨格の修飾を含み得る）、ならびに (vii) 糖の修飾または置き換え（例示的な糖修飾）の 1つ以上を含み得る。

【0104】

上に列挙されるものなどの化学修飾を組み合わせて、2、3、4、またはそれ以上の修飾を有し得るヌクレオシド及びヌクレオチド（まとめて「残基」）を含む修飾 gRNA または mRNA を提供することができる。例えば、修飾残基は、修飾糖及び修飾核酸塩基を有し得る。いくつかの実施形態では、gRNA の各々の塩基は修飾され、例えば、全ての塩基がホスホロチオエートなどの修飾リン酸基を有する。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によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、修飾 gRNA は、RNA の 5' 末端において、またはその近傍において少なくとも 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' 末端において、またはその近傍において少なくとも 1つの修飾残基を含む。

【0105】

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 内の位置の少なくとも 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%、少なくとも 95%、または 100%）が、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドである。

【0106】

非修飾核酸は、例えば、細胞内ヌクレアーゼまたは血清中に見られるものによる分解を受けやすい場合がある。例えば、ヌクレアーゼは核酸のホスホジエステル結合を加水分解し得る。したがって、一態様において、本明細書に記載される gRNA は、例えば、細胞内または血清に由来するヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、1つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾 gRNA 分子は、インビボとエクシボの両方において細胞集団に導入されるとき、低減した自然免疫応答を示し得る。「自然免疫応答」という用語は、サイトカイン（特にインターフェロン）発現及び放出の誘導及び細胞死を含む、一本鎖核酸を含む外来性核酸に対する細胞応答を含む。

【0107】

骨格修飾のいくつかの実施形態では、修飾された残基のリン酸基は、1つ以上の酸素を異なる置換基によって代置することによって修飾され得る。さらに、修飾残基、例えば修飾核酸中に存在する修飾残基は、本明細書において記載されるように、非修飾リン酸部分の修飾リン酸基による大規模な置き換えを含み得る。いくつかの実施形態では、リン酸骨格の骨格修飾は、帯電していないリンカーまたは非対称な電荷分布を有する帯電したリンカーのいずれかをもたらす改変を含み得る。

【0108】

修飾されたリン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、及びホスホトリエステルが挙げられる。非修飾リン酸基中のリン酸原子は、アキラルである。しかしながら、非架橋酸素のうちの1つの、上述の原子または原子群のうちの1つによる置き換えは、リン原子をキラルにすることができる。立体リン原子は、「R」配置（本明細書においてRp）または「S」配置（本明細書においてSp）のいずれかを有し得る。骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素）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）、及び炭素（架橋メチレンホスホネート）による置き換えによってもまた修飾できる。置き換えは、いずれかの架橋酸素または両方の架橋酸素において生じ得る。

10

【0109】

リン酸基は、特定の主鎖修飾において、非リン含有連結基によって置き換えることができる。いくつかの実施形態では、帯電したリン酸基は、中性部分によって置き換えることができる。リン酸基を置き換えることのできる部分の例は、非限定的に、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、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリナー、スフホネート、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（methylenehydrazo）、メチレンジメチルヒドラゾ（methylenedimethylhydrazo）、メチレンオキシメチルイミノ（methyleneoxymethylimino）を含み得る。

20

【0110】

リン酸リンカー及びリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチドの代替物によって置き換えられている、核酸を模倣することができる足場もまた構築できる。そのような修飾は、骨格及び糖修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、代替骨格によって係留され得る。例は、非限定的に、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、及びペプチド核酸（PNA）ヌクレオシド代替物を含み得る。

30

【0111】

修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドは、糖基に対する1つ以上の修飾、すなわち糖修飾を含み得る。例えば、2'ヒドロキシル基（OH）は、修飾されていてもよく、例えば、多くの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基によって置き換えることができる。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、ヒドロキシルが2'-アルコキシドイオンを形成するように脱プロトン化されることがもはや起こり得ないため、核酸の安定性を増強し得る。

40

【0112】

2'ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシまたはアリールオキシ（OR、式中「R」がアルキル、シクロアルキル、アリール、アラキル、ヘテロアリール、または糖であり得る）、ポリエチレングリコール（PEG）、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ であって式中Rが、例えば、Hまたは任意選択で置換されたアルキルであり、nが0～20の整数であり得るもの（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、及び4～20）を含み得る。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であり得る。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素で置き換える2'-フルオロ修飾であり

50

得る。いくつかの実施形態では、2'ヒドロキシル基修飾は、2'ヒドロキシルが、例えば C_1-C_6 アルキレンまたは C_1-C_6 ヘテロアルキレン架橋を介して同一のリボース糖の4'炭素へと接続し得る「ロックド」核酸 (LNA) を含んでいてもよく、例示的な架橋としては、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋、O-アミノ (ここで、アミノは、例えば、 NH_2 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る)、及びアミノアルコキシ、 $O(CH_2)_n$ -アミノ (ここで、アミノは、例えば、 NH_2 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る) を含み得る。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 $C_2'-C_3'$ 結合を欠失している「アンロックド (unlocked)」核酸 (UNA) を含み得る。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) を含み得る。

10

20

30

40

50

【0113】

「デオキシ」2'修飾は、水素 (すなわち、デオキシリボース糖、例えば、部分的な dsRNA の突出部分)、ハロ (例えば、ブロモ、クロロ、フルオロ、またはヨード)、アミノ (ここでアミノは、例えば、 NH_2 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸であり得る)、 $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -アミノ (ここでアミノは、例えば、本明細書において記載されるようなものである)、 $-NH-C(O)R$ (ここで 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、または糖であり得る)、シアノ、メルカプト、アルキル-チオールアルキル、チオールアルコキシ、ならびにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニル及びアルキニルを含み得、任意選択で、例えば本明細書において記載されるようなアミノによって置換されていてもよい。

【0114】

糖修飾は、1つ以上の炭素を含み、リボースにおける対応する炭素のものとは反対の立体化学配置を有する糖基を含み得る。したがって、修飾核酸は、糖として例えばアラビノースを含むヌクレオチドを含み得る。修飾核酸はまた、脱塩基糖をも含み得る。これらの脱塩基糖はまた、構成要素の糖原子の1つ以上においてさらに修飾され得る。修飾核酸はまた、L型である1つ以上の糖、例えばL-ヌクレオシドを含み得る。

【0115】

修飾核酸に組み込むことのできる本明細書に記載される修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドは、核酸塩基とも呼ばれる修飾塩基を含み得る。核酸塩基の例は、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、及びウラシル (U) を含むが、これらに限定されない。これらの核酸塩基は、修飾されて、または完全に置き換えられて、修飾核酸に組み込むことのできる修飾残基をもたらすことができる。ヌクレオチドの核酸塩基は、独立して、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選択することができる。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、例えば、天然に存在する塩基、及び塩基の合成誘導体を含み得る。

【0116】

デュアルガイドRNAを用いる実施形態において、crRNAとtracrRNAの各々は、修飾を含み得る。このような修飾は、crRNAまたはtracrRNAの一方または両方の末端に存在してもよい。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つ以上の残基が化学修飾され得るか、または内部ヌクレオシドが修飾され得るか、またはsgRNA全体が化学修飾され得る。特定の実施形態は、5'末端修飾を含む。特定の実施形態は、3'末端修飾を含む。特定の実施形態は、5'末端修飾及び3'末端修飾を含む。

【0117】

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、2017年12月8日に出版された「Chemically Modified Guide RNAs」という発明の名称のWO2018/107028(A1)に開示された修飾パターンの1つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。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、US20170114334号に開示された構造／修飾パターンの1つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。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、WO2017/136794に開示された構造／修飾パターンのうちの1つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0118】

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うちのいずれかを含み、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の全体は、例えば、表1で本明細書に記載されるTIM3ガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、修飾sgRNAは、以下の配列：mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAAGAmGmCmUmAmGmAmmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号300）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ってもよく、Nの全体は、表1に記載されるTIM3ガイド配列を含む。例えば、Nは、表1に本明細書で開示されるガイド配列のうちのいずれかで置き換えられ、任意選択で、Nは、配列番号1～88、または配列番号1～15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87、及び88；配列番号1～4、6～15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86、及び88；配列番号1～5、7、8、12～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び87；配列番号2、4、15、23、56、59、63、75、及び87；配列番号1～4；配列番号2、4、及び15；配列番号2、4、15、63、及び87；配列番号2及び15；配列番号63及び87；または配列番号15で置き換えられる。

【0119】

以下に記載される修飾のいずれも、本明細書に記載されるgRNA及びmRNA内に存在し得る。

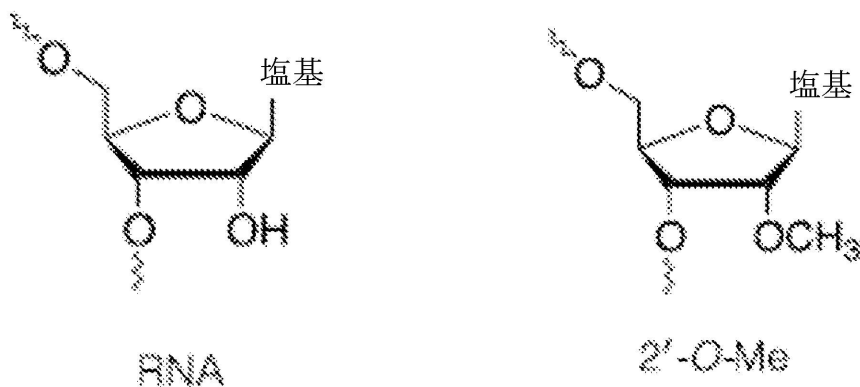
【0120】

「mA」、「mC」、「mU」、または「mG」という用語は、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。

【0121】

2'-O-メチルの修飾は、以下のように描写され得る。

【化2】



【0122】

ヌクレオチド糖環に影響を及ぼすことが示されている別の化学修飾は、ハロゲン置換である。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及びヌクレアーゼ安定性を増加させることができる。

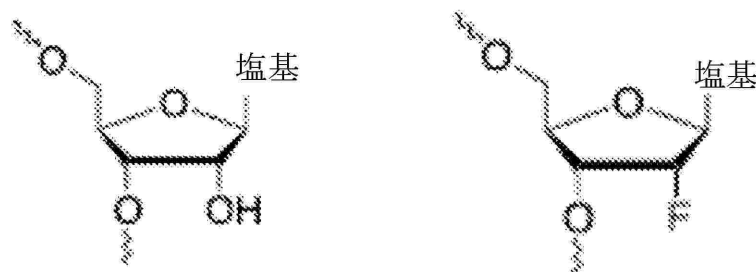
【0123】

本出願では、「fA」、「fC」、「fU」、または「fG」という用語を使用して、2'-Fで置換されたヌクレオチドを表すことができる。

【0124】

2'-Fの置換は、以下のように描写され得る。

【化3】



RNA

2'-F-RNA

RNAの天然組成物

2'-F'置換

10

20

【0125】

ホスホロチオエート(PS)連結または結合とは、ホスホジエステル連結、例えばヌクレオチド塩基間の結合での1個の非架橋リン酸酸素を硫黄が置換する結合を指す。ホスホロチオエートを使用してオリゴヌクレオチドを生成する場合、修飾オリゴヌクレオチドは、S-オリゴとも称され得る。

【0126】

PS修飾を示すために、「*」を使用し得る。本出願では、用語A*、C*、U*、またはG*を使用して、PS結合で隣りの(例えば3')ヌクレオチドに連結されているヌクレオチドを示すことができる。

30

【0127】

本出願では、「mA*」、「mC*」、「mU*」、または「mG*」という用語を使用して、2'-O-Meで置換され、PS結合で次の(例えば3')ヌクレオチドに連結されているヌクレオチドを示すことができる。

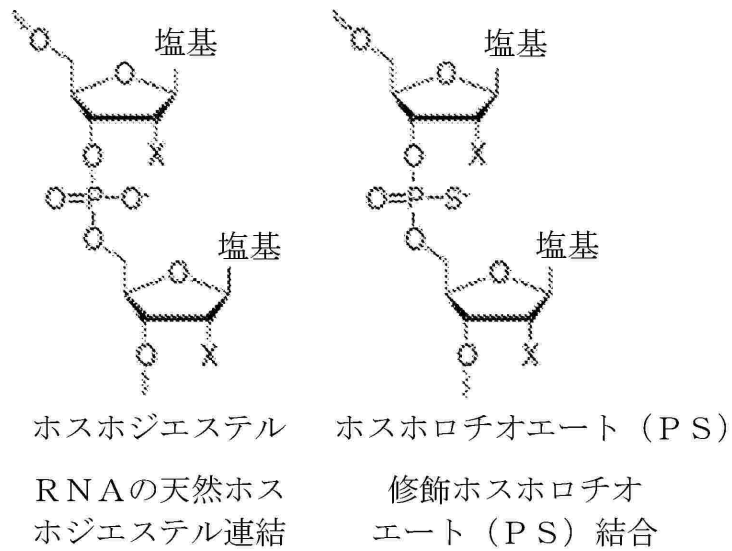
【0128】

以下の図は、ホスホジエステル結合の代わりにPS結合を生じる、非架橋リン酸酸素へのS-の置換を示す。

40

50

【化 4】



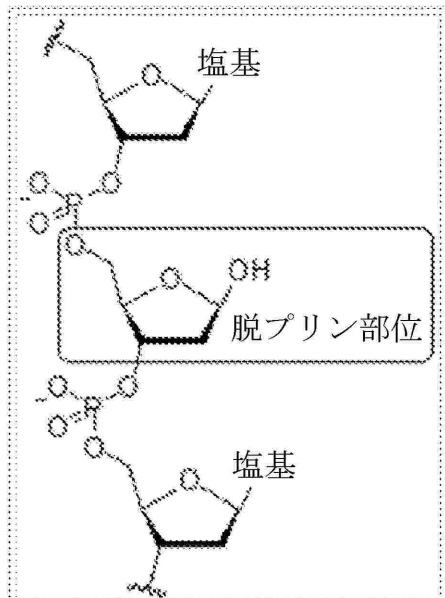
10

【0129】

脱塩基ヌクレオチドは、窒素系塩基を欠いているものを指す。以下の図は、塩基を欠く脱塩基（脱プリンとしても知られる）部位を有するオリゴヌクレオチドを描写する。

20

【化 5】



30

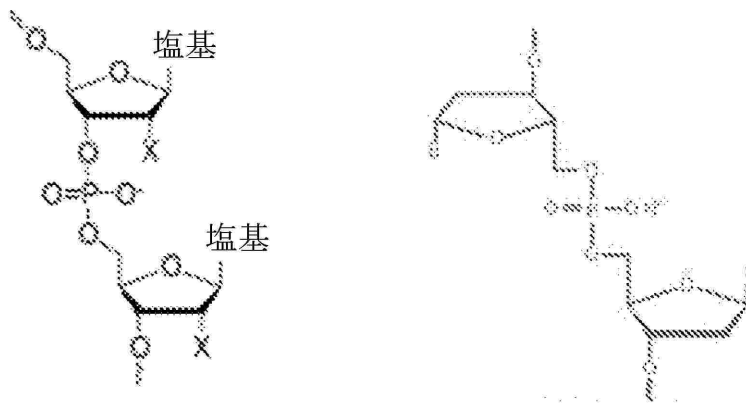
40

【0130】

反転した塩基は、通常の5'から3'への連結から反転した連結を有するものを指す（すなわち、5'から5'への連結または3'から3'への連結のいずれか）。例えば、

50

【化 6】



天然オリゴヌクレオチド連結

反転オリゴヌクレオチド連結

10

【0131】

脱塩基ヌクレオチドは、反転した連結と結合することができる。例えば、脱塩基ヌクレオチドは、5' から 5' 連結を介して末端 5' ヌクレオチドに結合してもよいし、または脱塩基ヌクレオチドは、3' から 3' 連結を介して末端 3' ヌクレオチドに結合してもよい。末端 5' または 3' ヌクレオチドのいずれかにおける反転した脱塩基ヌクレオチドはまた、反転した脱塩基末端キャップと称され得る。

20

【0132】

いくつかの実施形態では、5' 末端部における最初の 3、4、または 5 個のヌクレオチドのうちの 1 つ以上、及び 3' 末端部における最後の 3、4、または 5 個のヌクレオチドのうちの 1 つ以上が修飾されている。いくつかの実施形態では、修飾は、2'-O-Me、2'-F、反転した脱塩基ヌクレオチド、PS 結合、または安定性もしくは性能を増加させることが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。

【0133】

いくつかの実施形態では、5' 末端部における最初の 4 個のヌクレオチド、及び 3' 末端部における最後の 4 個のヌクレオチドは、ホスホロチオエート (PS) 結合を用いて連結される。

30

【0134】

いくつかの実施形態では、5' 末端部における最初の 3 個のヌクレオチド、及び 3' 末端部における最後の 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' 末端部における最初の 3 個のヌクレオチド、及び 3' 末端部における最後の 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' 末端部における最初の 3 個のヌクレオチド、及び 3' 末端部における最後の 3 個のヌクレオチドは、反転した脱塩基ヌクレオチドを含む。

40

【0135】

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、mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 300) 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 の全体は、TIM3 内の標的配列に対してヌクレアーゼを指向させるガイド配列 (例えば、表 1 に示されるゲノム座標) を含む。

50

【0136】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1～88のガイド配列のうちのいずれか1つを含むsgRNA及びsgRNAの保存された部分、例えば、例示的なSpyCas9 sgRNA-1として示されるsgRNAの保存された部分、または表2及び本明細書全体で示されるgRNAの保存された部分を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1～88のガイド配列及びGUUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU（配列番号202）のヌクレオチドのうちのいずれか1つを含むsgRNAを含み、ここでヌクレオチドは、ガイド配列の3'末端にあり、sgRNAは、本明細書または配列mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*M u（配列番号300）に示されるように修飾され得る。いくつかの実施形態では、sgRNAは、本明細書で提供される例示的なSpyCas9 sgRNA-1及びその修飾バージョン、またはNの全体が、標的配列にヌクレアーゼを指向させるガイド配列を含む、以下の表3に提供されるバージョンを含む。各Nは、独立して、修飾されているか、または非修飾である。特定の実施形態では、修飾の表示がない場合、ヌクレオチドは、非修飾RNAヌクレオチド残基、すなわち、リボース糖及びホスホジエステル骨格である。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 3. 例示的な sgRNA 配列 (修飾及び非修飾バージョン)

ガイド足場 (非修正/修飾)	sgRNA非修飾配列	sgRNA修飾配列
81/181	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCACGAAAGGG CACCGAGUCGGUGC (配列番号401)	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCACGAAAGG GCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (配列番号402)
94/194	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGGCA CCGAGUCGGUGC (配列番号403)	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC (配列番号404)
95/195	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGGCA CCGAGUCGGUGC (配列番号405)	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC (配列番号406)
871/971	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCACGAAAGGG CACCGAGUCGGUGC (配列番号407)	mN*mN*mN*(N)17mGUUUfUA GmAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCmAmAGUfUmAfA mAfAmUAmAmGmGmCmUmAG UmCmCGUfUAmUmCmCmGm AmAmAmGmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmG*mU*mG *mC (配列番号408)
872/972	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCACGAAAGGG CACCGAGUCGGUGC (配列番号409)	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGA mGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCACGAAAGG GCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (配列番号410)

10

20

30

40

【0137】

上述のように、いくつかの実施形態では、本明細書において開示される組成物または製剤は、RNAガイドDNA結合剤、例えば、本明細書に記載のCasヌクレアーゼ、例えば、Cas9ヌクレアーゼ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では、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9ヌクレアーゼをコードするORFを含むmRNAが提供されるか、使用されるか、または投与される。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNAヌクレアーゼをコードするORFは、「修飾RNAガイドDNA結合剤ORF」または単に「修飾ORF」であり、ORFが修飾されていることを示すための略語として使用

50

される。

【0138】

いくつかの実施形態では、mRNAまたは修飾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、例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで、5位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、例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで、1位で修飾されたプソイドウリジンである。修飾ウリジンは、例えば、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、またはそれらの組み合わせであり得る。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-メトキシウリジンの組み合わせである。

10

20

【0139】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるmRNAは、5'キャップ、例えば、Cap0、Cap1、またはCap2を含む。5'キャップは、一般に、mRNAの5'-3'鎖の第1のヌクレオチド（すなわち、第1のキャップ近位のヌクレオチド）の5'位に対して5'-トリホスフェートを介して連結した7-メチルグアニンリボヌクレオチド（例えば、ARCAに関して、以下に考察されるようにさらに修飾されてもよい）である。Cap0において、mRNAの第1及び第2のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、2'-ヒドロキシルを含む。Cap1において、mRNAの第1及び第2の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ、2'-メトキシ及び2'-ヒドロキシを含む。Cap2において、mRNAの第1及び第2のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、2'-メトキシを含む。例えば、Katibah et al. (2014) Proc Natl Acad Sci USA 111(33):12025-30、Abbas et al. (2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(11):E2106-E2115を参照のこと。ヒトmRNAなどの哺乳動物mRNAを含む、ほとんどの内因性の高級真核生物mRNAは、Cap1またはCap2を含む。Cap0、及びCap1及びCap2とは異なる他のキャップ構造は、IFIT-1及びIFIT-5などの自然免疫系の構成要素によって「非自己」として認識されるため、ヒトなどの哺乳動物において免疫原性である場合があり、I型インターフェロンを含むサイトカインレベルの上昇を引き起こし得る。IFIT-1及びIFIT-5などの自然免疫系の構成要素はまた、Cap1またはCap2以外のキャップとのmRNAの結合についてeIF4Eと競合する場合があり、mRNAの翻訳を潜在的に阻害する。

30

40

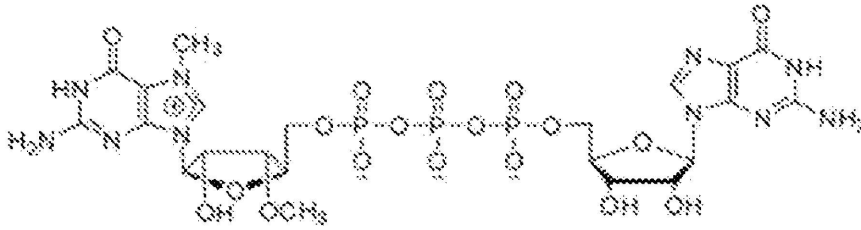
【0140】

キャップは、共転写的に含めることができる。例えば、ARCA（抗逆キャップ類似体、Thermo Fisher Scientificカタログ番号AM8045）は、グアニンリボヌクレオチドの5'位に連結する7-メチルグアニン3'-メトキシ-5'-トリホスフェートを含むキャップ類似体であり、開始時にインビトロで転写産物に組み込むことができる。ARCAは、第1のキャップ近位のヌクレオチドの2'位がヒドロキシルであるCap0キャップをもたらす。例えば、Stepinski et al., (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap anal

50

ogs 7-methyl (3'-O-methyl) GpppG and 7-methyl (3'-deoxy) GpppG, "RNA 7:1486-1495を参照のこと。ARCAの構造を以下に示す。

【化7】



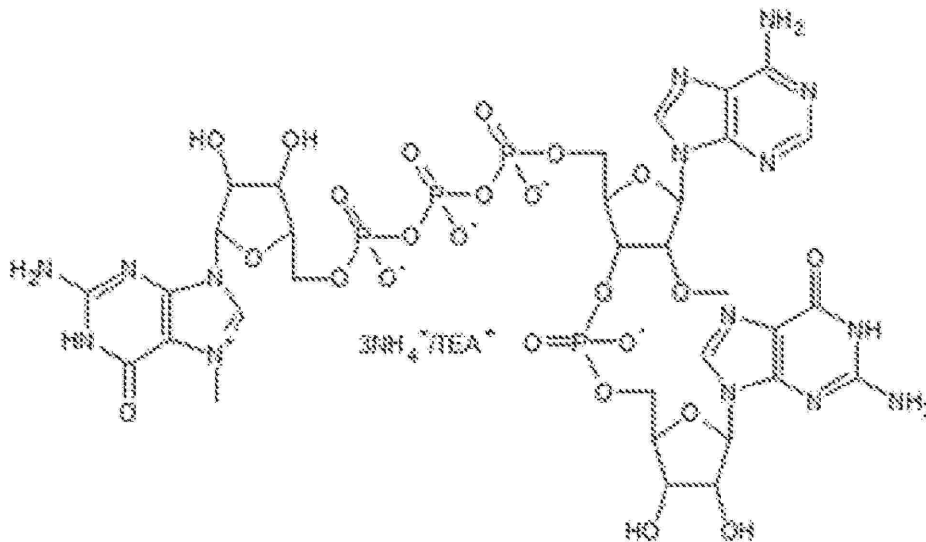
10

【0141】

CleanCap (商標) AG (m7G (5')) ppp (5') (2'OMeA) pG、TriLink Biotechnologiesカタログ番号N-7113) またはCleanCap (商標) GG (m7G (5')) ppp (5') (2'OMeG) pG、TriLink Biotechnologiesカタログ番号N-7133) を使用して、Cap1構造を共転写的に提供することができる。CleanCap (商標) AG及びCleanCap (商標) GGの3'-O-メチル化態様も、それぞれ、カタログ番号N-7413及びN-7433としてTriLink Biotechnologiesから入手可能である。CleanCap (商標) AGの構造を以下に示す。

20

【化8】



30

【0142】

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、Vacciniaキャッピング酵素は市販されており (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及びグアニリルトランスフェラーゼ活性、ならびにその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。したがって、S-アデノシルメチオニン及びGTPの存在下で、Cap0を与えるように、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. and Moss, B. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4023-4027、Mao, X. and Shuman, S. (1994) J. Biol. Chem. 269, 24472-24479を参照のこと。

40

【0143】

50

いくつかの実施形態では、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、ポリ-Aテールは、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、または100個のアデニンを含み、任意選択で、300個までのアデニンを含む。いくつかの実施形態では、ポリ-Aテールは、95、96、97、98、99、または100個のアデニンヌクレオチドを含む。

【0144】

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からの1つ以上のガイド配列を含む1つ以上のgRNA、または表2からの1つ以上のsgRNA、及びRNAガイド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を含む組成物を包含する。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、クリベース活性を有し、これは二本鎖エンドヌクレアーゼ活性とも称され得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、Casヌクレアーゼを含む。Cas9ヌクレアーゼの例としては、*S. pyogenes*、*S. aureus*、及び他の原核生物のII型CRISPR系のもの（例えば、次の段落のリストを参照のこと）、ならびにそれらの修飾（例えば、操作型または変異体）態様が挙げられる。例えば、US20160312198、US20160312199を参照のこと。Casヌクレアーゼの他の例としては、III型CRISPR系のCsmもしくはCmr複合体、またはそのCas10、Csm1、もしくはCmr2サブユニット、及び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型の系に由来していてもよい。様々なCRISPR系及びCasヌクレアーゼの考察については、例えば、Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol. 9:467-477 (2011)、Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol. 13:722-36 (2015)、Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015)を参照のこと。

【0145】

Casヌクレアーゼの由来となり得る非限定的な例示的な種としては、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus thermophilus*、*Streptococcus sp.*、*Staphylococcus aureus*、*Listeria innocua*、*Lactobacillus gasserii*、*Francisella novicida*、*Wolinella succinogenes*、*Sutterella wadsworthensis*、*Gammaproteobacterium*、*Neisseria meningitidis*、*Campylobacter jejuni*、*Pasteurella multocida*、*Fibrobacter succinogenes*、*Rhodospirillum rubrum*、*Nocardiopsis dassonvillei*、*Streptomyces pristinaespiralis*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptosporangium roseum*、*Streptosporangium roseum*、*Alicyclobacillus acidocaldarius*、*Bacillus pseudomycooides*、*Bacillus selenitireducens*、*Exiguobacterium sibiricum*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Lactobacillus salivarius*、*Lactobacillus buchneri*、*Treponema denticola*、*Microscilla marina*、*Burkholderiales bacterium*、*Polaromonas naphthalenivorans*、*Polaromonas sp.*、*Crocospaera watsonii*、*Cyanothece sp.*、*Microcystis aeruginosa*、*Synechococcus sp.*、*Acetohalobium a*

rabaticum、Ammonifex degensii、Caldicelulosiruptor beccarii、Candidatus Desulforudis、Clostridium botulinum、Clostridium difficile、Finnegoldia magna、Natranaerobius thermophilus、Pelotomaculum thermopropionicum、Acidithiobacillus caldus、Acidithiobacillus ferrooxidans、Allochromatium vinosum、Marinobacter sp.、Nitrosococcus halophilus、Nitrosococcus watsoni、Pseudoalteromonas haloplanktis、Ktedonobacter racemifer、Methanohalobium evestigatum、Anabaena variabilis、Nodularia spumigena、Nostoc sp.、Arthrospira maxima、Arthrospira platensis、Arthrospira sp.、Lyngbya sp.、Microcoleus chthonoplastes、Oscillatoria sp.、Petroglossa mobilis、Thermosiphon africanus、Streptococcus pasteurianus、Neisseria cinerea、Campylobacter lari、Parvibaculum lavamentivorans、Corynebacterium diphtheriae、Acidaminococcus sp.、Lachnospiraceae bacterium ND 2006、及びAcaryochloris marinaが挙げられる。

10

20

【0146】

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、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、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、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、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、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、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、Lachnospiraceae bacterium ND2006由来のCpf1ヌクレアーゼである。さらなる実施形態において、Casヌクレアーゼは、Francisella tularensis、Lachnospiraceae bacterium、Butyrivibrio proteoclasticus、Peregrinibacterium bacterium、Parcubacteria bacterium、Smithella、Acidaminococcus、Candidatus Methanoplasma termitum、Eubacterium eligens、Moraxella bovoculi、Leptospira inadai、Porphyromonas crevioricanis、Prevotella disiens、またはPorphyromonas macacae由来のCpf1ヌクレアーゼである。特定の実施形態では、Casヌクレアーゼは、AcidaminococcusまたはLachnospiraceae由来のCpf1ヌクレアーゼである。

30

40

【0147】

いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤とともに含むgRNA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、Casヌクレアーゼとともに含むgRNA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型の構成要素を含む。いくつかの実施形態では、Casヌ

50

クレアーゼは、I I 型 C R I S P R / C a s 系由来の C a s 9 タンパク質である。いくつかの実施形態では、C a s 9 とともに含む g R N A は、C a s 9 R N P と呼ばれる。

【0148】

野生型 C a s 9 は、2つのヌクレアーゼドメイン、R u v C 及び H N H を有する。R u v C ドメインは、非標的 D N A 鎖を切断し、H N H ドメインは、D N A の標的鎖を切断する。いくつかの実施形態では、C a s 9 タンパク質は、2つ以上の R u v C ドメインまたは2つ以上の H N H ドメインを含む。いくつかの実施形態では、C a s 9 タンパク質は、野生型 C a s 9 である。組成物、使用及び方法の実施形態の各々において、C a s は、標的 D N A における二本鎖切断を誘導する。

【0149】

いくつかの実施形態において、キメラ C a s ヌクレアーゼが使用され、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よって置き換えられている。いくつかの実施形態では、C a s ヌクレアーゼドメインは、F o k 1 などの異なるヌクレアーゼ由来のドメインで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、修飾ヌクレアーゼであってもよい。

【0150】

他の実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、I 型 C R I S P R / C a s 系由来であり得る。いくつかの実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、I 型 C R I S P R / C a s 系のカスケード複合体の構成要素であり得る。いくつかの実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、C a s 3 タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、I I I 型 C R I S P R / C a s 系由来であり得る。いくつかの実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、R N A 切断活性を有し得る。

【0151】

いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、一本鎖ニッカーゼ活性を有し、すなわち、1つの D N A 鎖を切断して一本鎖切断（「ニック」としても知られる）を生成することができる。いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、C a s ニッカーゼを含む。ニッカーゼは、d s D N A 内でニックを作製する酵素であり、すなわち、D N A 二重らせんの一方の鎖を切断するが、他方の鎖を切断しない。いくつかの実施形態では、C a s ニッカーゼは、例えば、触媒ドメイン内の1つ以上の改変（例えば、点変異）によって、エンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化された C a s ヌクレアーゼ（例えば、上で考察される C a s ヌクレアーゼ）の一態様である。例えば、C a s ニッカーゼ及び例示的な触媒ドメイン改変の考察については、米国特許第 8, 889, 356 号を参照のこと。いくつかの実施形態では、C a s 9 ニッカーゼなどの C a s ニッカーゼは、不活性化された R u v C または H N H ドメインを有する。

【0152】

いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、1つの機能的ヌクレアーゼドメインのみを含有するように修飾される。例えば、薬剤タンパク質は、その核酸切断活性を低減させるために、ヌクレアーゼドメインの1つが変異されるか、または完全もしくは部分的に欠失するように修飾されてもよい。いくつかの実施形態では、活性が低減した R u v C 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、不活性な R u v C 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、活性が低減した H N H 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、不活性な H N H ドメインを有するニッカーゼが使用される。

【0153】

いくつかの実施形態では、C a s タンパク質ヌクレアーゼドメイン内の保存アミノ酸は、ヌクレアーゼ活性を低減または改変させるように置換される。いくつかの実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、R u v C または R u v C 様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。R u v C または R u v C 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、D 1 0 A (S . p y o g e n e s C a s 9 タンパク質に基づく) が挙げられる。例えば、Z e t s c h e e t a l . (2 0 1 5) C e l l O c t 2

10

20

30

40

50

2 : 1 6 3 (3) : 7 5 9 - 7 7 1 を参照のこと。いくつかの実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、H N H または H N H 様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。H N H または H N H 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、E 7 6 2 A、H 8 4 0 A、N 8 6 3 A、H 9 8 3 A、及び D 9 8 6 A (S . p y o g e n e s C a s 9 タンパク質に基づく) が挙げられる。例えば、Z e t s c h e e t a l . (2 0 1 5) を参照のこと。さらなる例示的なアミノ酸置換としては、D 9 1 7 A、E 1 0 0 6 A、及び D 1 2 5 5 A (F r a n c i s e l l a n o v i c i d a U 1 1 2 C p f 1 (F n C p f 1) 配列 (U n i P r o t K B - A 0 Q 7 Q 2 (C P F 1 _ F R A T N) に基づく) が挙げられる。

【0154】

いくつかの実施形態では、ニッカーゼをコードする m R N A は、それぞれ、標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖に対して相補的な一対のガイド R N A と組み合わせて提供される。この実施形態では、ガイド R N A は、標的配列の反対側の鎖にニックを生成することによって (すなわち、ダブルニックング)、ニッカーゼを標的配列に指向させ、D S B 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は、特異性を改善し、オフターゲット効果を低減し得る。いくつかの実施形態では、ニッカーゼは、D N A の反対側の鎖を標的とする2つの別個のガイド R N A とともに使用され、標的 D N A 内にダブルニックを産生する。いくつかの実施形態では、ニッカーゼは、ごく接近した位置にあるように選択された2つの別個のガイド R N A とともに使用され、標的 D N A 内にダブルニックを産生する。

【0155】

いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、クリベース及びニッカーゼ活性を欠いている。いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、d C a s D N A 結合ポリペプチドを含む。d C a s ポリペプチドは、触媒 (クリベース / ニッカーゼ) 活性を本質的に欠く一方で、D N A 結合活性を有する。いくつかの実施形態において、d C a s ポリペプチドは、d C a s 9 ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、クリベース活性及びニッカーゼ活性を欠く R N A ガイド D N A 結合剤、または d C a s D N A 結合ポリペプチドは、例えば、その触媒ドメイン内の1つ以上の改変 (例えば、点変異) によって、そのエンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化された C a s ヌクレアーゼ (例えば、上述の C a s ヌクレアーゼ) の一態様である。例えば、U S 2 0 1 4 0 1 8 6 9 5 8、U S 2 0 1 5 0 1 6 6 9 8 0 を参照のこと。

【0156】

いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、1つ以上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か、または融合ポリペプチドを含む) 。

【0157】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、R N A ガイド D N A 結合剤の細胞核への輸送を促進し得る。例えば、異種機能ドメインは、核局在化シグナル (N L S) であり得る。いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、1 ~ 1 0 個の N L S と融合され得る。いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、1 ~ 5 個の N L S と融合され得る。いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、1 個の N L S と融合され得る。1 個の N L S が使用される場合、N L S は、R N A ガイド D N A 結合剤の配列の N 末端部または C 末端部で連結され得る。これを R N A ガイド D N A 結合剤の配列内に挿入することもできる。他の実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、2 個以上の N L S と融合され得る。いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、2、3、4、または5個の N L S と融合され得る。いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、2 個の N L S と融合され得る。特定の状況では、2 個の N L S は、同じ (例えば、2 個の S V 4 0 N L S) であってもよく、または異なってもよい。いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、カルボキシ末端部で連結された2個の S V 4 0 N L S の配列に融合される。いくつかの実施形態では、R N A ガイド D N A 結合剤は、2 個の N L S と融合していてもよく、1 つは N 末端部に連結しており、1 つは

10

20

30

40

50

C末端部に連結している。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、3個のNLSと融合され得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、NLSなしで融合され得る。いくつかの実施形態では、NLSは、単節型配列、例えば、SV40 NLS、PKKKRKV（配列番号115）またはPKKKRRV（配列番号116）であってもよい。いくつかの実施形態では、NLSは、双節型配列、例えば、ヌクレオプラスミンのNLSであるKRPAATKKAGQAKKKK（配列番号117）であってもよい。特定の実施形態では、単一のPKKKRKV（配列番号115）NLSは、RNAガイドDNA結合剤のC末端部で連結され得る。1つ以上のリンカーは、任意選択で、融合部位に含まれる。

【0158】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の細胞内半減期を修正することが可能であり得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤の半減期が増加し得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤の半減期が低減し得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の安定性を増加させることができる。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の安定性を低減させることができる。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機能し得る。いくつかの実施形態では、タンパク質分解は、例えば、プロテアソーム、リソソームプロテアーゼ、またはカルパインプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素によって媒介され得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、PEST配列を含み得る。いくつかの実施形態では、RNAガイド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って修飾され得る。いくつかの実施形態では、ユビキチンは、ユビキチン様タンパク質（UBL）であってもよい。ユビキチン様タンパク質の非限定的な例としては、小さなユビキチン様修飾因子（SUMO）、ユビキチン交差反応性タンパク質（UCRP、インターフェロン刺激遺伝子-15（ISG15）としても知られる）、ユビキチン関連修飾因子-1（URM1）、神経前駆細胞が発現する発達的に下方制御されたタンパク質-8（NEDD8、S. cerevisiaeにおいてRub1とも呼ばれる）、ヒト白血球抗原F関連（FAT10）、オートファジー-8（ATG8）及び-12（ATG12）、Fauユビキチン様タンパク質（FUB1）、膜固定UBL（MUB）、ユビキチン折りたたみ修飾因子-1（UFM1）、及びユビキチン様タンパク質-5（UBL5）が挙げられる。

【0159】

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的な例としては、蛍光タンパク質、精製タグ、エピトープタグ、及びレポーター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的な例としては、緑色蛍光タンパク質（例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、sfGFP、EGFP、Emerald、Azami Green、Monomeric Azami Green、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1）、黄色蛍光タンパク質（例えば、YFP、EYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1）、青色蛍光タンパク質（例えば、EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、T-sapphire）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ECFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan）、赤色蛍光タンパク質（例えば、mKate、mKate2、mPlum、DsRed単量体、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred）、及び橙色蛍光タンパク質（mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato）、または任意の他の適切な蛍光タン

10

20

30

40

50

パク質が挙げられる。他の実施形態では、マーカードメインは、精製タグまたはエピトープタグであってもよい。非限定的な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 (GST)、キチン結合タンパク質 (CBP)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシン (TRX)、ポリ (NANP)、タンデムアフィニティ精製 (TAP) タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、HA、nus、Softag 1、Softag 3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、6xHis、8xHis、ビオチンカルボキシル担体タンパク質 (BCCP)、ポリ-His、及びカルモジュリンが挙げられる。非限定的な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 (GST)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、クロラムフェニコール

10

【0160】

追加の実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤を特異的なオルガネラ、細胞型、組織、または臓器に標的化し得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤をミトコンドリアに標的化し得る。

【0161】

さらなる実施形態では、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DNA結合剤がその標的配列に指向されるとき、例えば、Casヌクレアーゼが、gRNAによって標的配列に指向されるとき、エフェクタードメインは、標的配列を修飾するか、または影響を及ぼし得る。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、または転写抑制ドメインから選択され得る。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、例えばFokIヌクレアーゼである。例えば、米国特許第9,023,649号を参照のこと。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 et al., "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression," Cell 152: 1173-83 (2013)、Perez-Pinera et al., "RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors," Nat. Methods 10: 973-6 (2013)、Mali et al., "CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering," Nat. Biotechnol. 31: 833-8 (2013)、Gilbert et al., "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes," Cell 154: 442-51 (2013)を参照のこと。したがって、RNAガイドDNA結合剤は、本質的に、ガイドRNAを使用して所望の標的配列に結合するように指向され得る転写因子になる。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、デアミナーゼ、例えばシチジンデアミナーゼまたはアデニンデアミナーゼである。特定の実施形態では、異種機能ドメインは、アポリボタンパク質B mRNA編集酵素 (APOBEC) デアミナーゼなどのC-T塩基変換子 (シチジンデアミナーゼ) である。

20

30

40

【0162】

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、送達されたとき、またはRNPを形成する他の構成要素とともに発現されたときに決定される。いくつかの実施形態では、gRNAは、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casタンパク質、例えば、Cas9とと

50

もに発現される。いくつかの実施形態では、gRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、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を既に安定に発現する細胞株に送達されるか、またはその細胞株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、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、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をコードするmRNAとともに細胞に送達される。

【0163】

本明細書に記載される場合、本明細書に開示されるRNAガイドDNAヌクレアーゼ及びガイドRNAの使用は、DNAにおいて二本鎖切断を生じる場合があり、細胞機構による修復時に挿入／欠失（インデル）変異の形態でエラーを生じ得る。インデルに起因する多くの変異は、リーディングフレームを改変するか、または未成熟終止コドンを導入し、したがって、非機能性タンパク質を産生する。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決定される。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、Cas9を安定して発現する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、末梢血単核細胞（「PBMC」）である。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、一次ヒトT細胞などのT細胞である。一次細胞を使用することに関して、市販の一次ヒト肝細胞を使用して、実験間のより高い一貫性を提供することができる。いくつかの実施形態では、インビトロモデルにおいて（例えば、T細胞において）欠失または挿入が起こるオフターゲット部位の数は、例えば、インビトロでCas9 mRNA及びガイドRNAでトランスフェクトされた細胞からゲノムDNAを分析することによって決定される。いくつかの実施形態では、そのような決定は、インビトロでCas9 mRNA、ガイドRNA、及びドナーオリゴヌクレオチドでトランスフェクトされた細胞由来のゲノムDNAを分析することを含む。そのような決定のための例示的な手順を、HEK293細胞、PBMC、及びヒトCD3⁺T細胞を使用する作業実施例に提供する。

【0164】

いくつかの実施形態では、特定のgRNAの有効性は、gRNA選択プロセスのための複数のインビトロ細胞モデルにわたって決定される。いくつかの実施形態では、選択されたgRNAと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、複数の細胞モデルで交差スクリーニングを実施する。

【0165】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAの有効性は、TIM3のインデルパーセントまたは遺伝子修飾パーセント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、TIM3遺伝子座におけるインデルパーセントまたは遺伝子修飾パーセント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、表1または表2のゲノム座標におけるTIM3のインデルパーセントまたは遺伝子修飾パーセントによって測定される。いくつかの実施形態では、TIM3の編集パーセントを、TIM3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または遺伝子修飾のパーセントと比較する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAの有効性は、TIM3タンパク質の発現の低減または排除によって測定される。実施形態では、当該TIM3タンパク質の発現の低減または排除は、例えば、本明細書に記載されるようなフローサイトメトリーによって測定されるようなものである。

【0166】

いくつかの実施形態では、TIM3タンパク質発現は、本明細書に開示される方法及び組成物を使用して、細胞集団において低減または排除される。いくつかの実施形態では、細胞集団は、非修飾細胞集団に対してフローサイトメトリーによって測定される場合、少なくとも65%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のTIM3陰性である。

【0167】

10

20

30

40

50

「非修飾細胞」（または「非修飾細胞（複数）」）は、実験または試験における同じタイプの細胞の対照細胞（または細胞（複数））を指し、「非修飾」対照細胞は、TIM3ガイドと接触していない。したがって、非修飾細胞（または細胞（複数））は、ガイドRNAと接触していない細胞、またはTIM3を標的としないガイドRNAと接触している細胞であり得る。

【0168】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAの有効性は、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または遺伝子修飾の数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、または標的部位におけるインデル生成の頻度に対して、非常に低い頻度（例えば、5%未満）で、オフターゲット部位でインデルを生成する有効なガイドRNAが提供される。したがって、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インデル形成を示さないか、または細胞集団において、または標的部位でのインデル生成の頻度に対して、オフターゲットインデル形成の頻度が5%未満であるガイドRNAを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、標的細胞型（例えば、T細胞）において任意のオフターゲットインデル形成を示さないガイドRNAを提供する。いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載される1つ以上の方法によって評価される場合、5個未満のオフターゲット部位においてインデルを生成するガイドRNAが提供される。いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載される1つ以上の方法によって評価される場合、4、3、2、または1個未満または以下のオフターゲット部位（複数可）においてインデルを生成するガイド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（複数可）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内では発生しない。

10

20

【0169】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集事象を検出すること、例えば、挿入／欠失（「インデル」）変異の形成、及び標的DNAにおける挿入または相同性誘導修復（HDR）事象は、タグ化プライマーを用いた線形増幅及びタグ化増幅産物の単離を利用する（本明細書ではこれ以降、「LAM-PCR」または「線形増幅（LA）」法と称される）。いくつかの実施形態では、ガイドRNAの有効性は、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、編集された細胞の生体集団がTCRの喪失について分析される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。

30

【0170】

E. T細胞受容体（TCR）

いくつかの実施形態では、例えば、TIM3をコードする内因性核酸配列の遺伝子修飾を含む操作された細胞または細胞集団は、TCR遺伝子配列（複数可）をコードする内因性核酸配列（例えば、TRACまたはTRBC）の修飾、例えば、ノックダウンをさらに含む。

【0171】

いくつかの実施形態では、TIM3をコードする内因性核酸配列の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）、及び標的化受容体をコードする異種配列（複数可）の細胞への挿入を含む、操作された細胞または細胞集団は、TCR遺伝子配列（複数可）をコードする内因性核酸配列（例えば、TRACまたはTRBC）の修飾（例えば、ノックダウン）をさらに含む。

40

【0172】

一般に、TCRは、2つのTCRポリペプチド鎖、 α 及び β を含有するヘテロ二量体受容体分子である。ノックダウンを標的とするための好適な α 及び β ゲノム配列または遺伝子座は、当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞は、TCR α 鎖遺伝子配列、例えば、TRACの修飾、例えば、ノックダウンを含む。例えば、NCBI Gene ID: 28755; Ensembl: ENSG00000277734（T細胞受容体アルファ定数）、US2018/0362975及びWO2

50

020081613を参照のこと。

【0173】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、TIM3をコードする内因性核酸配列の遺伝子修飾、TCR遺伝子配列（複数可）をコードする内因性核酸配列（例えば、TRACまたはTRBC）の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）、及びMHCクラスI遺伝子（例えば、B2MまたはHLA-A）の修飾（例えば、ノックダウン）を含む。いくつかの実施形態において、MHCクラスI遺伝子は、HLA-B遺伝子またはHLA-C遺伝子である。

【0174】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、TIM3をコードする内因性核酸配列の遺伝子修飾、及びTCR遺伝子配列（複数可）をコードする内因性核酸配列（例えば、TRACまたはTRBC）の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）、及びMHCクラスII遺伝子（例えば、CIITA）の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）を含む。

【0175】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、TIM3をコードする内因性核酸配列の修飾、TCR遺伝子配列（複数可）をコードする内因性核酸配列（例えば、TRACまたはTRBC）の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）、及びチェックポイント阻害剤遺伝子（例えば、LAG3、2B4、またはPD-1）の遺伝子修飾（例えば、ノックダウン）を含む。

【0176】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、シーケンシング、例えば、NGSによって評価されるTIM3遺伝子の遺伝子修飾を含み、細胞の少なくとも50%、55%、60%、65%、好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%が、内因性TIM3配列における挿入、欠失、または置換を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも50%は、内因性TIM3配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも55%は、内因性TIM3配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも60%は、内因性TIM3配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも65%は、内因性TIM3配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも70%は、内因性TIM3配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも75%は、内因性TIM3配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも85%は、内因性TIM3配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも70%は、内因性TIM3配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも90%は、内因性TIM3配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、集団内の細胞の少なくとも95%は、内因性TIM3配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む。いくつかの実施形態では、TIM3は、例えば、TIM3遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも50%、55%、60%、65%、好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、TIM3の発現は、例えば、TIM3遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも50%、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、TIM3の発現は、

10

20

30

40

50

例えば、TIM3 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも60%、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、TIM3 の発現は、例えば、TIM3 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも65%、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、TIM3 の発現は、例えば、TIM3 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも70%、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、TIM3 の発現は、例えば、TIM3 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも80%、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、TIM3 の発現は、例えば、TIM3 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも90%、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。いくつかの実施形態では、TIM3 の発現は、例えば、TIM3 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも95%、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。TIM3 タンパク質及びmRNA 発現のアッセイは、当該技術分野において既知である。

10

【0177】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、例えば、シーケンシング、例えば、NGS によって評価される、遺伝子編集によるTCR 遺伝子配列の修飾（例えば、ノックダウン）を含み、細胞の少なくとも50%、55%、60%、65%、好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%が、内因性TCR 遺伝子配列における挿入、欠失、または置換を含む。いくつかの実施形態では、TCR は、例えば、TCR 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも50%、55%、60%、65%、好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはアッセイの検出限界未満まで減少する。特定の実施形態では、TCR は、TRAC またはTRBC である。TCR タンパク質及びmRNA 発現のアッセイは、当該技術分野において既知である。

20

【0178】

いくつかの実施形態では、操作された細胞または細胞集団は、遺伝子編集によって、例えば、シーケンシング（例えば、NGS）によって評価される、遺伝子編集によって標的化受容体をコードする配列（複数可）の挿入を含む。

【0179】

いくつかの実施形態では、TCR 遺伝子内の部位、例えば、TRAC 遺伝子の特異的に標的とするガイドRNA を使用して、TCR 遺伝子の修飾（例えば、ノックダウン）を提供する。

30

【0180】

いくつかの実施形態では、TCR 遺伝子は、T 細胞において、RNA ガイドDNA 結合剤とともにガイドRNA を使用して修飾（例えば、ノックダウン）される。いくつかの実施形態では、例えば、RNA ガイドDNA 結合剤（例えば、CRISPR/Cas 系）とともにガイドRNA を使用して、T 細胞のTCR 遺伝子内で切断（例えば、二本鎖切断（DSB）または一本鎖切断（ニック））を誘導することによって操作されたT 細胞が本明細書に開示される。方法は、インビトロまたはエクスピボで、例えば、免疫応答を抑制するための細胞産物の製造において使用され得る。

40

【0181】

いくつかの実施形態では、ガイドRNA は、TCR 遺伝子内の本明細書に記載の部位において、RNA ガイドDNA 結合剤（例えば、Cas ヌクレアーゼ）による標的的特異的切断を媒介する。いくつかの実施形態では、ガイドRNA は、当該領域に結合する、または結合することができるガイド配列を含むことが理解されるであろう。

【0182】

III. 治療方法及び使用、ならびに操作された細胞または免疫療法試薬を調製する方法を含む方法及び使用

本明細書に開示されるgRNA ならびに関連する方法及び組成物は、操作された細胞な

50

どの免疫療法試薬を作製するのに有用である。

【0183】

いくつかの実施形態では、表1のガイド配列を、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼとともに含むgRNAは、DSBを誘導し、修復中の非同相性末端結合（NHEJ）が、TIM3遺伝子内の修飾をもたらす。いくつかの実施形態では、NHEJは、ヌクレオチド（複数可）の欠失または挿入を引き起こし、TIM3遺伝子におけるフレームシフトまたはナンセンス変異を誘導する。特定の実施形態では、TCR配列、例えば、TRAC及びTRBCを標的とするガイド配列を含むgRNAもまた、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼとともに、または別個に、細胞に送達され、TCR配列内で遺伝子修飾を行い、全長TCR配列の発現を阻害する。特定の実施形態では、gRNAは、sgRNAである。

10

【0184】

いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物である。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、非ヒト霊長類である。

【0185】

いくつかの実施形態では、ガイドRNA、組成物、及び製剤は、エキスピボで細胞、例えば、免疫細胞、例えば、TIM3遺伝子における遺伝子修飾を有するT細胞を産生するために使用される。修飾T細胞は、ナチュラルキラー（NK）T細胞であってもよい。修飾T細胞は、ユニバーサルTCRまたは修飾TCRなどのT細胞受容体を発現し得る。T細胞は、ゼータ鎖シグナル伝達モチーフを有するCARまたはCAR構築物を発現し得る。

20

【0186】

gRNA組成物の送達

脂質ナノ粒子（LNP）は、ヌクレオチド及びタンパク質カーゴの送達のための周知の手段であり、エキスピボ及びインビトロでの本明細書に開示されるガイドRNA及び組成物の送達に使用されてもよい。いくつかの実施形態では、LNPは、核酸、タンパク質、または核酸をタンパク質とともに送達する。

【0187】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示される細胞または細胞集団のうちのいずれか1つを対象に送達するための方法を含み、gRNAは、LNPを介して送達される。いくつかの実施形態では、gRNA／LNPはまた、Cas9またはCas9をコードするmRNAと会合する。

30

【0188】

いくつかの実施形態では、本発明は、開示されるgRNA及びLNPのうちのいずれか1つを含む組成物を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、Cas9またはCas9をコードするmRNAをさらに含む。

【0189】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるgRNAと会合するLNPは、疾患または障害を治療するための医薬として細胞を調製する際に使用するためのものである。

【0190】

エレクトロポレーションは、カーゴの送達のための周知の手段であり、本明細書に開示されるgRNAのうちのいずれか1つの送達のために、任意のエレクトロポレーション方法論が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、本明細書に開示されるgRNA及びCas9またはCas9をコードするmRNAのうちのいずれか1つを送達するために使用され得る。

40

【0191】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示されるgRNAのうちのいずれか1つをエキスピボで細胞に送達する方法を含み、gRNAは、LNPと会合するか、またはLNPと会合しない。いくつかの実施形態では、gRNA／LNPまたはgRNAはまた、Cas9またはCas9をコードするmRNAと会合する。

50

【0192】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるガイドRNA組成物は、単独で、または1つ以上のベクターにコードされて、脂質ナノ粒子に製剤化されるか、または脂質ナノ粒子を介して投与される。例えば、各々の内容が参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる、WO2017/173054及びWO2021/222287を参照のこと。

【0193】

特定の実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上を含むガイドRNAのいずれかをコードするDNA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、ベクターは、ガイドRNAをコードしない核酸をさらに含む。ガイドRNAをコードしない核酸としては、限定されないが、プロモーター、エンハンサー、制御配列、及びRNAガイドDNAヌクレアーゼ（Cas9などのヌクレアーゼであってもよい）をコードする核酸が挙げられる。いくつかの実施形態では、ベクターは、crRNA、trRNA、またはcrRNA及びtrRNAをコードする1つ以上のヌクレオチド配列（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、sgRNAをコードする1つ以上のヌクレオチド配列と、RNAガイドDNAヌクレアーゼをコードするmRNAと、を含み、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9またはCpf1であってもよい。いくつかの実施形態では、ベクターは、crRNA、trRNAをコードする1つ以上のヌクレオチド配列と、RNAガイドDNAヌクレアーゼをコードするmRNAと、を含み、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Casタンパク質、例えば、Cas9であってもよい。一実施形態では、Cas9は、Streptococcus pyogenes由来である（すなわち、Spy Cas9）。いくつかの実施形態では、crRNA、trRNA、またはcrRNA及びtrRNA（sgRNAであってもよい）をコードするヌクレオチド配列は、天然に存在するCRISPR/Cas系由来の反復配列の全てまたは一部が隣接するガイド配列を含むか、またはそれらからなる。crRNA、trRNA、またはcrRNA及びtrRNAを含むか、またはそれらからなる核酸は、さらにベクター配列を含んでもよく、ここで、ベクター配列は、自然状態ではcrRNA、trRNA、またはcrRNA及びtrRNAとともに見出されない核酸配列を含むか、またはそれらからなる。

【0194】

いくつかの実施形態では、構成要素は、裸の核酸として、リボソームまたはポロキサマーなどの薬剤と複合体化された核酸として導入され得るか、またはそれらは、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）によって送達され得る。核酸の非ウイルス送達のための方法及び組成物は、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、生物学的性質、ビロソーム、リボソーム、免疫リボソーム、LNP、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、裸の核酸（例えば、裸のDNA/RNA）、人工ビリオン、及びDNAの薬剤強化された取り込みを含む。例えば、Sonitron 2000システム（Rich-Mar）を使用するソノポレーション（Sonoporation）を、核酸の送達のために使用することもできる。

【0195】

この説明及び例示的な実施形態は、限定として解釈されるべきではない。本明細書及び添付の特許請求の範囲において、別途指示されない限り、本明細書及び特許請求の範囲で使用される量、パーセンテージ、または割合、及び他の数値を表す全ての数字は、どの場合においても「約」という用語によって、まだそれほど修飾されていない程度で修飾されていると理解されるべきである。したがって、そうでないことが示されない限り、以下の明細書及び添付の特許請求の範囲に示される数値パラメータは、得ようとする所望の特性に応じて変化し得る近似値である。非常に少なくとも、及び均等論の適用を特許請求の範囲に限定する試みとしてではなく、各数値パラメータは、報告された有効数字の数を考慮して、通常の丸め手法を適用することにより、少なくとも解釈されるべきである。

【実施例】

【0196】

以下の実施例は、特定の開示された実施形態を例示するために提供され、本開示の範囲を決して限定するものとして解釈されるべきではない。

【0197】

実施例1—材料及び方法

次世代シーケンシング（「NGS」）及びオンターゲット切断効率の分析

ゲノムDNAは、QuickExtract（商標）DNA Extraction Solution（Lucigen、カタログ番号QE09050）を使用して、製造者のプロトコルに従って抽出した。

【0198】

ゲノム中の標的位置における編集効率を定量的に決定するために、ディープシーケンシングを使用して、遺伝子編集によって導入された挿入及び欠失（「インデル」）の存在を同定した。目的の遺伝子（例えば、TIM3）内の標的部位周辺でPCRプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅させた。プライマー配列設計は、現場で標準として行われた。シーケンシングのために必要な化学的性質を付加するために製造者のプロトコル（Illumina）に従って追加のPCRを実施した。アンプリコンをIllumina MiSeq装置でシーケンシングした。低品質スコアを有する読み取りを除去した後に、読み取りをヒト参照ゲノム（例えば、hg38）とアラインメントした。読み取り値を含む得られたファイルを、参照ゲノム（BAMファイル）に対してマッピングし、目的の標的配列と重なり合った読み取り値を選択し、野生型の読み取り値の数と、挿入または欠失（「インデル」）を含む読み取り値の数を計算した。

【0199】

実施例において使用される編集パーセンテージ（例えば、「編集効率」または「インデルパーセント」）は、野生型を含む配列読み取りの総数に対する、挿入または欠失（「インデル」）を含む配列読み取りの総数であると定義される。

【0200】

脂質ナノ粒子の調製。

別途指定されない限り、脂質構成要素を、様々なモル比で、100%エタノールに溶解した。RNAカーゴ（例えば、Cas9 mRNA及びsgRNA）を、25mMのクエン酸塩、100mMのNaCl（pH5.0）に溶解して、およそ0.45mg/mLのRNAカーゴ濃度を得た。

【0201】

別途指定されない限り、脂質核酸アセンブリは、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-ジエノエート）とも呼ばれる、イオン化可能な脂質A（（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-ジエノエート、コレステロール、DSPC、及びPEG2k-DMGを、それぞれ50：38：9：3のモル比で含んでいた。脂質核酸アセンブリは、別途指定されない限り、約6の脂質アミン対RNAホスフェートの（N：P）モル比、及び1：1のgRNA対mRNAの重量比で配合した。

【0202】

クロスフロー技術を使用し、エタノール中の脂質を2体積のRNA溶液及び1体積の水と衝突噴流混合することによって、脂質ナノ粒子（LNP）を調製した。エタノール中の脂質を、交差混合により、2体積部のRNA溶液と混合する。第4の水の流れを、直列のティー（tee）を通る交差の出口流と混合した（WO2016010840の図2を参照）。LNPを室温（RT）で1時間保持し、さらに水で希釈した（およそ1：1 v/v）。LNPを、フラットシートカートリッジ（Sartorius、100kD MWCO）でタンジェンシャルフロー濾過を使用して濃縮し、PD-10脱塩カラム（GE）

を用い、緩衝液を50mMのTris、45mMのNaCl、5% (w/v) のスクロース、pH7.5 (TSS) に交換した。あるいは、LNPを、任意選択で、100kDaのアミコンスピンフィルターを使用して濃縮し、PD-10脱塩カラム (GE) を使用して緩衝液をTSSに交換した。次いで、得られた混合物を0.2µmの滅菌フィルターを使用して濾過した。最終LNPを、さらなる使用まで4℃または-80℃で保存した。

【0203】

mRNAのインビトロ転写 (「IVT」)

N1-メチルシュードーUを含むキャップされたポリアデニル化mRNAを、線状プラスミドDNAテンプレート及びT7 RNAポリメラーゼを使用したインビトロ転写によって生成した。T7プロモーター、転写のための配列、及びポリアデニル化配列を含有するプラスミドDNAを、以下の条件下、XbaIと37℃で2時間インキュベートすることによって線状化した。200ng/µLのプラスミド、2U/µLのXbaI (NEB)、及び1x反応緩衝液の条件で、XbaIとともに37℃で2時間インキュベートすることによって線状化する。XbaIを、反応物を65℃で20分間加熱することによって不活性化した。線状プラスミドを、酵素及び緩衝塩から精製した。修飾mRNAを生成するためのIVT反応を、以下の条件下、37℃で1.5~4時間インキュベートすることによって行った。50ng/µLの線状プラスミド、GTP、ATP、CTP、及びN1-メチルシュードUTP (Trilink) の各々、2~5mM、10~25mMのARCA (Trilink)、5U/µLのT7 RNAポリメラーゼ (NEB)、1U/µLのマウスRNase阻害剤 (NEB)、0.004U/µLの無機E. coliピロホスファターゼ (NEB)、ならびに1x反応緩衝液。TURBO DNase (ThermoFisher) を、最終濃度が0.01U/µLになるように添加し、反応物をさらに30分間インキュベートして、DNAテンプレートを除去した。Megaclear転写クリーンアップキット (ThermoFisher) またはRNeasy Maxikit (Qiagen) を製造者のプロトコルに従って使用し、mRNAを精製した。あるいは、mRNAを沈殿プロトコルにより精製し、いくつかの場合では、これに続いてHPLCベースの精製を行った。簡潔に述べると、DNase消化後、LiCl沈殿、酢酸アンモニウム沈殿、及び酢酸ナトリウム沈殿を使用して、mRNAを精製する。HPLC精製mRNAについて、LiCl沈殿及び再構成後、mRNAをRP-IP HPLCによって精製した (例えば、Kariko, et al. Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 21 e142を参照のこと)。プールのために選択された画分を合わせ、上記の酢酸ナトリウム/エタノール沈殿によって脱塩した。さらなる代替方法において、LiCl沈殿法、続いてタンジェンシャルフロー濾過によるさらなる精製によって、mRNAを精製した。RNA濃度を、260nm (Nanodrop) での光吸光度を測定することによって決定し、転写産物をBioanalyzer (Agilent) によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

【0204】

配列番号801~803に従って、オープンリーディングフレームをコードするプラスミドDNAからStreptococcus pyogenes (「Spy」) Cas9 mRNAを生成した (表14の配列を参照)。配列番号801~803がRNAに関して以下で言及される場合、Tは、U (上記のようなN1-メチルシュードウリジンであった) で置き換えられるべきであることが理解される。実施例で使用されるメッセンジャーRNAは、5'キャップ及び3'ポリAテール、例えば、最大100ntを含み、表14の配列番号801~803によって同定される。

10

20

30

40

【表 5 - 1】

表 4. c r R N A ガイド配列

ガイド識別番号	crRNAガイド配列	配列番号
CR008829	AUAGGCAUCUACAUCGGAGCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	251
CR008830	UAGGCAUCUACAUCGGAGCAGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	252
CR008831	CCGUAACUCAUUGGCCAAUGGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	253
CR008832	UCUAGAGUCCCGUAACUCAUGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	254
CR008833	CUAAAUGGGGAUUUCCGCAAGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	255
CR008834	UGAGUUACGGGACUCUAGAUGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	256
CR008835	UCCAGAGUCCCGUAAGUCAUGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	257
CR008836	AGACGGGCACGAGGUUCCCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	258
CR008837	CCAAGGAUGCUUACCACCAGGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	259
CR008838	UGUGUUUGAAUGUGGCAACGGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	260
CR008839	GACGGGCACGAGGUUCCCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	261
CR008840	UGCUGCCGGAUCCAAAUCCCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	262
CR008841	CAUCCAGAUACUGGCUAAAUGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	263
CR008842	GCCAAUGACUUACGGGACUCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	264
CR008843	CGACAACCCAAAGGUUGUGAGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	265
CR008844	GUUGUUUCUGACAUUAGCCAGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	266
CR008845	CUGCCCCAUGCAUAGUUACCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	267
CR008846	UCUGGAGCAACCAUCAGAAUGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	268

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

ガイド識別番号	crRNAガイド配列	配列番号
CR008847	GAACCUCGUGCCCGUCUGCUGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	269
CR008848	GCGACAACCCAAAGGUUGUGGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	270
CR008849	GGAACCUCGUGCCCGUCUGCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	271
CR008850	CUGGUUUGAUGACCAACUUCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	272
CR008851	CAGACGGGCACGAGGUUCCCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	273
CR008852	GCAGCAACCCUCACAACCUUGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	274
CR008853	AAUGUGGCAACGUGGUGCUCGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	275
CR008854	AUUGCAAAGCGACAACCCAAGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	276
CR008855	UUCUACACCCCAGCCGCCCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	277
CR008856	CCACAUUGGCCAAUGAGUUAGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	278
CR008857	AUCCCCAUUUAGCCAGUAUCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	279
CR008858	CUUACUGUUAGAUUUUAUAUCGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	280
CR008859	GAUGUAGAUGCCUAUUCUGAGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	281
CR008860	CUAGAUUGGCCAAUGACUUAGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	282
CR008861	UCCAAGGAUGCUUACCACCAGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	283

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

ガイド識別番号	crRNAガイド配列	配列番号
CR008862	GGUGGUAAGCAUCCUUGGAAGUUUUAGAGCUAUGC UGUUUUG	284
CR008863	CACAUUGGCCAAUGAGUUACGUUUUAGAGCUAUGC UGUUUUG	285
CR008864	UAGAUUGGCCAAUGACUUACGUUUUAGAGCUAUGC UGUUUUG	286
CR008865	ACGUUGCCACAUUCAACACGUUUUAGAGCUAUGC UGUUUUG	287
CR008866	AUGCUUACCACCAGGGGACAGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	288
CR008867	GUGGAAUACAGAGCGGAGGUGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	289
CR008868	UCUACACCCCAGCCGCCCCAGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	290
CR008869	CUGUUAGAUUUUAUAUCAGGGGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	291
CR008870	CCCCUGGUGGUAAGCAUCCUGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	292
CR008871	AUCGGAGCAGGGAUCUGUGCGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	293
CR008872	UGGUGCUCAGGACUGAUGAAGUUUUAGAGCUA UGCUGUUUUG	294
CR008873	UCCAUAGCAAUAUCCACAUGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	295
CR008874	CAUGCAAUGUCCACUCACCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	296
CR008875	CAACCUCUCCUCCUCAGGAUGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUG	297

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

ガイド識別番号	crRNAガイド配列	配列番号
CR008876	GGCGGCUGGGGUGUAGAAGCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUUG	298
CR008877	UUAUGCCUGGGAUUUUGGAUCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUUG	299
CR008878	AUCAGAAUAGGCAUCUACAUGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUUG	301
CR008879	CAGCAACCCUCACAACCUUUGUUUUAGAGCUAUG CUGUUUUUG	302
CR008880	UUGCCAAUCCUGAGGGAGGGGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUUG	303
CR008881	AUUAUUGCUAUGUCAGCAGCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUUG	304
CR008882	ACGAGGUUCCCUGGGGCGGCGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUUG	305
CR008883	UUCCAAGGAUGCUUACCACCGUUUUAGAGCUAUG CUGUUUUUG	306
CR008884	GCGGCUGGGGUGUAGAAGCAGUUUUAGAGCUAU GCUGUUUUUG	307

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

ガイド識別番号	crRNAガイド配列	配列番号
CR008885	AGAAGUGGAAUACAGAGCGGGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	308
CR008886	UCGGAGCAGGGAUCUGUGCUGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	309
CR008887	ACAGUGGGAUCUACUGCUGCGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	310
CR008888	UGAAAAAUUUAAACCUGAAGUGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	311
CR008889	UGCCCCAGCAGACGGGCACGGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	312
CR008890	CUAUGCAGGGUCCUCAGAAGGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	313
CR008891	AAAUAAAGGUGGUUGGAUCUAGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	314
CR008892	CAUUUGCCAAUCCUGAGGGAGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	315
CR008893	UCAGGGACACAUCUCCUUUGGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	316
CR008894	AGUCGGUGCAGGGGUGACCUGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	317
CR008895	UUGGCAAUUGCAGUAGCAGAGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	318
CR008896	UUUUCAUCAUUAUUAUGCCGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	319
CR008897	AUCCAGAUACUGGCUAAAUGGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	320
CR008898	GGUGCUCAGGACUGAUGAAAGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	321
CR008899	ACCUGGGCCAUGUCCCCUGGGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	322
CR008900	GCAUUUGCCAAUCCUGAGGGGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	323
CR008901	CAGCAGCAGGACACAGUCAAGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	324
CR008902	GUUACCUGGGCCAUGUCCCCGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	325
CR008903	GCCACAUUCAAAACACAGGACGUUUUAGAGCUAUGCUG UUUUG	326

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

ガイド識別番号	crRNAガイド配列	配列番号
CR008904	ACAUCCAGAUACUGGCUAAAAGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	327
CR008905	GCCUGUCCUGUGUUUGAAUGGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	328
CR008906	GCUCCUUUGCCCCAGCAGACGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	329
CR008907	CGAGGUUCCCUGGGGCGGCUGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	330
CR008908	UACUGCAUUUGCCAAUCCUGGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	331
CR008909	GAGGUUCCCUGGGGCGGCUGGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	332
CR008910	AACCUCGUGCCCGUCUGCUGGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	333
CR008911	CAUUCAUUAUGCCUGGGAUUGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	334
CR008912	AGAGAACGUUAUAUGAAGUGGGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	335
CR008913	AGCAGCAGGACACAGUCAAAAGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	336
CR008914	CGCUCUGUAUUCCACUUCUGGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	337
CR008915	GGAGGUUGGCCAAAGAGAUGGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	338
CR008916	ACUUCACUGCAGCCUUUCCAGUUUUAGAGCUAUGCU GUUUUG	339

【0205】

実施例 2 - HEK 細胞における TIM 3 ガイドの設計及びスクリーニング

目的の領域において PAM を同定するために、ヒト参照ゲノム（例えば、hg38）及び目的のユーザが規定したゲノム領域（例えば、TIM 3 タンパク質コードエクソン）を用い、初期のガイド選択をインシリコで行った。同定された各 PAM について、分析を行い、統計を報告した。gRNA 分子をさらに選択し、当該技術分野において既知のいくつかの基準（例えば、GC 含有量、予測されるオンターゲット活性、及び潜在的オフターゲット活性）に基づいてランク付けした。

【0206】

この実験では、合計 88 個のガイド RNA を TIM 3（ENSG00000135077）に対して設計した。ガイド配列及び対応するゲノム座標を上提供する（表 1）。

【0207】

ガイドを、HEK293_Cas9 細胞における編集効率についてスクリーニングした。Spy_Cas9 を構成的に発現するヒト胚性腎臓腺癌細胞株 HEK293（「HEK293_Cas9」）を、10% のウシ胎仔血清を補充した DMEM 培地中で培養した。トランスフェクションの約 24 時間前に、細胞を 96 ウェルプレート中で 10,000 細

胞／ウェルの密度でプレーティングした（トランスフェクション時に約70%のコンフルエント）。細胞を、リポフェクタミンRNAiMAX（ThermoFisher，カタログ13778150）によって、製造者のプロトコルに従ってトランスフェクトした。細胞を、個々のガイド（25nM）、trRNA（25nM）、Lipofectamine RNAiMAX（0.3μL／ウェル）、及びOptiMEM培地（ThermoFisher）を含むリポプレックスによってトランスフェクトした。DNA単離及びNGS分析を、実施例1に記載されるように行った。表5は、HEK293 Cas9細胞におけるこれらのガイドによるTRAC遺伝子座におけるインデル%を示す。

【表6】

表5－HEK293細胞におけるTIM3遺伝子座における平均パーセント編集（別段の注記がない限り、n＝3）

ガイド識別番号	平均	SD	ガイド識別番号	平均	SD	ガイド識別番号	平均	SD
CR008829	49.57	4.14	CR008859	34.33	6.34	CR008888	3.27	0.29
CR008830	72.07	3.72	CR008860	75.70	1.66	CR008889	0.77	0.12
CR008831	31.70	5.48	CR008861*	65.55	4.05	CR008890	28.23	9.77
CR008832	46.10	3.82	CR008862	64.13	7.53	CR008891	61.43	5.14
CR008833	60.73	5.85	CR008863	30.30	3.79	CR008892	40.27	7.13
CR008834	68.27	8.18	CR008864	67.70	9.60	CR008893	33.00	2.87
CR008835	40.63	7.29	CR008865	12.40	2.67	CR008894	40.80	2.12
CR008836	43.77	2.79	CR008866	9.50	1.81	CR008895	24.53	9.23
CR008837	73.57	3.48	CR008867	37.50	2.51	CR008896	0.57	0.33
CR008838	46.37	2.14	CR008868	34.37	3.00	CR008897	24.13	10.02
CR008839	84.73	1.01	CR008869	33.50	12.04	CR008898	55.87	8.17
CR008840	73.53	2.73	CR008870	47.57	6.21	CR008899	1.90	0.24
CR008841	11.97	2.74	CR008871	27.70	2.93	CR008900	11.83	2.65
CR008842	7.80	1.23	CR008872	41.07	8.61	CR008901	30.57	4.49
CR008843	1.10	0.08	CR008873	35.10	10.67	CR008902	27.53	5.73
CR008844	47.40	7.16	CR008874	8.73	0.45	CR008903	10.20	0.70
CR008845	4.37	1.04	CR008875	13.73	1.81	CR008904	10.67	3.21
CR008846	48.30	2.26	CR008876	3.97	0.17	CR008905	11.67	1.77
CR008847	11.60	1.67	CR008877	54.73	11.59	CR008906	60.03	1.11
CR008848	0.43	0.05	CR008878	20.43	1.24	CR008907	50.87	6.95
CR008849	5.67	0.79	CR008879	68.53	8.63	CR008908	42.50	8.43
CR008850	32.23	3.02	CR008880	13.03	1.60	CR008909	20.27	6.54
CR008851	12.57	2.96	CR008881	10.20	3.69	CR008910	73.60	1.35
CR008852	12.07	2.03	CR008882	1.37	0.09	CR008911	10.87	2.61
CR008853	4.93	0.74	CR008883	64.67	8.86	CR008912	49.40	6.57
CR008854	36.47	3.80	CR008884	61.63	6.51	CR008913	53.80	8.90
CR008855	15.70	5.39	CR008885	36.27	5.04	CR008914	7.13	0.84
CR008856	55.77	2.64	CR008886	43.83	2.66	CR008915	70.67	1.57
CR008857	7.70	1.20	CR008887	20.70	0.50	CR008916	77.33	3.09
CR008858	27.10	6.21						

*CR008861 n＝2

実施例 3－ヒト CD3⁺T 細胞における TIM3 ガイドスクリーニング

実施例 2 の HEK293_Cas9 細胞の編集スクリーニングからのガイドを、ヒト CD3⁺T 細胞における編集効率についてスクリーニングした。CD3⁺T 細胞は、CD4⁺T ヘルパー細胞及び CD8⁺細胞傷害性 T 細胞を含む複数の T 細胞集団からなる。これらの細胞は、全血または白血球泳動試料から単離することができる。T 細胞は、Cas9 媒介編集を使用して患者 T 細胞を操作することによって、がん細胞を特異的に標的とし、免疫原性が低くなるように修飾することができる。

【0209】

実施例 3. 1. T 細胞への RNP の送達

T 細胞は、市販されているか（例えば、ヒト末梢血 CD4⁺CD45RA⁺T 細胞、Frozen Stem Cell Technology、カタログ 70029）、またはロイコパックから内部的に調製された。内部調製のために、市販のキット（例えば、EasySep（商標）ヒト T 細胞単離キット、Stem Cell Technology）を使用して、T 細胞を最初にロイコパックから濃縮した。濃縮した T 細胞を等分し、将来の使用のために（ 5×10^6 / バイアルで）凍結させた。その後、バイアルを必要に応じて解凍し、T 細胞培地（RPMI 1640、FBS、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビルビン酸ナトリウム、HEPES 緩衝液、2-メルカプトエタノール、及び任意選択で IL2）中の 3:1 の比の CD3 / CD28 ビーズ（Dynabeads、Life Technologies）を添加することによって活性化した。個々の crRNA 及び trRNA を、等量の試薬を混合し、95℃で 2 分間インキュベートし、室温まで冷却することによって予めアニーリングすることによって、RNP を生成した。予めアニーリングした crRNA 及び trRNA からなるデュアルガイド（dgRNA）を、SpyCas9 タンパク質とともにインキュベートし、リボ核タンパク質（RNP）複合体を形成した。CD3⁺T 細胞を、P3 Primary Cell 96-well Nucleofector（商標）キット（Lonza、カタログ V4SP-3960）を使用し、刺激されたヒト T 細胞のための製造者の Amaxa（商標）96-well Shuttle（商標）プロトコルを使用して、SpyCas9（10 nM）、個々のガイド（10 nM）及びトレーサー RNA（10 nM）を含有する RNP で三重にトランスフェクトした。T 細胞培地を、ヌクレオフェクション直後の細胞に添加し、2 日間以上培養した。

【0210】

ヌクレオフェクションの 2 日後に、ゲノム DNA を、実施例 1 に記載されるように調製し、NGS 分析を行った。表 6A 及び図 1 は、CD3⁺T 細胞における NGS 編集 % のデータを示す。

10

20

30

40

50

【表 7】

表 6 A-TIM3 遺伝子座における T 細胞における平均編集パーセント

	ドナー826		ドナー112		ドナー262		ドナー315	
ガイド識別番号	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
CR008910	66.17	3.44	39.87	2.40	29.00	25.21	44.73	4.61
CR008898	56.40	8.92	39.50	2.35	31.93	1.91	36.33	1.50
CR008906	53.27	11.83	31.13	1.03	25.93	2.40	32.17	1.11
CR008839	37.97	18.08	42.83	3.18	46.55	0.07	49.00	4.67
CR008840	35.40	0.92	20.57	0.25	22.30	2.56	25.73	2.53
CR008913	33.83	1.46	20.60	0.56	9.27	1.05	12.13	0.35
CR008915	31.07	1.19	19.40	0.75	20.23	2.15	19.77	1.46
CR008856	31.07	1.58	16.87	0.68	13.23	2.58	15.17	1.88
CR008884	30.60	3.54	25.03	0.42	28.20	0.87	29.43	2.78
CR008877	29.50	0.95	20.07	0.67	18.20	3.20	27.77	3.42
CR008916	27.63	1.33	7.00	1.25	5.10	0.66	6.57	0.35
CR008862	16.95	7.85	20.70	1.78	23.13	1.87	26.53	1.19
CR008846	19.53	8.06	18.47	1.81	16.50	1.61	12.57	7.95
CR008883	16.87	8.42	7.40	2.61	11.77	1.32	13.30	0.56
CR008879	15.97	5.01	8.77	0.85	13.10	1.32	11.90	2.07
CR008912	15.47	7.97	11.67	1.31	10.47	1.10	8.53	0.92
CR008833	14.97	2.99	10.03	0.59	10.27	1.36	9.43	0.98
CR008837	14.93	11.48	11.30	3.95	12.30	1.39	15.57	1.18
CR008864	14.80	4.55	11.70	0.92	14.23	1.81	9.50	5.99
CR008860	13.77	3.55	6.67	0.49	4.60	0.00	6.43	1.26
CR008861	13.20	2.59	15.73	2.17	23.27	1.24	24.40	1.67
CR008830	12.20	1.31	6.47	1.07	5.37	0.35	6.23	0.38
CR008907	10.00	0.82	7.33	0.90	7.77	0.55	8.20	1.76
CR008891	9.63	2.19	5.07	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00
CR008834	7.00	3.30	7.87	5.23	5.97	0.65	5.33	1.19
CR008829	1.13	0.21	1.30	0.46	1.27	0.29	1.03	0.23
CR000961(TRAC)	84.40	2.67	78.77	1.66	67.13	5.31	78.83	4.19

【0211】

実施例 3. 2. TIM3 タンパク質発現のフローサイトメトリー分析

エレクトロポレーションの 7 日後、1:1 の比の CD3/CD28 ビーズ (Dyna beads、Life Technologies) 対細胞を使用して、細胞を再刺激した。エレクトロポレーション後 11 日目に、T 細胞をフローサイトメトリーによってアッセイして、TIM3 表面タンパク質発現を評価した。T 細胞を、TIM3 (Biolegend、カタログ 369314) を認識する抗体とインキュベートし、固定可能な生死染料 (Thermo Fisher、カタログ L34975) で染色した。その後、細胞を Cytotoflex LX 装置 (Beckman Coulter) で処理し、データを FlowJo ソフトウェアパッケージを使用して分析した。TIM3 細胞表面タンパク質を発現する細胞のパーセンテージを表 6 B 及び図 2 A ~ B に示す。

【表 8】

表 6 B-デュアルガイド編集後のTIM3陽性ヒトCD3+T細胞のパーセンテージ

crRNA	ドナー262		ドナー315		ドナー112		ドナー826	
	平均 TIM3+%	SD	平均 TIM3+%	SD	平均 TIM3+%	SD	平均 TIM3+%	SD
CR008839	30.87	3.61	38.07	1.97	5.35	0.60	12.06	5.06
CR008910	28.03	2.78	38.00	0.61	3.98	0.32	4.04	0.54
CR008898	31.53	4.15	42.70	4.78	5.22	1.14	5.71	1.00
CR008906	40.97	5.02	48.57	2.74	5.74	0.21	6.80	3.46
CR008884	35.53	2.38	52.17	6.14	6.71	0.32	10.11	1.38
CR008877	45.87	6.04	54.77	5.29	8.79	2.45	12.44	2.76
CR008862	50.47	4.20	59.10	6.68	9.13	1.80	9.73	3.62
CR008840	46.23	2.45	56.60	3.40	8.40	1.29	8.47	1.33
CR008861	51.57	3.18	63.70	4.20	8.55	0.66	13.10	2.09
CR008915	47.27	8.28	62.40	0.80	8.49	1.21	14.77	2.57
CR008837	55.03	2.87	69.20	4.12	9.00	1.93	13.90	1.57
CR008856	50.53	6.09	60.97	2.89	11.40	0.70	13.70	1.10
CR008883	53.97	0.12	65.33	2.68	9.53	1.04	14.93	1.90
CR008846	49.67	13.76	60.37	2.78	10.26	1.09	17.33	0.38
CR008913	50.87	7.96	62.43	5.05	8.99	1.97	12.73	3.40
CR008879	55.67	3.90	66.87	5.75	9.87	1.10	22.33	4.52
CR008864	56.20	9.71	66.53	3.36	12.57	3.84	19.60	1.40
CR008833	52.40	6.26	63.57	6.75	8.01	1.05	16.73	3.08
CR008912	57.33	6.84	68.47	5.28	9.58	1.50	24.17	7.57
CR008907	56.63	4.97	64.30	7.05	14.93	4.40	15.40	2.17
CR008916	56.13	0.21	67.60	1.31	8.12	2.42	14.17	2.97
CR008860	59.37	3.44	67.70	1.55	9.76	1.16	19.93	2.42
CR008830	57.63	1.76	64.70	1.97	14.27	2.82	13.20	1.25
CR008834	58.87	3.00	61.63	7.41	15.07	2.76	23.17	8.21
CR008829	52.70	9.70	67.03	3.43	12.77	2.71	20.43	1.56
CR008891	64.57	6.56	68.30	3.39	12.57	1.07	23.53	3.00
CR000961 (TRAC)	76.17	4.83	75.23	3.25	11.77	1.53	21.87	1.60

【0212】

実施例4-TIM3ガイドのオフターゲット分析

生化学的方法（例えば、Cameron et al. Nature Methods . 6, 600-606; 2017）を使用して、TIM3を標的とするガイドを使用して、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。標的インデル活性を示すガイドを、このアッセイで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TIM3を標的とする15個のdgRNA及びVEGFAを標的とする陽性対照ガイドG000645を、精製されたヒトゲノムDNAを使用してスクリーニングした。生化学アッセイにおいて64nMのガイド濃度を使用して検出された潜在的なオフターゲット部位の数を表7に示す。

【表 9】

表 7ー生化学的アッセイによって予測される T I M 3 ガイドの潜在的なオフターゲット部位

ガイド	標的	部位
CR008829	TIM3	60
CR008830	TIM3	55
CR008839	TIM3	526
CR008840	TIM3	406
CR008856	TIM3	58
CR008861	TIM3	973
CR008862	TIM3	248
CR008877	TIM3	598
CR008883	TIM3	236
CR008884	TIM3	1238
CR008898	TIM3	502
CR008906	TIM3	286
CR008910	TIM3	281
CR008913	TIM3	386
CR008915	TIM3	1037
G000645	VEGFA	6071

10

20

【0213】

実施例 4. 1. 潜在的なオフターゲット部位を検証するための標的シーケンシング

上で使用される生化学的方法などの既知のオフターゲット検出アッセイでは、多数の潜在的なオフターゲット部位が、典型的には、設計によって回収され、他の状況、例えば目的の一次細胞において検証することができる潜在的な部位に対して「ワイドネットをキャストする」ようにする。例えば、この生化学的方法は、典型的には、このアッセイが細胞環境を含まない精製された高分子量ゲノム DNA を利用し、使用される Cas9 RNP の用量に依存するため、潜在的なオフターゲット部位の数を過剰に表す。したがって、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標的シーケンシングを使用して検証され得る。

30

【0214】

1つのアプローチでは、一次 T 細胞を、Cas9 mRNA 及び目的の 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）を含む LNP で処理する。次いで、一次 T 細胞を溶解し、潜在的なオフターゲット部位（複数可）に隣接するプライマーを使用して NGS 分析のためのアンプリコンを生成する。特定のレベルでのインデルの同定は、潜在的なオフターゲット部位を検証することができるが、潜在的なオフターゲット部位で見出されるインデルの欠如は、利用されたオフターゲットアッセイにおいて偽陽性を示す場合がある。

40

【0215】

実施例 5ーCD3+T 細胞における単一ガイド分析

T 細胞を、実施例 3 に概説されるように調製した。単一ガイド（sgRNA）を 95℃ で 2 分間インキュベートし、室温まで冷却した。次いで、sgRNA を Spy Cas9 タンパク質とインキュベートして、リボ核タンパク質（RNP）複合体を形成した。CD3+T 細胞を、P3 Primary Cell 96-well Nucleofec

50

t o r（商標）キット（L o n z a、カタログ V 4 S P－3 9 6 0）を使用し、刺激されたヒト T 細胞のための製造者の A m a x a（商標）9 6－w e l l S h u t t l e（商標）プロトコルを使用してヌクレオフェクトされた、S p y C a s 9（1 0 n M）及び個々の s g R N A（1 0 n M）を含有する R N P でトランスフェクトした。T 細胞培地を、ヌクレオフェクション直後の細胞に添加し、培養した。エレクトロポレーションの 2 日後に、細胞の一部を採取し、実施例 1 と同様に N G S を実施した。平均編集パーセントを表 8 A 及び図 3 A に示す。

【表 1 0】

表 8 A：s g R N A 編集後の T 細胞における T I M 3 遺伝子座における平均編集パーセント

ガイド	ドナー1162		ドナー907	
	編集%の平均	SD	編集%の平均	SD
G015083	39.93	9.81	62.17	6.64
G015087	39.13	6.15	48.20	4.57
G015078	7.70	0.66	20.73	1.17
G015085	13.17	1.11	13.57	1.44
G015081	8.87	1.50	12.83	2.51
G015086	7.20	1.04	8.93	2.54
G015080	5.90	0.87	7.87	1.50
G015079	0.87	0.15	1.80	0.10
G015082	6.23	0.71	9.63	1.27
G015084	3.73	0.06	3.30	0.10
G000294 VEGFA(対照)	81.70	1.42	66.85	6.45

【0 2 1 6】

エレクトロポレーション後 7 日目に、I L－2 及び C D 3／C D 2 8 ビーズ（D y n a b e a d s）で培地を調製した。再刺激のための細胞対ビーズ比は、1：1であった。再刺激されたタンパク質レベルを、実施例 3．2 と同様に、かつ表 8 B 及び図 3 B に示されるようにフローサイトメトリーによって測定した。

【表 1 1】

表 8 B : s g R N A編集後の T I M 3 陽性ヒト C D 3 + T細胞の平均パーセンテージ (n = 3)

ガイド	ドナー1162		ドナー907	
	平均TIM3+%	SD	平均TIM3+%	SD
G015083	54.13	10.20	37.23	5.73
G015087	57.40	5.70	55.57	3.04
G015078	78.33	2.46	78.07	2.03
G015085	81.57	0.15	89.03	0.12
G015081	82.47	1.33	85.43	1.21
G015086	82.57	0.98	90.43	0.83
G015080	83.67	2.50	89.13	0.90
G015079	84.27	0.45	89.90	0.92
G015082	85.43	2.05	89.97	0.70
G015084	86.30	1.39	91.77	1.01
G000294 VEGFA(対照)	79.97	3.46	89.70	3.70

【 0 2 1 7 】

実施例 6 ー 様々な用量の R N A による T I M 3 編集

T細胞を、C a s 9をコードするm R N Aと、T I M 3または対照遺伝子座を標的とするs g R N Aとを共製剤化する脂質ナノ粒子の増加量で編集した。

【 0 2 1 8 】

凍結保存したT細胞を、水浴中で解凍した。T細胞を、サイトカイン培地 1 0 m L 当たり 1.5×10^6 の密度で再懸濁した。T r a n s A c t (商 標) (M i l t e n y i) を 1 : 1 0 0 希釈で各フラスコに添加し、3 7 ° C で一晚インキュベートした。T細胞を採取し、サイトカイン (I L - 2 (2 0 0 U / m L) 、 I L - 7 (5 n g / m L) 、及び I L - 1 5 (5 n g / m L)) で調製した培地 (血清を含まない X - V I V O (商 標) 基礎培地) 中に再懸濁した。A p o E 3を、X - V I V O (商 標) 5 % H S培地中の最終濃度が 1 u g / m L になるように添加した。表 7 に示されるガイドで製剤化した L N P を、A p o E 培地中で 2 倍の最終濃度まで調製し、3 7 ° C で 1 5 分間インキュベートした。5 0 μ L の L N P - A p o E 及び 5 0 μ L の T細胞を混合し、2 4 時間培養した。N G S 分析を、実施例 1 と同様に実施した。N G S データを表 9 及び図 4 に示す。

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 9：様々な用量の LNP での T 細胞編集のためのインデルパーセント

用量 (μ g/ml)	G018436		G018437		G018438 陽性対照		G000739 陰性対照	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
10	95.23	0.45	95.50	1.15	94.63	1.36	0.17	0.06
5	91.70	0.89	94.43	1.00	91.80	1.11	0.10	0.00
2.5	81.57	0.92	82.90	3.64	76.30	3.38	0.17	0.06
1.25	46.10	5.86	40.00	7.29	28.47	3.58	0.13	0.06
0.625	17.23	5.74	13.57	2.20	6.53	1.23	0.10	0.00
0.3125	4.80	1.30	3.27	2.49	1.70	0.10	0.10	0.00
0.15	1.70	0.53	0.93	0.21	0.87	0.29	0.10	0.00
0.07	0.80	0.36	0.47	0.06	0.47	0.21	0.17	0.06

【0 2 1 9】

実施例 7－T I M 3 ノックアウトを有する操作された T 細胞

T 細胞を、一連の遺伝子破壊及び挿入で操作した。健康なドナー細胞を、3つの LNP で連続的に処理し、各 LNP は、Cas 9 及び sgRNA 標的化をコードする mRNA と共製剤化した。最初に、TRBC をノックアウトするように細胞を編集した。ウィルムス腫瘍抗原 (WT1 TCR) を標的とするトランスジェニック T 細胞受容体 (配列番号 1 0 0 1) を、AAV を使用して相同性指向修復テンプレートを送達することによって、TRAC 切断部位に組み込んだ。最後に、TIM3 をノックアウトするように T 細胞を編集した。

【0 2 2 0】

7. 1. T 細胞調製

健康なヒトドナーアフェレーシスを商業的に取得し (HemaCare)、洗浄し、CliniMACS PBS / EDTA 緩衝液 (Miltenyi カタログ 130-070-525) に再懸濁した。3 人のドナーからの T 細胞を、CD4 及び CD8 磁気ビーズ (Miltenyi BioTec、カタログ 130-030-401、130-030-801) を使用し、CliniMACS Plus 及び CliniMACS LS 使い捨てキットを使用して陽性選択によって単離した。T 細胞をバイアルに等分し、Cryos tor CS10 (StemCell Technologies カタログ 07930) 及び Plasmalyte A (Baxter カタログ 2B2522X) の 1:1 製剤中で将来の使用のために凍結保存した。T 細胞編集を開始する前日に、細胞を解凍し、T 細胞活性化培地 (TCAM): CTS Optmizer (ThermoFisher、カタログ A3705001) (2.5% ヒト AB 血清 (Gemini、カタログ 100-512)、1X GlutaMAX (ThermoFisher、カタログ 35050061)、10mM HEPES (ThermoFisher、カタログ 15630080)、200U/mL の IL-2 (Pepro tech、カタログ 200-02)、IL-7 (Pepro tech、カタログ 200-07)、IL-15 (Pepro tech、カタログ 200-15) を補充した) 中で一晩静置した。

【0 2 2 1】

7. 2 LNP 処理及び T 細胞の増殖

1 日目に、Cas 9 mRNA 及び TRBC を標的とする sgRNA を含有する LNP (G016239) を、1ug/mL の rhApoE3 (Pepro tech、カタログ 350-02) を含有する TCAM 中で 5ug/mL の濃度でインキュベートした。一方

、T細胞を採取し、洗浄し、ヒト試薬であるT細胞TransAct (Miltenyi、カタログ130-111-160)を1:50の希釈でTCAM中に 2×10^6 細胞/mLの密度で再懸濁した。T細胞及びLNP-ApoE培地を1:1の比で混合し、T細胞を培養フラスコ中で一晚プレATINGした。

【0222】

3日目に、T細胞を採取し、洗浄し、TCAM中に 1×10^6 細胞/mLの密度で再懸濁した。Cas9 mRNA及びTRACを標的とするsgRNAを含有するLNP (G013006)を、5ug/mLのrhApoE3 (Peprotech、カタログ350-02)を含有するTCAM中で5ug/mLの濃度でインキュベートした。T細胞及びLNP-ApoE培地を1:1の比で混合し、T細胞を培養フラスコ中でプレATINGした。次いで、WT1 TCRを含有するAAVを、 3×10^5 ゲノムコピー/細胞のMOIで各群に添加した。これらの編集を有する細胞は、表及び図において「WT1 T細胞」と称される。

【0223】

4日目に、T細胞を採取し、洗浄し、TCAM中に 1×10^6 細胞/mLの密度で再懸濁した。Cas9 mRNA及び表11に列挙されるsgRNAのうちの1つを含有するLNP。LNPを、5ug/mLのrhApoE3 (Peprotech、カタログ350-02)を含有するTCAM中で5ug/mLの濃度でインキュベートした。次いで、LNP-ApoE溶液を、1:1の比で適切な培養物に添加した。

【0224】

5~11日目に、T細胞を、T細胞増殖培地 (TCM) : CTS Optmizer (ThermoFisher、カタログA3705001) (5% CTS免疫細胞血清置換 (ThermoFisher、カタログA2596101)、1X GlutaMAX (ThermoFisher、カタログ35050061)、10mMのHEPES (ThermoFisher、カタログ15630080)、200U/mLのIL-2 (Peprotech、カタログ200-02)、IL-7 (Peprotech、カタログ200-07)、及びIL-15 (Peprotech、カタログ200-15))中の24ウェルGREXプレート (Wilson Wolf、カタログ80192)に移した。製造者のプロトコルに従って、細胞を増殖した。T細胞を6日間拡張し、培地を1日おきに交換した。細胞を、Vi-CELL細胞計数器 (Beckman Coulter) を使用して計数し、全ての試料が類似した倍率拡張を示した。

【0225】

7.3. フローサイトメトリー及びNGSによるT細胞編集の定量化

拡張後、編集されたT細胞をフローサイトメトリーによってアッセイして、TCR挿入及びメモリー細胞表現型を決定した。T細胞を、以下の分子を標的とする抗体カクテルとともにインキュベートした。CD4 (Biolegend、カタログ300524)、CD8 (Biolegend、カタログ301045)、Vb8 (Biolegend、カタログ348106)、CD3 (Biolegend、カタログ300327)、CD62L (Biolegend、カタログ304844)、CD45RO (Biolegend、カタログ304230)、CCR7 (Biolegend、カタログ353214)、及びCD45RA (Biolegend、カタログ304106)。その後、細胞をCytotflex LX装置 (Beckman Coulter) で処理し、データをFlowJoソフトウェアパッケージを使用して分析した。連続T細胞操作後に関連する細胞表面タンパク質を発現する細胞のパーセンテージを、表10A~10C及び図5A~5Cに示す。表10Aは、T細胞操作後のCD8+細胞の総パーセンテージ、及びVb8抗体で検出された、操作されたTCRを発現するCD8+またはCD4+細胞の割合を示す。表10B及び図5Aは、幹細胞メモリー表現型 (Tscm; CD45RA+CD62L+) を有するCD8+Vb8+細胞のパーセンテージを示す。表10C及び図5Bは、中央メモリー細胞表現型 (Tcm; CD45RO+CD62L+) を有するCD8+Vb8+細胞のパーセンテージを示す。表10C及び図5Cは、エフェクターメモリー表現型 (T

10

20

30

40

50

e m ; C D 4 5 R O + C D 6 2 L - C C R 7 -) を有する全細胞のパーセンテージを示す。フローサイトメトリー分析に加えて、実施例 1 に記載されるようにゲノム D N A を調製し、N G S 分析を実施して、各標的部位における編集速度を決定した。表 1 1 及び図 6 A ~ 6 B は、第 3 の連続編集で操作された遺伝子座におけるインデル頻度の結果を示す。
【表 1 3】

表 1 0 A - 指定された表面タンパク質を発現する細胞のパーセンテージ

試料	合計のCD8+%		CD8+のVb8+%		CD4+のVb8+%	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
WT1 T細胞	57.77	7.95	57.87	5.02	62.63	5.17
G018436	56.73	6.09	57.00	5.86	62.73	6.03
G020845	56.17	7.25	58.17	5.60	63.03	5.85

10

【表 1 4】

表 1 0 B - 幹細胞メモリー表現型を有する V b 8 + C D 8 + 細胞のパーセンテージ

試料	CD45RA+CD62L+CCR7+%		CD45RA+CD62L+CCR7-%	
	平均	SD	平均	SD
WT1 T細胞	13.64	12.95	15.88	12.61
G018436	11.96	11.10	17.13	13.64
G020845	11.85	10.66	17.41	14.83

20

【表 1 5】

表 1 0 C - 中央メモリー細胞表現型またはエフェクターメモリー細胞表現型を有する V b 8 + C D 8 + 細胞のパーセンテージ

試料	CD45RO+CD62L+CCR7+%		CD45RO+CD62L+CCR7-%		CD45RO+CD62L-CCR7-%	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
WT1 T細胞	3.48	1.70	17.73	7.12	36.67	24.49
G018436	3.47	2.11	16.90	6.32	37.43	24.99
G020845	3.36	1.92	18.53	6.09	37.33	23.47

30

40

【表 1 6】

表 1 1－第 3 の連続編集で操作された遺伝子のインデル頻度

試料	プライマーセット1			プライマーセット2		
	平均	SD	n	平均	SD	n
G018434 [LAG3]	0.99	0.00	2	0.99	0.00	3
G018436 [TIM3]	0.83	0.06	2	0.85	0.05	3
G020845 [TIM3]	0.92	0.01	2	0.88	0.05	3
G021215 [2B4]	データなし			0.58	0.06	3
G021216 [2B4]	0.61	0.06	2	0.63	0.05	3

10

【0 2 2 6】

実施例 8－操作された T 細胞を使用した A M L 細胞の増殖の阻害

4 日目に、T 細胞を採取し、洗浄し、T C A M 中に 1×10^6 細胞 / m L の密度で再懸濁した。C a s 9 m R N A 及び表 1 4 に列挙される g R N A のうちの 1 つを含有する L N P。L N P を、5 u g / m L の r h A p o E 3 (P e p r o t e c h、カタログ 3 5 0 - 0 2) を含有する T C A M 中で 5 u g / m L の濃度でインキュベートした。次いで、L N P - A p o E 溶液を、1 : 1 の比で適切な培養物に添加した。

20

【0 2 2 7】

チェックポイント阻害剤は、がんなどの増殖性障害において生じ得る免疫消耗と関連付けられる。W T 1 に関連する増殖性障害としては、急性骨髄性白血病 (A M L) 及び慢性骨髄性白血病 (C M L) を含む多数の血液悪性腫瘍が挙げられる。チェックポイント阻害剤の発現を低減し、W T 1 T C R の発現を誘導するために実施例 7 の方法によって調製した細胞を、インビトロ及びインビボの両方の既知の A M L モデルを使用して試験する (例えば、Z h o u e t a l . , B l o o d (2 0 0 9) 1 1 4 : 3 7 9 3 - 3 8 0 2 を参照のこと)。

【0 2 2 8】

インビトロ細胞死滅アッセイを使用して、異常な増殖を有する細胞に対する T 細胞の活性を検出することができる。実施例 7 の方法によって調製された T 細胞が標的細胞を排除する能力は、操作された T 細胞を、W T 1 抗原の高発現を伴う急性骨髄性白血病 (A M L) 由来の原発性白血病芽球 (C D 3 3 + 細胞) と共培養することによって評価される。白血病芽球は、例えば、実施例 9 と同様にアッセイすることができる。

30

【0 2 2 9】

ヒト W T 1 発現 A M L 細胞株を、0 日目に致死用量で静脈内経路を介してマウスに注射する。実施例 7 の方法によって調製した細胞を、1 4 日目に静脈内投与する。マウスの生存をモニターする。W T 1 T C R を発現するように操作された T 細胞で処置されたマウスは、W T 1 T C R を発現しない T 細胞で処置されたマウスよりも長く生存可能である。W T 1 T C R の発現に加えて、チェックポイント阻害剤の発現を阻害するように操作された T 細胞で処置されたマウスは、W T 1 T C R 及び全ての内因性チェックポイント阻害剤を発現する T 細胞で処置されたマウスよりも長く生存可能である。

40

【0 2 3 0】

実施例 9－操作された T 細胞による標的細胞死滅

実施例 7 で操作した T 細胞を、I n c u c y t e L i v e I m a g i n g システムを使用して、原発性白血病芽球を殺傷する能力について評価した。簡潔に述べると、T 細胞を操作して、W T 1 T C R を T R A C 遺伝子座に挿入し、2 つの T 細胞ドナー試料 (W T 1 T 細胞) 中の T R B C 遺伝子座をノックアウトした。第 3 の操作ステップでは、いくつかの W T 1 T 細胞を、G 0 1 8 4 3 6 または G 0 2 0 8 4 5 を使用して T I M 3

50

をロックアウトするように処理した。3人のHLA-A*02:01患者から採取したWT1を発現する原発性白血病芽球を、生細胞核標識用のNucLight Rapid Red試薬 (Essen Biosciences) で標識し、カスパーゼ3/7緑色試薬の存在下で、異なる(5:1、1:1、及び1:5)のエフェクター対標的(E:T)比で操作されたリンパ球と共培養した。E:T比5:1の場合は2万芽球、E:T比1:1及び1:5の場合は75,000芽球を使用した。共培養物を、5%のFBS、1%のペニシリン-ストレプトマイシン (BioWhittaker/Lonza)、2mMのグルタミン (BioWhittaker/Lonza)、1 μ g/mLのCD28モノクローナル抗体 (BD Biosciences)、G-CSF及びIL-3 (20ng/mL、Bio-technique)を補充したX-VIVO中の平底96ウェルプレートに播種した。画像を60分ごとに撮影し、赤色標的細胞中の緑色蛍光カスパーゼ3/7シグナルを、Incucyte Live-Cell Imaging and Analysisソフトウェア (Essen Biosciences) を使用して定量化した。このアッセイでは、生きたAML細胞は赤色のみで蛍光を発するが、死んだAML細胞は赤色及び緑色の両方で蛍光を発する。表12及び図7A~図7Iは、緑色及び赤色の両方で蛍光を発する各画像 (um²/画像) の平均面積の平均 $\pm$ SEMを示す。各エフェクター集団について、上記のように、2つの異なるT細胞ドナーからの操作された細胞を使用した。

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 1】

表 1 2 - W T 1 を発現する A M L 細胞を操作された T 細胞に曝露した後の、緑色及び赤色の両方で蛍光を発する各画像の平均面積 (μm^2 / 画像)

細胞	E:T	時間(時間)	A M L のみ		W T 1 T 細胞		G 0 1 8 4 3 6		G 0 2 0 8 4 5	
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
pA M L 1	1:5	1	3354	425	3558	1253	4866	1198	3477	565
pA M L 1	1:5	2	4050	59	5246	986	7259	1119	5463	210
pA M L 1	1:5	3	6025	567	6879	69	9927	1165	8218	276
pA M L 1	1:5	4	6558	1074	8320	644	12815	675	10759	1558
pA M L 1	1:5	5	7545	1341	9755	2081	15020	1115	13207	2302
pA M L 1	1:5	6	7666	2215	10902	2883	16430	445	14740	3465
pA M L 1	1:5	7	7752	2651	11272	3548	17009	487	15286	3773
pA M L 1	1:5	8	8092	2428	11439	2987	16511	195	14769	4311
pA M L 1	1:5	9	8082	2776	11135	3449	16170	210	14187	4318
pA M L 1	1:5	10	7993	2486	10709	3038	14717	199	13254	4075
pA M L 1	1:5	11	8056	2822	10507	2360	13890	180	12597	3346
pA M L 1	1:5	12	8169	3029	9784	2530	13101	507	11647	3176
pA M L 1	1:5	13	8012	3644	9293	2710	12403	271	11149	3029
pA M L 1	1:5	14	7859	3600	8941	2398	11625	146	10278	2770
pA M L 1	1:5	15	7449	4138	8363	2053	10781	218	9398	2475
pA M L 1	1:5	16	7051	3838	7641	2231	9759	254	8600	2387
pA M L 1	1:5	17	6789	3482	7049	2066	9213	66	8007	2211
pA M L 1	1:5	18	6541	3407	6760	1893	8728	76	7569	2346
pA M L 1	1:5	19	6298	3571	6229	2005	7894	228	6986	2282
pA M L 1	1:5	20	5860	3227	5748	1623	7660	15	6578	1925
pA M L 1	1:5	21	5739	3232	5509	1603	7150	167	6214	1961
pA M L 1	1:5	22	5486	3336	4638	130	6847	350	5950	1692
pA M L 1	1:5	23	5048	3561	5171	1804	6452	99	5333	1697
pA M L 1	1:5	24	4875	3090	4682	1375	5969	189	4822	1307
pA M L 1	1:1	0	2827	509	13236	792	18506	3403	12224	1520
pA M L 1	1:1	1	3354	425	13804	5477	23483	7376	13376	1340
pA M L 1	1:1	2	4950	59	19052	5728	32806	8682	18813	159
pA M L 1	1:1	3	6025	567	26223	6816	44347	9436	28243	1283
pA M L 1	1:1	4	6558	1074	35499	4617	58692	5598	39077	3476
pA M L 1	1:1	5	7545	1341	45746	2096	78430	5339	51140	6870
pA M L 1	1:1	6	7666	2215	53641	2027	84762	3747	60161	10851
pA M L 1	1:1	7	7752	2651	56628	3269	94531	172	63708	12422
pA M L 1	1:1	8	8092	2428	61273	4878	97258	419	65719	11649
pA M L 1	1:1	9	8082	2776	60981	3635	99099	1889	66267	12161

10

20

30

40

50

【表 17 - 2】

細胞	E:T	時間(時間)	AMLのみ		WT1 T細胞		G018436		G020845	
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
pAML1	1:1	10	7993	2486	61917	4229	98349	3181	62931	13995
pAML1	1:1	11	8056	2822	61609	2905	99422	4784	61894	11275
pAML1	1:1	12	8169	3029	61417	3408	96882	3360	60045	11362
pAML1	1:1	13	8012	3644	59798	1717	92606	2004	56536	14761
pAML1	1:1	14	7859	3600	59052	2513	91122	6152	54877	11407
pAML1	1:1	15	7449	4138	57879	1056	89011	4688	53117	13230
pAML1	1:1	16	7051	3838	54344	223	82495	1210	49178	14897
pAML1	1:1	17	6789	3482	53236	871	83153	6883	48985	12343
pAML1	1:1	18	6541	3407	51299	1296	79885	4281	47236	13115
pAML1	1:1	19	6298	3571	50863	1123	77241	1941	44179	16060
pAML1	1:1	20	5860	3227	49140	509	78579	5976	44530	14425
pAML1	1:1	21	5739	3232	49144	560	76285	8774	43881	13326
pAML1	1:1	22	5486	3336	48020	1809	71678	4174	41156	14453
pAML1	1:1	23	5048	3561	45640	2347	70217	243	39684	18408
pAML1	1:1	24	4875	3090	44944	1257	66290	971	38340	17381
pAML1	5:1	0	260	94	11330	5133	18343	8168	10674	262
pAML1	5:1	1	429	220	13196	4743	24803	12573	13665	807
pAML1	5:1	2	627	209	19065	4442	37466	19427	22532	1684
pAML1	5:1	3	776	151	27606	4557	50419	23595	34208	3913
pAML1	5:1	4	908	160	39114	1808	68198	24464	48569	1471
pAML1	5:1	5	915	198	50163	2145	82847	22360	63385	4753
pAML1	5:1	6	952	211	57449	4329	92758	22029	76094	10083
pAML1	5:1	7	911	254	61267	6398	96987	20525	81263	13679
pAML1	5:1	8	1029	293	63554	4397	99851	23100	81794	13826
pAML1	5:1	9	1029	387	63260	3866	97587	19983	80668	14115
pAML1	5:1	10	1037	420	61830	3055	94273	19383	77292	15546
pAML1	5:1	11	1132	485	61700	1135	93492	22367	76750	14614
pAML1	5:1	12	1180	540	60149	442	90713	23282	72007	13868
pAML1	5:1	13	1140	562	57421	409	87875	22975	68803	14808
pAML1	5:1	14	1166	592	56596	2191	85254	23319	66593	13388

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 3】

細胞	E:T	時間(時間)	AMLのみ		WT1 T細胞		G018436		G020845	
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
pAML1	5:1	15	1119	613	54439	3881	81429	23684	64660	13197
pAML1	5:1	16	985	492	52113	4265	78212	23283	59654	13865
pAML1	5:1	17	984	510	50843	6004	77002	25941	58343	11216
pAML1	5:1	18	874	487	49954	6454	73820	24195	55696	12701
pAML1	5:1	19	816	422	47822	6412	71158	22623	53129	14091
pAML1	5:1	20	775	463	47665	7717	70949	25548	51653	13235
pAML1	5:1	21	780	474	46969	7606	67555	22927	49957	13273
pAML1	5:1	22	768	523	46262	11319	67213	25242	49493	10779

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 4】

細胞	E:T	時間(時間)	AMLのみ		WT1 T細胞		G018436		G020845	
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
pAML1	5:1	23	661	352	41513	4150	61512	16242	44430	15488
pAML1	5:1	24	639	353	42152	6450	60162	17177	44087	13825
pAML2	1:5	1	5874	3593	-128	7179	7991	4569	3021	2681
pAML2	1:5	2	8990	2303	4735	8794	14849	6351	7512	4051
pAML2	1:5	3	10952	2796	8464	9292	21146	5244	11113	5536
pAML2	1:5	4	10432	5484	12167	7231	26594	6319	15377	4809
pAML2	1:5	5	10817	4334	16482	4777	33886	7088	23368	5314
pAML2	1:5	6	11265	6212	21199	2227	38465	3927	28788	3050
pAML2	1:5	7	10492	7822	22442	1160	40895	1798	31701	339
pAML2	1:5	8	10232	6164	23501	1059	41380	1617	33843	259
pAML2	1:5	9	10518	7563	24885	2627	41912	816	34623	2144
pAML2	1:5	10	9472	7470	24114	3122	41092	2623	34104	3508
pAML2	1:5	11	9351	8653	23935	5093	40231	2709	33849	3279
pAML2	1:5	12	8614	8981	23349	4417	39007	3029	32224	4526
pAML2	1:5	13	8045	8457	21814	5360	36581	4399	29664	5457
pAML2	1:5	14	6364	8590	20406	4731	34219	3406	28161	4097
pAML2	1:5	15	5270	9421	18965	4726	32269	3380	25639	4913
pAML2	1:5	16	3744	9415	17229	5532	29606	4813	23452	5514
pAML2	1:5	17	1725	8950	15487	5228	26929	4585	21773	5089
pAML2	1:5	18	763	9149	13494	5668	25165	3643	19265	4701
pAML2	1:5	19	-606	8876	11518	5824	22558	4392	17040	5608
pAML2	1:5	20	-1906	8549	9623	4578	20412	4091	15212	4530
pAML2	1:5	21	-3578	8225	8117	5170	18464	3425	13072	5306
pAML2	1:5	22	-3438	6448	6284	4824	14162	6783	10070	7087
pAML2	1:5	23	-3948	9503	4222	8373	9853	9299	5984	10504
pAML2	1:5	24	-5862	8226	1826	6660	6627	6279	2707	8539
pAML2	1:1	0	2827	509	13236	792	18506	3403	12224	1520
pAML2	1:1	1	3354	425	13804	5477	23483	7376	13376	1340
pAML2	1:1	2	4950	59	19052	5728	32806	8682	18813	159

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 5】

細胞	E:T	時間(時間)	AMLのみ		WT1 T細胞		G018436		G020845	
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
pAML2	1:1	3	6025	567	26223	6816	44347	9436	28243	1283
pAML2	1:1	4	6558	1074	35499	4617	58692	5598	39077	3476
pAML2	1:1	5	7545	1341	45746	2096	78430	5339	51140	6870
pAML2	1:1	6	7666	2215	53641	2027	84762	3747	60161	10851
pAML2	1:1	7	7752	2651	56628	3269	94531	172	63708	12422
pAML2	1:1	8	8092	2428	61273	4878	97258	419	65719	11649
pAML2	1:1	9	8082	2776	60981	3635	99099	1889	66267	12161
pAML2	1:1	10	7993	2486	61917	4229	98349	3181	62931	13995
pAML2	1:1	11	8056	2822	61609	2905	99422	4784	61894	11275

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 6】

細胞	E:T	時間(時間)	AMLのみ		WT1 T細胞		G018436		G020845	
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
pAML2	1:1	12	8169	3029	61417	3408	96882	3360	60045	11362
pAML2	1:1	13	8012	3644	59798	1717	92606	2004	56536	14761
pAML2	1:1	14	7859	3600	59052	2513	91122	6152	54877	11407
pAML2	1:1	15	7449	4138	57879	1056	89011	4688	53117	13230
pAML2	1:1	16	7051	3838	54344	223	82495	1210	49178	14897
pAML2	1:1	17	6789	3482	53236	871	83153	6883	48985	12343
pAML2	1:1	18	6541	3407	51299	1296	79885	4281	47236	13115
pAML2	1:1	19	6298	3571	50863	1123	77241	1941	44179	16060
pAML2	1:1	20	5860	3227	49140	509	78579	5976	44530	14425
pAML2	1:1	21	5739	3232	49144	560	76285	8774	43881	13326
pAML2	1:1	22	5486	3336	48020	1809	71678	4174	41156	14453
pAML2	1:1	23	5048	3561	45640	2347	70217	243	39684	18408
pAML2	1:1	24	4875	3090	44944	1257	66290	971	38340	17381
pAML2	5:1	0	8544	6060	28453	4417	44573	2389	27036	3558
pAML2	5:1	1	5486	2264	25864	6247	42830	18780	27418	273
pAML2	5:1	2	5389	2108	34805	5246	58200	21938	39574	1559
pAML2	5:1	3	5464	1824	45856	4647	80785	31602	55395	2930
pAML2	5:1	4	5618	1740	63955	154	106818	33332	79920	7865
pAML2	5:1	5	5707	1704	81405	8675	134617	30822	104589	14772
pAML2	5:1	6	5933	1616	96371	19045	158936	28473	124077	21113
pAML2	5:1	7	5794	1747	104357	24148	166931	15749	133412	28607
pAML2	5:1	8	5951	1493	110958	27899	178188	19006	139011	29758
pAML2	5:1	9	5951	1635	112764	28875	177442	8385	139856	33628
pAML2	5:1	10	5812	1582	114032	27647	177171	8365	138313	35590
pAML2	5:1	11	5923	1592	114965	26691	180276	13596	138177	33226
pAML2	5:1	12	5652	1846	115372	26562	179251	11705	135309	35062
pAML2	5:1	13	5699	1742	115277	23959	175482	11608	131966	37172
pAML2	5:1	14	5540	1738	112945	21372	174076	14216	129224	34143

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 7】

細胞	E:T	時間(時間)	AMLのみ		WT1 T細胞		G018436		G020845	
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
pAML2	5:1	15	5410	1741	112218	22840	172500	13440	126185	36052
pAML2	5:1	16	5246	1920	110570	23432	169658	13577	123089	37580
pAML2	5:1	17	4937	1814	108018	20391	164679	15387	120285	36524
pAML2	5:1	18	4867	1720	107372	19439	160240	12920	117252	36791
pAML2	5:1	19	4613	1713	105140	19053	158829	10417	114201	39638
pAML2	5:1	20	4545	1686	103490	15295	153206	10193	112942	39119
pAML2	5:1	21	4424	1608	101914	15531	154584	14635	109646	39605
pAML2	5:1	22	4503	1393	97216	3580	158951	22107	110452	35950
pAML2	5:1	23	4421	1496	102070	16516	157094	17317	107956	42168
pAML2	5:1	24	4147	1398	97400	12875	152802	21628	102535	37628

【表 17 - 8】

細胞	E:T	時間(時間)	AMLのみ		WT1 T細胞		G018436		G020845	
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
pAML3	1:5	1	12582	3249	10361	2988	13320	3070	10415	1839
pAML3	1:5	2	15298	4803	13869	4097	18178	4318	14943	3274
pAML3	1:5	3	18963	6429	18221	5604	23322	6083	20668	5276
pAML3	1:5	4	22457	6780	23222	5874	29903	5654	26837	5859
pAML3	1:5	5	24776	6067	27676	5023	36424	5918	33583	5182
pAML3	1:5	6	25600	4957	30200	3609	39585	4457	37381	3236
pAML3	1:5	7	24996	4617	30785	2581	40343	4686	37885	3358
pAML3	1:5	8	24152	3733	31237	943	40885	3236	38387	1454
pAML3	1:5	9	23057	3264	30090	757	39023	3325	37280	1405
pAML3	1:5	10	21695	3120	29159	79	36791	2358	35296	16
pAML3	1:5	11	20472	2724	27871	360	35190	2077	33338	452
pAML3	1:5	12	19238	2457	25938	12	32623	1810	31255	237
pAML3	1:5	13	17694	2026	24060	494	29513	1469	28238	121
pAML3	1:5	14	16470	2080	22555	726	28031	1255	26502	221
pAML3	1:5	15	15310	1591	21151	24	25659	1187	24083	376
pAML3	1:5	16	14109	1249	19708	143	23311	497	21855	91
pAML3	1:5	17	12846	1490	18351	61	21883	1269	20549	439
pAML3	1:5	18	11779	1441	16742	130	20179	1493	18642	363
pAML3	1:5	19	10918	885	15463	357	18497	1231	17265	615
pAML3	1:5	20	10100	1021	14204	233	16796	1263	15731	620
pAML3	1:5	21	9347	760	13434	171	15558	990	14376	973
pAML3	1:5	22	8605	960	11888	589	13220	329	12542	134
pAML3	1:5	23	7917	111	10922	1673	12178	1252	11610	1101
pAML3	1:5	24	7298	494	9859	1286	11203	762	10330	450
pAML3	1:1	0	68259	25727	97207	18214	102456	17681	84608	11438

10

20

30

40

50

【表 1 7 - 9】

細胞	E:T	時間(時間)	AMLのみ		WT1 T細胞		G018436		G020845	
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
pAML3	1:1	1	55874	3593	86234	13603	111636	39890	82047	162
pAML3	1:1	2	58990	2303	100750	10127	138944	43606	101164	617
pAML3	1:1	3	60952	2796	121403	6229	171180	54785	126267	2832
pAML3	1:1	4	60432	5484	139119	1211	211221	62530	159049	2304
pAML3	1:1	5	60817	4334	165467	14640	254404	64942	198967	11259
pAML3	1:1	6	61265	6212	189110	28702	288108	59061	231779	27814
pAML3	1:1	7	60492	7822	203695	40458	310993	56278	249557	44369
pAML3	1:1	8	60232	6164	216221	47755	326310	50857	267681	50484
pAML3	1:1	9	60518	7563	225326	55164	334538	46317	274424	58802
pAML3	1:1	10	59472	7470	229487	63218	337118	38708	277682	67159
pAML3	1:1	11	59351	8653	231348	60991	339951	37616	280712	69801
pAML3	1:1	12	58614	8981	233469	62597	340214	38456	278257	70226
pAML3	1:1	13	58045	8457	232452	63694	337923	40004	273834	75001

10

20

30

40

50

【表 17 - 10】

細胞	E:T	時間(時間)	AMLのみ		WT1 T細胞		G018436		G020845	
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
pAML3	1:1	14	56364	8590	230905	58826	333105	39048	269932	72291
pAML3	1:1	15	55270	9421	227313	59089	328020	38106	264279	72318
pAML3	1:1	16	53744	9415	224262	58529	322573	34305	257591	75632
pAML3	1:1	17	51725	8950	219496	54219	316631	35147	251219	71994
pAML3	1:1	18	50763	9149	214232	55788	311921	35067	246799	74399
pAML3	1:1	19	49394	8876	210735	51467	305117	31176	237576	76125
pAML3	1:1	20	48094	8549	208073	50046	299844	30750	232906	72969
pAML3	1:1	21	46422	8225	203897	48794	295411	30793	227855	72688
pAML3	1:1	22	46562	6448	204648	40380	293864	36721	224722	70985
pAML3	1:1	23	46052	9503	200231	49006	281606	25580	215769	74244
pAML3	1:1	24	44138	8226	193355	41211	270499	30321	203219	65506
pAML3	5:1	0	1497	181	16645	4286	27783	7256	16759	5089
pAML3	5:1	1	1057	557	17905	8072	30772	16783	17292	937
pAML3	5:1	2	1365	689	23199	9299	45357	25362	25530	885
pAML3	5:1	3	1787	743	31499	12103	61927	33738	38169	469
pAML3	5:1	4	2038	587	42510	11975	81020	33648	56022	6991
pAML3	5:1	5	2242	301	51711	11057	101875	34759	74314	14516
pAML3	5:1	6	2197	121	58555	7821	111321	28866	85164	22043
pAML3	5:1	7	2117	38	61037	5875	116775	29067	89121	28320
pAML3	5:1	8	1914	40	60639	5195	114847	27811	88058	28205
pAML3	5:1	9	1780	67	60299	6339	112291	25298	86386	28286
pAML3	5:1	10	1591	112	58519	7213	107793	24110	81350	28741
pAML3	5:1	11	1470	121	56218	7214	104477	23765	77556	27804
pAML3	5:1	12	1327	83	53737	7027	100753	23126	72172	27358
pAML3	5:1	13	1217	153	52654	7676	96013	21370	66847	28562

10

20

30

40

50

【表 17-11】

細胞	E:T	時間(時間)	AMLのみ		WT1 T細胞		G018436		G020845	
			平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
pAML3	5:1	14	1093	140	50252	8369	92196	21792	63774	25036
pAML3	5:1	15	1025	139	47335	7062	87446	19476	60954	24853
pAML3	5:1	16	940	165	45286	7436	82553	16580	57709	25155
pAML3	5:1	17	867	151	43601	8013	80131	18965	54512	21754
pAML3	5:1	18	796	137	42304	7789	78147	17233	52507	22782
pAML3	5:1	19	743	157	41231	7661	77073	19461	50332	24037
pAML3	5:1	20	678	128	38692	6746	75269	18976	48458	22131
pAML3	5:1	21	641	85	37339	6557	72678	17533	46532	21236
pAML3	5:1	22	578	83	36893	7383	66802	11306	44382	22312
pAML3	5:1	23	513	112	34432	3912	64088	9368	43262	24830
pAML3	5:1	24	485	93	33681	5254	60961	10700	40655	22416

10

20

30

40

【0231】

実施例10-T細胞における追加の単一ガイド分析

T細胞を、実施例3に概説されるように調製した。単一ガイド (sgRNA) を95℃で2分間インキュベートし、室温まで冷却した。次いで、sgRNAをSpy Cas9タンパク質とインキュベートして、リボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成した。CD3⁺T細胞を、P3 Primary Cell 4D-Nucleofector Xキット (Lonza、カタログPB-P3-22500) を使用してヌクレオフェクトされた、Spy Cas9 (3nM) 及び個々のsgRNA (6nM) を含有するRNPでトランスフェクトした。T細胞培地を、ヌクレオフェクション直後の細胞に添加し、培養

50

した。エレクトロポレーションの2日後に、細胞の一部を採取し、実施例1と同様にNGSを実施した。平均編集パーセントを表13に示す。

【表18】

表13 – sgRNA編集後のT細胞におけるTIM3遺伝子座での平均編集パーセント (n = 2)

ガイド	編集%の平均	SD
G015091	86.10	0.20
G015092	99.60	0.00
G016811	95.55	0.15
G016812	89.50	0.00
G016813	98.60	0.00

10

【0232】

実施例11 – 追加の実施形態

実施形態1

chr5:157085832-157109044のゲノム座標内に、ヒトTIM3配列における遺伝子修飾を含む、操作された細胞。

20

【0233】

実施形態2

前記遺伝子修飾が、挿入、欠失、及び置換から選択される、実施形態1に記載の操作された細胞。

【0234】

実施形態3

前記遺伝子修飾が、前記TIM3遺伝子の発現を阻害する、請求項1または2に記載の操作された細胞。

【0235】

実施形態4

前記遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標：

30

40

50

【表 19】

TIM3番号	ゲノム座標(hg38)
TIM3-1	chr5:157106867-157106887
TIM3-2	chr5:157106862-157106882
TIM3-3	chr5:157106803-157106823
TIM3-4	chr5:157106850-157106870
TIM3-5	chr5:157104726-157104746
TIM3-6	chr5:157106668-157106688
TIM3-7	chr5:157104681-157104701
TIM3-8	chr5:157104681-157104701
TIM3-9	chr5:157104680-157104700
TIM3-10	chr5:157106676-157106696
TIM3-11	chr5:157087271-157087291
TIM3-12	chr5:157095432-157095452
TIM3-13	chr5:157095361-157095381
TIM3-14	chr5:157095360-157095380
TIM3-15	chr5:157108945-157108965
TIM3-18	chr5:157106751-157106771
TIM3-19	chr5:157095419-157095439
TIM3-22	chr5:157104679-157104699
TIM3-23	chr5:157106824-157106844
TIM3-26	chr5:157087117-157087137
TIM3-29	chr5:157095379-157095399
TIM3-32	chr5:157106864-157106884
TIM3-42	chr5:157095405-157095425
TIM3-44	chr5:157095404-157095424
TIM3-56	chr5:157106888-157106908
TIM3-58	chr5:157087126-157087146
TIM3-59	chr5:157087253-157087273
TIM3-62	chr5:157106889-157106909
TIM3-63	chr5:157106935-157106955
TIM3-66	chr5:157106641-157106661
TIM3-69	chr5:157087084-157087104
TIM3-75	chr5:157104663-157104683
TIM3-82	chr5:157106875-157106895
TIM3-86	chr5:157087184-157087204
TIM3-87	chr5:157106936-157106956
TIM3-88	chr5:157104696-157104716

10

20

30

40

50

任意選択で、TIM3-1～TIM3-4、TIM3-6～TIM3-15、TIM3-18、TIM3-19、TIM3-22、TIM3-29、TIM3-42、TIM3-44、TIM3-58、TIM3-62、TIM3-69、TIM3-82、TIM3-86、及びTIM3-88；TIM3-1～TIM3-5、TIM3-7、TIM3-8、TIM3-12～TIM3-15、TIM3-23、TIM3-26、TIM3-32、TIM3-56、TIM3-59、TIM3-63、TIM3-66、TIM3-75、及びTIM3-87；TIM3-2、TIM3-4、TIM3-15、TIM3-23、TIM3-56、TIM3-59、TIM3-63、TIM3-75、及びTIM3-87；TIM3-1～TIM3-4；TIM3-2、TIM3-4、及びTIM3-15；TIM3-2、TIM3-4、TIM3-15、TIM3-63、及びTIM3-87；T

IM3-2及びTIM3-15；TIM3-63及びTIM3-87；またはTIM3-15によって標的とされるものから選択されるゲノム座標内に少なくとも1個のヌクレオチドの修飾を含む、実施形態1～3のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0236】

実施形態5

前記操作された細胞が、内因性T細胞受容体（TCR）配列のゲノム座標内の遺伝子修飾を含み、前記遺伝子修飾が、TCR遺伝子の発現を阻害する、実施形態1～4のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0237】

実施形態6

前記TCR遺伝子が、TRACまたはTRBCである、実施形態5に記載の操作された細胞。

【0238】

実施形態7

以下から選択されるゲノム座標内にTRBCの遺伝子修飾を含む、実施形態6に記載の操作された細胞。

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1】

TRBC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRBC-1	chr7:142791996-142792016
TRBC-2	chr7:142792047-142792067
TRBC-3	chr7:142792008-142792028
TRBC-4	chr7:142791931-142791951
TRBC-5	chr7:142791930-142791950
TRBC-6	chr7:142791748-142791768
TRBC-7	chr7:142791720-142791740
TRBC-8	chr7:142792041-142792061
TRBC-9	chr7:142802114-142802134
TRBC-10	chr7:142792009-142792029
TRBC-11	chr7:142792697-142792717
TRBC-12	chr7:142791963-142791983
TRBC-13	chr7:142791976-142791996
TRBC-14	chr7:142791974-142791994
TRBC-15	chr7:142791970-142791990
TRBC-16	chr7:142791948-142791968
TRBC-17	chr7:142791913-142791933
TRBC-18	chr7:142791961-142791981
TRBC-19	chr7:142792068-142792088
TRBC-20	chr7:142791975-142791995
TRBC-21	chr7:142791773-142791793
TRBC-22	chr7:142791919-142791939
TRBC-23	chr7:142791834-142791854
TRBC-24	chr7:142791878-142791898
TRBC-25	chr7:142802141-142802161
TRBC-26	chr7:142791844-142791864
TRBC-27	chr7:142801154-142801174
TRBC-28	chr7:142791961-142791981
TRBC-29	chr7:142792001-142792021
TRBC-30	chr7:142791979-142791999
TRBC-31	chr7:142792041-142792061
TRBC-32	chr7:142792003-142792023
TRBC-33	chr7:142791984-142792004
TRBC-34	chr7:142792002-142792022
TRBC-35	chr7:142791966-142791986
TRBC-36	chr7:142792007-142792027
TRBC-37	chr7:142791993-142792013

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2】

TRBC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRBC-38	chr7:142791902-142791922
TRBC-39	chr7:142791724-142791744
TRBC-40	chr7:142791973-142791993
TRBC-41	chr7:142791920-142791940
TRBC-42	chr7:142791994-142792014
TRBC-43	chr7:142791887-142791907
TRBC-44	chr7:142791907-142791927
TRBC-45	chr7:142791952-142791972
TRBC-46	chr7:142791721-142791741
TRBC-47	chr7:142792718-142792738
TRBC-48	chr7:142791729-142791749
TRBC-49	chr7:142791911-142791931
TRBC-50	chr7:142791867-142791887
TRBC-51	chr7:142791899-142791919
TRBC-52	chr7:142791727-142791747
TRBC-53	chr7:142791949-142791969
TRBC-54	chr7:142791933-142791953
TRBC-55	chr7:142791932-142791952
TRBC-56	chr7:142792057-142792077
TRBC-57	chr7:142791940-142791960
TRBC-58	chr7:142791747-142791767
TRBC-59	chr7:142791881-142791901
TRBC-60	chr7:142791779-142791799
TRBC-61	chr7:142792054-142792074
TRBC-62	chr7:142792069-142792089
TRBC-63	chr7:142792712-142792732
TRBC-64	chr7:142791729-142791749
TRBC-65	chr7:142791821-142791841
TRBC-66	chr7:142792052-142792072
TRBC-67	chr7:142791916-142791936

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 3】

TRBC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRBC-68	chr7:142791899-142791919
TRBC-69	chr7:142791772-142791792
TRBC-70	chr7:142792714-142792734
TRBC-71	chr7:142792042-142792062
TRBC-72	chr7:142791962-142791982
TRBC-73	chr7:142791988-142792008
TRBC-74	chr7:142791982-142792002
TRBC-75	chr7:142792049-142792069
TRBC-76	chr7:142791839-142791859
TRBC-77	chr7:142791893-142791913
TRBC-78	chr7:142791945-142791965
TRBC-79	chr7:142791964-142791984
TRBC-80	chr7:142791757-142791777
TRBC-81	chr7:142792048-142792068
TRBC-82	chr7:142791774-142791794
TRBC-83	chr7:142792048-142792068
TRBC-84	chr7:142791830-142791850
TRBC-85	chr7:142791909-142791929
TRBC-86	chr7:142791912-142791932
TRBC-87	chr7:142791766-142791786
TRBC-88	chr7:142791880-142791900
TRBC-89	chr7:142791919-142791939

10

20

30

40

50

【 0 2 3 9】

実施形態 8

以下から選択されるゲノム座標内に T R A C の遺伝子修飾を含み、

【表 2 1 - 1】

TRAC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRAC-90	chr14:22547524-22547544
TRAC-91	chr14:22550581-22550601
TRAC-92	chr14:22550608-22550628
TRAC-93	chr14:22550611-22550631
TRAC-94	chr14:22550622-22550642
TRAC-95	chr14:22547529-22547549
TRAC-96	chr14:22547512-22547532
TRAC-97	chr14:22547525-22547545
TRAC-98	chr14:22547536-22547556
TRAC-99	chr14:22547575-22547595
TRAC-100	chr14:22547640-22547660
TRAC-101	chr14:22547647-22547667
TRAC-102	chr14:22547777-22547797
TRAC-103	chr14:22549638-22549658
TRAC-104	chr14:22549646-22549666
TRAC-105	chr14:22550600-22550620
TRAC-106	chr14:22550605-22550625
TRAC-107	chr14:22550625-22550645
TRAC-108	chr14:22539116-22539136
TRAC-109	chr14:22539120-22539140
TRAC-110	chr14:22547518-22547538
TRAC-111	chr14:22539082-22539102
TRAC-112	chr14:22539061-22539081
TRAC-113	chr14:22539097-22539117
TRAC-114	chr14:22547697-22547717
TRAC-115	chr14:22550571-22550591
TRAC-116	chr14:22550631-22550651
TRAC-117	chr14:22550658-22550678
TRAC-118	chr14:22547712-22547732
TRAC-119	chr14:22550636-22550656
TRAC-120	chr14:22550636-22550656
TRAC-121	chr14:22550582-22550602
TRAC-122	chr14:22550606-22550626
TRAC-123	chr14:22550609-22550629
TRAC-124	chr14:22547691-22547711
TRAC-125	chr14:22547576-22547596
TRAC-126	chr14:22549648-22549668

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

TRAC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRAC-127	chr14:22549660-22549680
TRAC-128	chr14:22547716-22547736
TRAC-129	chr14:22547514-22547534
TRAC-130	chr14:22550662-22550682
TRAC-131	chr14:22550593-22550613
TRAC-132	chr14:22550612-22550632
TRAC-133	chr14:22547521-22547541
TRAC-134	chr14:22547540-22547560
TRAC-135	chr14:22539121-22539141
TRAC-136	chr14:22547632-22547652
TRAC-137	chr14:22547674-22547694
TRAC-138	chr14:22549643-22549663
TRAC-139	chr14:22547655-22547675
TRAC-140	chr14:22547667-22547687
TRAC-141	chr14:22539085-22539105
TRAC-142	chr14:22549634-22549654
TRAC-143	chr14:22539064-22539084
TRAC-144	chr14:22547639-22547659
TRAC-145	chr14:22547731-22547751
TRAC-146	chr14:22547734-22547754
TRAC-147	chr14:22547591-22547611
TRAC-148	chr14:22547657-22547677
TRAC-149	chr14:22547519-22547539
TRAC-150	chr14:22549674-22549694
TRAC-151	chr14:22547678-22547698
TRAC-152	chr14:22539087-22539107
TRAC-153	chr14:22547595-22547615
TRAC-154	chr14:22547633-22547653
TRAC-155	chr14:22547732-22547752
TRAC-156	chr14:22547656-22547676

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 3】

TRAC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRAC-157	chr14:22539086-22539106
TRAC-158	chr14:22547491-22547511
TRAC-159	chr14:22547618-22547638
TRAC-160	chr14:22549644-22549664
TRAC-161	chr14:22547522-22547542
TRAC-162	chr14:22539089-22539109
TRAC-163	chr14:22539062-22539082
TRAC-164	chr14:22547597-22547617
TRAC-165	chr14:22547677-22547697
TRAC-166	chr14:22549645-22549665
TRAC-167	chr14:22550610-22550630
TRAC-168	chr14:22547511-22547531
TRAC-169	chr14:22550607-22550627
TRAC-170	chr14:22550657-22550677
TRAC-171	chr14:22550604-22550624
TRAC-172	chr14:22539132-22539152
TRAC-173	chr14:22550632-22550652
TRAC-174	chr14:22547571-22547591
TRAC-175	chr14:22547711-22547731
TRAC-176	chr14:22547666-22547686
TRAC-177	chr14:22547567-22547587
TRAC-178	chr14:22547624-22547644
TRAC-185	chr14:22547501-22547521
TRAC-213	chr14:22547519-22547539
TRAC-214	chr14:22547556-22547576
TRAC-215	chr14:22547486-22547506
TRAC-216	chr14:22547487-22547507
TRAC-217	chr14:22547493-22547513
TRAC-218	chr14:22547502-22547522

任意選択で、前記遺伝子修飾が、chr14:22547524-22547544、chr14:22547529-22547549、chr14:22547525-22547545、chr14:22547536-22547556、chr14:22547501-22547521、chr14:22547556-22547576、及びchr14:22547502-22547522から選択されるゲノム座標内にある、実施形態5～7のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0240】

実施形態9

前記細胞が、遺伝子修飾を含み、前記遺伝子修飾が、1つ以上のMHCクラスIタンパク質の発現を阻害する、実施形態1～8のいずれか1項に記載の操作された細胞。

【0241】

実施形態10

1 つ以上の M H C クラス I タンパク質の発現を阻害する前記遺伝子修飾が、B 2 M 配列における遺伝子修飾であり、前記遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標内にある、実施形態 9 に記載の操作された細胞。

【表 2 2 - 1】

ゲノム位置(hg38)	ガイド配列	配列番号	B2M-#
chr15:44711469-44711494	UGGCUGGGCACGCGUUUAAUAUAAG	412	B2M-1
chr15:44711472-44711497	CUGGGCACGCGUUUAAUAUAAGUGG	413	B2M-2
chr15:44711483-4471 1508	UUUAAUAUAAGUGGAGGCGUCGCGC	414	B2M-3
chr15:44711486-44711511	AAUAUAAGUGGAGGCGUCGCGCUGG	415	B2M-4
chr15:44711487-44711512	AUAUAAGUGGAGGCGUCGCGCUGGC	416	B2M-5
chr15:44711512-44711537	GGCAUUCUGAAGCUGACAGCAUU	417	B2M-6
chr15:44711513-44711538	GGCAUUCUGAAGCUGACAGCAUUC	418	B2M-7
chr15:44711534-44711559	AUUCGGGCCGAGAUGUCUCGCUCCG	419	B2M-8
chr15:44711568-44711593	CUGUGCUCGCGCUACUCUCUCUUUC	420	B2M-9
chr15:44711573-44711598	CUCGCGCUACUCUCUCUUUCUGGCC	421	B2M-10
chr15:44711576-44711601	GCGCUACUCUCUCUUUCUGGCCUGG	422	B2M-11
chr15:44711466-44711491	AUAUAAAACGCGUGCCCAGCCAAUC	423	B2M-12
chr15:44711522-44711547	UCUCGGCCCGAAUGCUGUCAGCUUC	424	B2M-13
chr15:44711544-44711569	GCUAAGGCCACGGAGCGAGACAUCU	425	B2M-14
chr15:44711559-44711584	AGUAGCGCGAGCACAGCUAAGGCCA	426	B2M-15
chr15:44711565-44711590	AGAGAGAGUAGCGCGAGCACAGCUA	427	B2M-16
chr15:44711599-44711624	GAGAGACUCACGCUUGAUAGCCUCC	428	B2M-17
chr15:44711611-44711636	GCGGGAGGGUAGGAGAGACUCACGC	429	B2M-18
chr15:44715412-44715437	UAUUCUCAGGUACUCCAAAGAUUC	430	B2M-19
chr15:44715440-44715465	UUUACUCACGUCAUCCAGCAGAGAA	431	B2M-20
chr15:44715473-44715498	CAAAUUUCCUGAAUUGCUAUGUGUC	432	B2M-21
chr15:44715474-44715499	AAAUUCCUGAAUUGCUAUGUGUCU	433	B2M-22
chr15:44715515-44715540	ACAUUGAAGUUGACUUACUGAAGAA	434	B2M-23
chr15:44715535-44715560	AAGAAUGGAGAGAGAAUUGAAAAAG	435	B2M-24
chr15:44715562-44715587	GAGCAUUCAGACUUGUCUUUCAGCA	436	B2M-25
chr15:44715567-44715592	UUCAGACUUGUCUUUCAGCAAGGAC	437	B2M-26
chr15:44715672-44715697	UUUGUCACAGCCCAAGAUAGUUAAG	438	B2M-27
chr15:44715673-44715698	UUGUCACAGCCCAAGAUAGUUAAGU	439	B2M-28
chr15:44715674-44715699	UGUCACAGCCCAAGAUAGUUAAGUG	440	B2M-29
chr15:44715410-44715435	AUCUUUGGAGUACCUGAGGAAUAUC	441	B2M-30
chr15:44715411-44715436	AAUCUUUGGAGUACCUGAGGAAUAU	442	B2M-31
chr15:44715419-44715444	UAAACCUGAAUCUUUGGAGUACCUG	443	B2M-32
chr15:44715430-44715455	GAUGACGUGAGUAAACCUGAAUCUU	444	B2M-33
chr15:44715457-44715482	GGAAAUUUGACUUUCCAUCUCUGC	445	B2M-34
chr15:44715483-44715508	AUGAAACCCAGACACAUAGCAAUUC	446	B2M-35

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2】

ゲノム位置(hg38)	ガイド配列	配列番号	B2M-#
chr15:44715511-44715536	UCAGUAAGUCAACUCAAUGUCGGA	447	B2M-36
chr15:44715515-44715540	UUCUUCAGUAAGUCAACUCAAUGU	448	B2M-37
chr15:44715629-44715654	CAGGCAUACUCAUCUUUUUCAGUGG	449	B2M-38
chr15:44715630-44715655	GCAGGCAUACUCAUCUUUUUCAGUG	450	B2M-39
chr15:44715631-44715656	GGCAGGCAUACUCAUCUUUUUCAGU	451	B2M-40
chr15:44715632-44715657	CGGCAGGCAUACUCAUCUUUUUCAG	452	B2M-41
chr15:44715653-44715678	GACAAAGUCACAUGGUUCACACGGC	453	B2M-42
chr15:44715657-44715682	CUGUGACAAAGUCACAUGGUUCACA	454	B2M-43
chr15:44715666-44715691	UAUCUUGGGCUGUGACAAAGUCACA	455	B2M-44
chr15:44715685-44715710	AAGACUUACCCACUUAACUAUCUU	456	B2M-45
chr15:44715686-44715711	UAAGACUUACCCACUUAACUAUCU	457	B2M-46
chr15:44716326-44716351	AGAUCGAGACAUGUAAGCAGCAUCA	458	B2M-47
chr15:44716329-44716354	UCGAGACAUGUAAGCAGCAUCAUGG	459	B2M-48
chr15:44716313-44716338	AUGUCUCGAUCUAUGAAAAAGACAG	460	B2M-49
chr15:44717599-44717624	UUUUCAGGUUUGAAGAUGCCGCAUU	461	B2M-50
chr15:44717604-44717629	AGGUUUGAAGAUGCCGCAUUUGGAU	462	B2M-51
chr15:44717681-44717706	CACUACACUUUAUGCACAAAAGU	463	B2M-52
chr15:44717682-44717707	ACUACACUUUAUGCACAAAAGUA	464	B2M-53
chr15:44717702-44717727	AUGUAGGGUUAUAUAUGUUAACA	465	B2M-54
chr15:44717764-44717789	GUCUCCAUGUUUGAUGUAUCUGAGC	466	B2M-55
chr15:44717776-44717801	GAUGUAUCUGAGCAGGUUGCUCAC	467	B2M-56
chr15:44717786-44717811	AGCAGGUUGCUCACAGGUAGCUCU	468	B2M-57
chr15:44717789-44717814	AGGUUGCUCACAGGUAGCUCUAGG	469	B2M-58
chr15:44717790-44717815	GGUUGCUCACAGGUAGCUCUAGGA	470	B2M-59
chr15:44717794-44717819	GCUCACAGGUAGCUCUAGGAGGGC	471	B2M-60
chr15:44717805-44717830	AGCUCUAGGAGGGCUGGCAACUUAG	472	B2M-61
chr15:44717808-44717833	UCUAGGAGGGCUGGCAACUUAGAGG	473	B2M-62
chr15:44717809-44717834	CUAGGAGGGCUGGCAACUUAGAGGU	474	B2M-63
chr15:44717810-44717835	UAGGAGGGCUGGCAACUUAGAGGUG	475	B2M-64
chr15:44717846-44717871	AUUCUCUUAUCCAACAACAACU	476	B2M-65
chr15:44717945-44717970	CAAUUUACAUAACUCUGCUUAGAAUU	477	B2M-66
chr15:44717946-44717971	AAUUUACAUAACUCUGCUUAGAAUUU	478	B2M-67
chr15:44717947-44717972	AUUUACAUAACUCUGCUUAGAAUUUG	479	B2M-68

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 3】

ゲノム位置(hg38)	ガイド配列	配列番号	B2M-#
chr15:44717948-44717973	UUUACAUACUCUGCUUAGAAUUUGG	480	B2M-69
chr15:44717973-44717998	GGGAAAAUUUAGAAAUAAUUGAC	481	B2M-70
chr15:44717981-44718006	UUAGAAAUAAUUGACAGGAUUUAU	482	B2M-71
chr15:44718056-44718081	UACUUCUUAUACAUUUGAUAAAGUA	483	B2M-72
chr15:44718061-44718086	CUUAUACAUUUGAUAAAGUAAGGCA	484	B2M-73
chr15:44718067-44718092	CAUUUGAUAAAGUAAGGCAUGGUUG	485	B2M-74
chr15:44718076-44718101	AAGUAAGGCAUGGUUGUGGUUAAUC	486	B2M-75
chr15:44717589-44717614	CUUCAAAACCUGAAAAGAAAAGAAAA	487	B2M-76
chr15:44717620-44717645	AUUUGGAAUUCAUCCAAUCCAAAUG	488	B2M-77
chr15:44717642-44717667	UAUUAAAAAGCAAGCAAGCAGAAUU	489	B2M-78
chr15:44717771-44717796	GCAACCUGCUCAGAUACAUCAAACA	490	B2M-79
chr15:44717800-44717825	UUGCCAGCCCUCCUAGAGCUACCUG	491	B2M-80
chr15:44717859-44717884	UCAAUCUGACCAAGAUGUUGAUGU	492	B2M-81
chr15:44717947-44717972	CAAAUUCUAAGCAGAGUAUGUAAAU	493	B2M-82
chr15:44718119-44718144	CAAGUUUUAUGAUUUUAUUUAACUUG	494	BM4-83

10

20

【0 2 4 2】

実施形態 1 1

1つ以上のMHCクラスIタンパク質の発現を阻害する前記遺伝子修飾が、HLA-A配列における遺伝子修飾であり、任意選択で、前記遺伝子修飾が、chr6:29942854-chr6:29942913及びchr6:29943518-chr6:29943619から選択されるゲノム座標、任意選択で、chr6:29942864-29942884、chr6:29942868-29942888、chr6:29942876-29942896、chr6:29942877-29942897、chr6:29942883-29942903、chr6:29943126-29943146、chr6:29943528-29943548、chr6:29943529-29943549、chr6:29943530-29943550、chr6:29943537-29943557、chr6:29943549-29943569、chr6:29943589-29943609、及びchr6:29944026-29944046から選択されるゲノム座標内にある、実施形態9に記載の操作された細胞。

30

【0 2 4 3】

実施形態 1 2

前記細胞が、遺伝子修飾を含み、前記遺伝子修飾が、1つ以上のMHCクラスIIタンパク質の発現を阻害する、上記実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞。

40

【0 2 4 4】

実施形態 1 3

1つ以上のMHCクラスIIタンパク質の発現を阻害する前記遺伝子修飾が、CIITA配列における遺伝子修飾であり、前記遺伝子修飾が、chr:16:10902171-10923242、任意選択で、chr16:10902662-10923285、chr16:10906542-10923285、またはchr16:10906542-10908121、任意選択で、chr16:10908132-10908152、chr16:10908131-10908151、chr16:10916456-1

50

0916476、chr16:10918504-10918524、chr16:10909022-10909042、chr16:10918512-10918532、chr16:10918511-10918531、chr16:10895742-10895762、chr16:10916362-10916382、chr16:10916455-10916475、chr16:10909172-10909192、chr16:10906492-10906512、chr16:10909006-10909026、chr16:10922478-10922498、chr16:10895747-10895767、chr16:10916348-10916368、chr16:10910186-10910206、chr16:10906481-10906501、chr16:10909007-10909027、chr16:10895410-10895430、及びchr16:10908130-10908150、任意選択で、chr16:10918504-10918524、chr16:10923218-10923238、chr16:10923219-10923239、chr16:10923221-10923241、chr16:10906486-10906506、chr16:10906485-10906505、chr16:10903873-10903893、chr16:10909172-10909192、chr16:10918423-10918443、chr16:10916362-10916382、chr16:10916450-10916470、chr16:10922153-10922173、chr16:10923222-10923242、chr16:10910176-10910196、chr16:10895742-10895762、chr16:10916449-10916469、chr16:10923214-10923234、chr16:10906492-10906512、及びchr16:10906487-1090650、または任意選択で、chr16:10916432-10916452、chr16:10922444-10922464、chr16:10907924-10907944、chr16:10906985-10907005、chr16:10908073-10908093、chr16:10907433-10907453、chr16:10907979-10907999、chr16:10907139-10907159、chr16:10922435-10922455、chr16:10907384-10907404、chr16:10907434-10907454、chr16:10907119-10907139、chr16:10907539-10907559、chr16:10907810-10907830、chr16:10907315-10907335、chr16:10916426-10916446、chr16:10909138-10909158、chr16:10908101-10908121、chr16:10907790-10907810、chr16:10907787-10907807、chr16:10907454-10907474、chr16:10895702-10895722、chr16:10902729-10902749、chr16:10918492-10918512、chr16:10907932-10907952、chr16:10907623-10907643、chr16:10907461-10907481、chr16:10902723-10902743、chr16:10907622-10907642、chr16:10922441-10922461、chr16:10902662-10902682、chr16:10915626-10915646、chr16:10915592-10915612、chr16:10907385-10907405、chr16:10907030-10907050、chr16:10907935-10907955、chr16:10906853-10906873、chr16:10906757-10906777、chr16:10907730-10907750、及びchr16:10895302-10895322から選択されるゲノム座標内にある、実施形態12に記載の操作された細胞。

【0245】

実施形態14

10

20

30

40

50

1つ以上のMHCクラスIIタンパク質の発現を阻害する前記遺伝子修飾が、任意選択で、CIIITAスプライス部位の少なくとも1つのヌクレオチドの修飾、任意選択で、

a) CIIITAスプライスドナー部位の少なくとも1つのヌクレオチドの修飾、及び／または

b) CIIITAスプライス部位境界ヌクレオチドの修飾を含む、実施形態12または13に記載の操作された細胞。

【0246】

実施形態15

前記細胞が、TIM3タンパク質の細胞表面発現が低減されている、実施形態1～14のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0247】

実施形態16

前記細胞が、TIM3タンパク質の細胞表面発現が低減されており、かつTRACタンパク質の細胞表面発現が低減されている、実施形態1～15のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0248】

実施形態17

TRBCタンパク質の細胞表面発現の低減をさらに含む、実施形態15または16に記載の操作された細胞。

【0249】

実施形態18

TIM3の細胞表面発現が検出レベル未満である、実施形態16または17のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0250】

実施形態19

TRAC及びTRBCのうちの少なくとも1つの細胞表面発現が、検出レベル未満である、実施形態16～18のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0251】

実施形態20

TIM3、TRAC、及びTRBCの各々の細胞表面発現が、検出レベル未満である、実施形態19に記載の操作された細胞。

【0252】

実施形態21

chr1:160830160-160862887のゲノム座標内に、ヒト2B4／CD244配列における遺伝子修飾を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0253】

実施形態22

2B4／CD244における前記遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標：

10

20

30

40

50

【表 2 3】

2B4番号	ゲノム座標(hg38)
2B4-1	chr1:160841611-160841631
2B4-2	chr1:160841865-160841885
2B4-3	chr1:160862624-160862644
2B4-4	chr1:160862671-160862691
2B4-5	chr1:160841622-160841642
2B4-6	chr1:160841819-160841839
2B4-7	chr1:160841823-160841843
2B4-8	chr1:160841717-160841737
2B4-9	chr1:160841859-160841879
2B4-10	chr1:160841806-160841826
2B4-11	chr1:160841834-160841854
2B4-12	chr1:160841780-160841800
2B4-13	chr1:160841713-160841733
2B4-14	chr1:160841631-160841651
2B4-15	chr1:160841704-160841724
2B4-16	chr1:160841584-160841604
2B4-17	chr1:160841679-160841699
2B4-18	chr1:160841874-160841894
2B4-19	chr1:160841750-160841770
2B4-20	chr1:160841577-160841597
2B4-21	chr1:160841459-160841479
2B4-22	chr1:160841466-160841486
2B4-23	chr1:160841461-160841481
2B4-24	chr1:160841460-160841480
2B4-25	chr1:160841360-160841380
2B4-26	chr1:160841304-160841324
2B4-27	chr1:160841195-160841215
2B4-28	chr1:160841305-160841325

10

20

30

40

50

任意選択で、2B4-1～2B4-5、2B4-1及び2B4-2、または2B4-3、2B4-4、2B4-10、及び2B4-17内にある、実施形態21に記載の操作された細胞。

【0254】

実施形態23

chr12:6772483-6778455のゲノム座標内に、ヒトLAG3配列における遺伝子修飾を含む、上記実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0255】

実施形態24

LAG3における前記遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標：

【表 2 4】

LAG3番号	ゲノム座標(hg38)
LAG3-1	chr12:6773938-6773958
LAG3-2	chr12:6774678-6774698
LAG3-3	chr12:6772894-6772914
LAG3-4	chr12:6774816-6774836
LAG3-5	chr12:6774742-6774762
LAG3-6	chr12:6775380-6775400
LAG3-7	chr12:6774727-6774747
LAG3-8	chr12:6774732-6774752
LAG3-9	chr12:6777435-6777455
LAG3-10	chr12:6774771-6774791
LAG3-11	chr12:6772909-6772929
LAG3-12	chr12:6774735-6774755
LAG3-13	chr12:6773783-6773803
LAG3-14	chr12:6775292-6775312
LAG3-15	chr12:6777433-6777453
LAG3-16	chr12:6778268-6778288
LAG3-17	chr12:6775444-6775464
LAG3-24	chr12:6777783-6777803
LAG3-26	chr12:6777784-6777804
LAG3-41	chr12:6778252-6778272
LAG3-59	chr12:6777325-6777345
LAG3-83	chr12:6777329-6777349

10

20

30

任意選択で、LAG3-1～LAG3-15、LAG3-1～LAG3-11、LAG3-1～LAG3-4、またはLAG3-1、LAG3-4、LAG3-5、及びLAG3-9によって標的とされるものから選択されるゲノム座標内にある、実施形態23に記載の操作された細胞。

【0256】

実施形態25

chr2:241849881-241858908のゲノム座標内に、ヒトPD-1配列における遺伝子修飾を含む、請求項1～24のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0257】

実施形態26

示されるゲノム座標における遺伝子修飾が、挿入、欠失、及び置換から選択される、実施形態21～25のいずれか1つに記載の操作された細胞。

40

【0258】

実施形態27

前記遺伝子修飾が、前記遺伝子修飾が存在する遺伝子の発現を阻害する、実施形態21～26のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0259】

実施形態28

前記遺伝子修飾が、インデルを含む、実施形態1～27のいずれか1つに記載の操作された細胞。

50

【0260】

実施形態29

前記遺伝子修飾が、異種コード配列の挿入を含む、実施形態1～28のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0261】

実施形態30

前記遺伝子修飾が、置換を含む、実施形態1～27及び29のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0262】

実施形態31

前記置換が、CからTへの置換またはAからGへの置換を含む、実施形態30に記載の操作された細胞。

【0263】

実施形態32 前記遺伝子修飾が、遺伝子修飾の前に、全長タンパク質のアミノ酸配列を有する前記全長タンパク質の翻訳を妨げる、前記核酸配列の変化をもたらす、実施形態1～31のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0264】

実施形態33

前記遺伝子修飾が、前記全長タンパク質のコード配列における未成熟終止コドンをもたらす前記核酸配列の変化をもたらす、実施形態32に記載の操作された細胞。

【0265】

実施形態34

前記遺伝子修飾が、前記ゲノム遺伝子座からのpre-mRNAのスプライシングの変化をもたらす核酸配列の変化をもたらす、実施形態32に記載の操作された細胞。

【0266】

実施形態35

遺伝子修飾を含む遺伝子からのタンパク質の細胞表面発現の低減をもたらす、実施形態1～34のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0267】

実施形態36

前記阻害が、遺伝子修飾を含む遺伝子によって調節されるタンパク質の細胞表面発現の低減をもたらす、実施形態1～34のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0268】

実施形態37

前記細胞が、前記操作された細胞の表面上で発現される標的化受容体をコードする外因性核酸を含む、実施形態1～36のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0269】

実施形態38

前記標的化受容体が、CARである、実施形態37に記載の操作された細胞。

【0270】

実施形態39

前記標的化受容体が、TCRである、実施形態37に記載の操作された細胞。

【0271】

実施形態40

前記標的化受容体が、WT1 TCRである、実施形態39に記載の操作された細胞。

【0272】

実施形態41 前記操作された細胞が、免疫細胞である、実施形態1～40のいずれか1つに記載の操作された細胞。

【0273】

実施形態42

10

20

30

40

50

前記操作された細胞が、単球、マクロファージ、肥満細胞、樹状細胞、または顆粒球である、実施形態 4 1 に記載の操作された細胞。

【0274】

実施形態 4 3

前記操作された細胞が、リンパ球である、実施形態 4 1 に記載の操作された細胞。

【0275】

実施形態 4 4

前記操作された細胞が、T 細胞である、実施形態 4 3 に記載の操作された細胞。

【0276】

実施形態 4 5

実施形態 1 ～ 4 4 のいずれか 1 つに記載の操作された細胞を含む、薬学的組成物。

【0277】

実施形態 4 6

実施形態 1 ～ 4 4 のいずれか 1 つに記載の操作された細胞を含む、細胞集団。

【0278】

実施形態 4 7 前記細胞集団を含む薬学的組成物であって、前記細胞集団が、実施形態 1 ～ 4 4 のいずれか 1 つに記載の操作された細胞を含む、前記薬学的組成物。

【0279】

実施形態 4 8

先行実施形態のいずれか 1 つに記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与する方法。

【0280】

実施形態 4 9

先行実施形態のいずれか 1 つに記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物を、養子細胞移植 (A C T) 療法として対象に投与する方法。

【0281】

実施形態 5 0

A C T 療法として使用するための、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の操作された細胞、細胞集団、または薬学的組成物。

【0282】

実施形態 5 1

a. 配列番号 1 ～ 1 5、1 8、1 9、2 2、2 3、2 6、2 9、3 2、4 2、4 4、5 6、5 8、5 9、6 2、6 3、6 6、6 9、7 5、8 2、8 6、8 7、及び 8 8 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

b. 配列番号 1 ～ 1 5、1 8、1 9、2 2、2 3、2 6、2 9、3 2、4 2、4 4、5 6、5 8、5 9、6 2、6 3、6 6、6 9、7 5、8 2、8 6、8 7、及び 8 8 の配列から選択されるヌクレオチド配列の少なくとも 1 7、1 8、1 9、または 2 0 個の連続ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むガイド配列、

c. 配列番号 1 ～ 1 5、1 8、1 9、2 2、2 3、2 6、2 9、3 2、4 2、4 4、5 6、5 8、5 9、6 2、6 3、6 6、6 9、7 5、8 2、8 6、8 7、及び 8 8 から選択されるヌクレオチド配列と少なくとも 9 5 % 同一または少なくとも 9 0 % 同一のヌクレオチド配列を含むガイド配列、

d. 配列番号 1 ～ 4、6 ～ 1 5、1 8、1 9、2 2、2 9、4 2、4 4、5 8、6 2、6 9、8 2、8 6、及び 8 8 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

e. 配列番号 1 ～ 5、7、8、1 2 ～ 1 5、2 3、2 6、3 2、5 6、5 9、6 3、6 6、7 5、及び 8 7 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

f. 配列番号 2、4、1 5、2 3、5 6、5 9、6 3、7 5、及び 8 7 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

g. 配列番号 1 ～ 4 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

h. 配列番号 2、4、及び 1 5 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、

10

20

30

40

50

- i. 配列番号 2、4、15、63、及び 87 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、
- j. 配列番号 2 及び 15 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、
- k. 配列番号 63 及び 87 から選択されるヌクレオチド配列を含むガイド配列、及び
- l. 配列番号 15 のヌクレオチド配列を含むガイド配列、から選択されるヌクレオチド配列を含む TIM3 配列に特異的にハイブリダイズする、TIM3 ガイド RNA。

【0283】

実施形態 52

RNA ガイド DNA 結合剤を、配列番号 1～15、18、19、22、23、26、29、32、42、44、56、58、59、62、63、66、69、75、82、86、87、及び 88 によって標的とされるものから選択されるゲノム座標、任意選択で、配列番号 1～4、6～15、18、19、22、29、42、44、58、62、69、82、86、及び 88 によって標的とされるゲノム座標から選択される、任意選択で、配列番号 1～5、7、8、12～15、23、26、32、56、59、63、66、75、及び 87 によって標的とされるゲノム座標から選択される、任意選択で、2、4、15、23、56、59、63、75、及び 87 によって標的とされるゲノム座標から選択される、任意選択で、配列番号 1～4 によって標的とされるゲノム座標から選択される、任意選択で、配列番号 2、4、及び 15 によって標的とされるゲノム座標から選択される、任意選択で、配列番号 2、4、15、63、及び 87 によって標的とされるゲノム座標から選択される、任意選択で、配列番号 2 及び 15 によって標的とされるゲノム座標から選択されるゲノム座標、任意選択で、配列番号 63 及び 87 によって標的とされるゲノム座標、または任意選択で、配列番号 15 によって標的とされるゲノム座標内の染色体位置に指向するガイド配列を含む、TIM3 ガイド RNA。

【0284】

実施形態 53

前記ガイド RNA が、デュアルガイド RNA (dgRNA) である、実施形態 51 または 52 のガイド RNA。

【0285】

実施形態 54

前記ガイド RNA が、単一ガイド RNA (sgRNA) である、実施形態 51 または 52 のガイド RNA。

【0286】

実施形態 55

前記ガイド配列に対して 3' に配列番号 400 のヌクレオチド配列をさらに含み、前記ガイド RNA が、5' 末端修飾または 3' 末端修飾を含む、実施形態 54 に記載のガイド RNA。

【0287】

実施形態 56

5' 末端修飾または 3' 末端修飾及び gRNA の保存部分をさらに含み、前記保存部分が、
A. 短縮されたヘアピン 1 領域、または置換されかつ任意選択で短縮されたヘアピン 1 領域であって、

1. 以下のヌクレオチド対：H1-1 及び H1-12、H1-2 及び H1-11、H1-3 及び H1-10、または H1-4 及び H1-9 のうちの少なくとも 1 つが、前記置換されかつ任意選択で短縮されたヘアピン 1 においてワトソン-クリック対形成ヌクレオチドで置換されており、前記ヘアピン 1 領域が、任意選択で、

a. H1-5～H1-8 のうちのいずれか 1 つもしくは 2 つ、

b. 以下のヌクレオチド対：H1-1 及び H1-12、H1-2 及び H1-11、H1-3 及び H1-10、ならびに H1-4 及び H1-9 のうちの 1 つ、2 つ、もしくは 3 つ、または

c. ヘアピン 1 領域の 1～8 個のヌクレオチドを欠いているか、あるいは

10

20

30

40

50

2. 前記短縮されたヘアピン1領域が、4～8個のヌクレオチド、好ましくは4～6個のヌクレオチドを欠いており、

a. 位置H1-1、H1-2、もしくはH1-3のうちの1つ以上が、配列番号400に対して欠失もしくは置換されているか、または

b. 位置H1-6～H1-10のうちの1つ以上が、配列番号400に対して置換されているか、または

3. 前記短縮されたヘアピン1領域が、5～10個のヌクレオチド、好ましくは5～6個のヌクレオチドを欠いており、位置N18、H1-12、もしくはnのうちの1つ以上が、配列番号400に対して置換されている、前記ヘアピン1領域、あるいは

B. 短縮された上部ステム領域であって、前記短縮された上部ステム領域が、1～6個のヌクレオチドを欠いており、前記短縮された上部ステム領域の6、7、8、9、10、または11個のヌクレオチドが、配列番号400に対して4個以下の置換を含む、前記短縮された上部ステム領域、あるいは

C. LS6、LS7、US3、US10、B3、N7、N15、N17、H2-2、及びH2-14のうちのいずれか1つ以上における配列番号400に対する置換であって、置換基ヌクレオチドが、アデニンが後に続くピリミジンでもなく、ピリミジンが前に存在するアデニンでもない、前記置換、あるいは

D. 上部ステム領域であって、前記上部ステムの修飾が、配列番号400に対して前記上部ステム領域におけるUS1～US12のうちのいずれか1つ以上の修飾を含む、前記上部ステム領域のうちの1つ以上を含む、実施形態54に記載のガイドRNA。

【0288】

実施形態57

前記ガイド配列に対して3'にGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG（配列番号200）のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態54に記載のガイドRNA。

【0289】

実施形態58

前記ガイド配列に対して3'もGUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGGCACCGAGUCGGUGC（配列番号201）、任意選択で前記ガイド配列に対して3'にGUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGGCACCGAGUCGGUGCUUUU（配列番号202）のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態54のガイドRNA。

【0290】

実施形態59

前記ガイドRNAが、mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUU
UAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUA
AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmU
mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU
*mU（配列番号300）のパターンに従って修飾され、「N」が、任意の天然または非天然のヌクレオチドであり得、mが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドであり、*が、ヌクレオチド残基間のホスホロチオエート連結であり、前記Nが、集合的に、任意の先行実施形態のガイド配列のヌクレオチド配列である、実施形態57または58に記載のガイドRNA。

【0291】

実施形態60

各Nが、独立して、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、前記ガイド配列が、TIM3遺伝子に対してCas9を標的とする、実施形態59に記載のガイドRNA。

【0292】

実施形態61

前記ガイドRNAが、修飾を含む、実施形態53～60のいずれか1つに記載のガイドRNA

N A。

【0293】

実施形態62

前記修飾が、2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドまたは2'-F修飾ヌクレオチドを含む、実施形態61に記載のガイドRNA。

【0294】

実施形態63

前記修飾が、ヌクレオチド間にホスホロチオエート(PS)結合を含む、実施形態61または62に記載のガイドRNA。

【0295】

実施形態64

前記ガイドRNAが、sgRNAであり、前記修飾が、ガイドRNAの5'末端での5個のヌクレオチドのうちの1つ以上における修飾を含む、実施形態61~63のいずれか1つに記載のガイドRNA。

【0296】

実施形態65

前記ガイドRNAが、sgRNAであり、前記修飾が、ガイドRNAの3'末端での5個のヌクレオチドのうちの1つ以上における修飾を含む、実施形態61~64のいずれか1つに記載のガイドRNA。

【0297】

実施形態66

前記ガイドRNAが、sgRNAであり、前記修飾が、ガイドRNAの5'末端での4個のヌクレオチドの各々の間にPS結合を含む、実施形態61~65のいずれか1つに記載のガイドRNA。

【0298】

実施形態67

前記ガイドRNAが、sgRNAであり、前記修飾が、ガイドRNAの3'末端での4個のヌクレオチドの各々の間にPS結合を含む、実施形態61~66のいずれか1つに記載のガイドRNA。

【0299】

実施形態68

前記ガイドRNAが、sgRNAであり、前記修飾が、ガイドRNAの5'末端での最初の3個のヌクレオチドの各々に2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む、実施形態61~67のいずれか1つに記載のガイドRNA。

【0300】

実施形態69

前記ガイドRNAが、sgRNAであり、前記修飾が、ガイドRNAの3'末端での最後の3個のヌクレオチドの各々に2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む、実施形態61~68のいずれか1つに記載のガイドRNA。

【0301】

実施形態70

RNAガイドDNA結合剤が、ポリペプチドRNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤ポリペプチドをコードする核酸であり、任意選択で、前記RNAガイドDNA結合剤が、Cas9ヌクレアーゼである、実施形態53~69のいずれか1つに記載のガイドRNA、及びRNAガイドDNA結合剤を含む組成物。

【0302】

実施形態71

、前記RNAガイドDNA結合剤が、DNA配列内で修飾を行うことができるポリペプチドである、実施形態70に記載の組成物。

【0303】

10

20

30

40

50

実施形態 7 2

前記 RNA ガイド DNA 結合剤が、*S. pyogenes* Cas9 ヌクレアーゼである、実施形態 7 1 に記載の組成物。

【0304】

実施形態 7 3

前記 ヌクレアーゼが、切断、ニッカーゼ、及び不活性型 ヌクレアーゼの群から選択される、実施形態 7 0 ～ 7 2 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【0305】

実施形態 7 4

前記 RNA ガイド DNA 結合剤をコードする核酸が、

10

a. DNA コード配列、

b. オープンリーディングフレーム (ORF) を有する mRNA、

c. 発現ベクターにおけるコード配列、

d. ウイルスベクターにおけるコード配列から選択される、実施形態 7 0 に記載の組成物。

【0306】

実施形態 7 5

以下から選択されるゲノム座標に特異的にハイブリダイズするガイド RNA をさらに含む、。

20

30

40

50

【表 2 5 - 1】

TRAC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRAC-90	chr14:22547524-22547544
TRAC-91	chr14:22550581-22550601
TRAC-92	chr14:22550608-22550628
TRAC-93	chr14:22550611-22550631
TRAC-94	chr14:22550622-22550642
TRAC-95	chr14:22547529-22547549
TRAC-96	chr14:22547512-22547532
TRAC-97	chr14:22547525-22547545
TRAC-98	chr14:22547536-22547556
TRAC-99	chr14:22547575-22547595
TRAC-100	chr14:22547640-22547660
TRAC-101	chr14:22547647-22547667
TRAC-102	chr14:22547777-22547797
TRAC-103	chr14:22549638-22549658
TRAC-104	chr14:22549646-22549666
TRAC-105	chr14:22550600-22550620
TRAC-106	chr14:22550605-22550625
TRAC-107	chr14:22550625-22550645
TRAC-108	chr14:22539116-22539136
TRAC-109	chr14:22539120-22539140
TRAC-110	chr14:22547518-22547538
TRAC-111	chr14:22539082-22539102
TRAC-112	chr14:22539061-22539081
TRAC-113	chr14:22539097-22539117
TRAC-114	chr14:22547697-22547717
TRAC-115	chr14:22550571-22550591
TRAC-116	chr14:22550631-22550651
TRAC-117	chr14:22550658-22550678
TRAC-118	chr14:22547712-22547732
TRAC-119	chr14:22550636-22550656
TRAC-120	chr14:22550636-22550656
TRAC-121	chr14:22550582-22550602
TRAC-122	chr14:22550606-22550626
TRAC-123	chr14:22550609-22550629
TRAC-124	chr14:22547691-22547711
TRAC-125	chr14:22547576-22547596
TRAC-126	chr14:22549648-22549668

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 2】

TRAC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRAC-127	chr14:22549660-22549680
TRAC-128	chr14:22547716-22547736
TRAC-129	chr14:22547514-22547534
TRAC-130	chr14:22550662-22550682
TRAC-131	chr14:22550593-22550613
TRAC-132	chr14:22550612-22550632
TRAC-133	chr14:22547521-22547541
TRAC-134	chr14:22547540-22547560
TRAC-135	chr14:22539121-22539141
TRAC-136	chr14:22547632-22547652
TRAC-137	chr14:22547674-22547694
TRAC-138	chr14:22549643-22549663
TRAC-139	chr14:22547655-22547675
TRAC-140	chr14:22547667-22547687
TRAC-141	chr14:22539085-22539105
TRAC-142	chr14:22549634-22549654
TRAC-143	chr14:22539064-22539084
TRAC-144	chr14:22547639-22547659
TRAC-145	chr14:22547731-22547751
TRAC-146	chr14:22547734-22547754
TRAC-147	chr14:22547591-22547611
TRAC-148	chr14:22547657-22547677
TRAC-149	chr14:22547519-22547539
TRAC-150	chr14:22549674-22549694
TRAC-151	chr14:22547678-22547698
TRAC-152	chr14:22539087-22539107
TRAC-153	chr14:22547595-22547615
TRAC-154	chr14:22547633-22547653

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 3】

TRAC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRAC-155	chr14:22547732-22547752
TRAC-156	chr14:22547656-22547676
TRAC-157	chr14:22539086-22539106
TRAC-158	chr14:22547491-22547511
TRAC-159	chr14:22547618-22547638
TRAC-160	chr14:22549644-22549664
TRAC-161	chr14:22547522-22547542
TRAC-162	chr14:22539089-22539109
TRAC-163	chr14:22539062-22539082
TRAC-164	chr14:22547597-22547617
TRAC-165	chr14:22547677-22547697
TRAC-166	chr14:22549645-22549665
TRAC-167	chr14:22550610-22550630
TRAC-168	chr14:22547511-22547531
TRAC-169	chr14:22550607-22550627
TRAC-170	chr14:22550657-22550677
TRAC-171	chr14:22550604-22550624
TRAC-172	chr14:22539132-22539152
TRAC-173	chr14:22550632-22550652
TRAC-174	chr14:22547571-22547591
TRAC-175	chr14:22547711-22547731
TRAC-176	chr14:22547666-22547686
TRAC-177	chr14:22547567-22547587
TRAC-178	chr14:22547624-22547644
TRAC-185	chr14:22547501-22547521
TRAC-213	chr14:22547519-22547539
TRAC-214	chr14:22547556-22547576
TRAC-215	chr14:22547486-22547506
TRAC-216	chr14:22547487-22547507
TRAC-217	chr14:22547493-22547513
TRAC-218	chr14:22547502-22547522

10

20

30

40

任意選択で、前記遺伝子修飾は、chr14:22547524-22547544、chr14:22547529-22547549、chr14:22547525-22547545、chr14:22547536-22547556、chr14:22547501-22547521、chr14:22547556-22547576、及びchr14:22547502-22547522から選択されるゲノム座標内にある、実施形態70～74のいずれか1つに記載の組成物。

【0307】

実施形態76

以下から選択されるゲノム座標に特異的にハイブリダイズするガイドRNAをさらに含む、実施形態70～75のいずれか1つに記載の組成物。

50

【表 2 6 - 1】

TRBC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRBC-1	chr7:142791996-142792016
TRBC-2	chr7:142792047-142792067
TRBC-3	chr7:142792008-142792028
TRBC-4	chr7:142791931-142791951
TRBC-5	chr7:142791930-142791950
TRBC-6	chr7:142791748-142791768
TRBC-7	chr7:142791720-142791740
TRBC-8	chr7:142792041-142792061
TRBC-9	chr7:142802114-142802134
TRBC-10	chr7:142792009-142792029
TRBC-11	chr7:142792697-142792717
TRBC-12	chr7:142791963-142791983
TRBC-13	chr7:142791976-142791996
TRBC-14	chr7:142791974-142791994
TRBC-15	chr7:142791970-142791990
TRBC-16	chr7:142791948-142791968
TRBC-17	chr7:142791913-142791933
TRBC-18	chr7:142791961-142791981
TRBC-19	chr7:142792068-142792088
TRBC-20	chr7:142791975-142791995
TRBC-21	chr7:142791773-142791793
TRBC-22	chr7:142791919-142791939
TRBC-23	chr7:142791834-142791854
TRBC-24	chr7:142791878-142791898
TRBC-25	chr7:142802141-142802161
TRBC-26	chr7:142791844-142791864
TRBC-27	chr7:142801154-142801174
TRBC-28	chr7:142791961-142791981
TRBC-29	chr7:142792001-142792021
TRBC-30	chr7:142791979-142791999
TRBC-31	chr7:142792041-142792061
TRBC-32	chr7:142792003-142792023
TRBC-33	chr7:142791984-142792004
TRBC-34	chr7:142792002-142792022
TRBC-35	chr7:142791966-142791986
TRBC-36	chr7:142792007-142792027
TRBC-37	chr7:142791993-142792013

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 2】

TRBC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRBC-38	chr7:142791902-142791922
TRBC-39	chr7:142791724-142791744
TRBC-40	chr7:142791973-142791993
TRBC-41	chr7:142791920-142791940
TRBC-42	chr7:142791994-142792014
TRBC-43	chr7:142791887-142791907
TRBC-44	chr7:142791907-142791927
TRBC-45	chr7:142791952-142791972
TRBC-46	chr7:142791721-142791741
TRBC-47	chr7:142792718-142792738
TRBC-48	chr7:142791729-142791749
TRBC-49	chr7:142791911-142791931
TRBC-50	chr7:142791867-142791887
TRBC-51	chr7:142791899-142791919
TRBC-52	chr7:142791727-142791747
TRBC-53	chr7:142791949-142791969
TRBC-54	chr7:142791933-142791953
TRBC-55	chr7:142791932-142791952
TRBC-56	chr7:142792057-142792077
TRBC-57	chr7:142791940-142791960
TRBC-58	chr7:142791747-142791767
TRBC-59	chr7:142791881-142791901
TRBC-60	chr7:142791779-142791799
TRBC-61	chr7:142792054-142792074
TRBC-62	chr7:142792069-142792089
TRBC-63	chr7:142792712-142792732
TRBC-64	chr7:142791729-142791749
TRBC-65	chr7:142791821-142791841
TRBC-66	chr7:142792052-142792072
TRBC-67	chr7:142791916-142791936
TRBC-68	chr7:142791899-142791919
TRBC-69	chr7:142791772-142791792

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 3】

TRBC番号:	ゲノム座標(hg38)
TRBC-70	chr7:142792714-142792734
TRBC-71	chr7:142792042-142792062
TRBC-72	chr7:142791962-142791982
TRBC-73	chr7:142791988-142792008
TRBC-74	chr7:142791982-142792002
TRBC-75	chr7:142792049-142792069
TRBC-76	chr7:142791839-142791859
TRBC-77	chr7:142791893-142791913
TRBC-78	chr7:142791945-142791965
TRBC-79	chr7:142791964-142791984
TRBC-80	chr7:142791757-142791777
TRBC-81	chr7:142792048-142792068
TRBC-82	chr7:142791774-142791794
TRBC-83	chr7:142792048-142792068
TRBC-84	chr7:142791830-142791850
TRBC-85	chr7:142791909-142791929
TRBC-86	chr7:142791912-142791932
TRBC-87	chr7:142791766-142791786
TRBC-88	chr7:142791880-142791900
TRBC-89	chr7:142791919-142791939

10

20

【0308】

実施形態 7 7

30

chr:16:10902171-10923242、任意選択で、chr16:10902662-chr16:10923285、chr16:10906542-10923285、またはchr16:10906542-10908121、任意選択で、chr16:10908132-10908152、chr16:10908131-10908151、chr16:10916456-10916476、chr16:10918504-10918524、chr16:10909022-10909042、chr16:10918512-10918532、chr16:10918511-10918531、chr16:10895742-10895762、chr16:10916362-10916382、chr16:10916455-10916475、chr16:10909172-10909192、chr16:10906492-10906512、chr16:10909006-10909026、chr16:10922478-10922498、chr16:10895747-10895767、chr16:10916348-10916368、chr16:10910186-10910206、chr16:10906481-10906501、chr16:10909007-10909027、chr16:10895410-10895430、及びchr16:10908130-10908150、任意選択で、chr16:10918504-10918524、chr16:10923218-10923238、chr16:10923219-10923239、chr16:10923221-10923241、chr16:10906486-10906506、chr16:10906485-10906505、chr16:10903873-10903893、chr

40

50

r 1 6 : 1 0 9 0 9 1 7 2 - 1 0 9 0 9 1 9 2、c h r 1 6 : 1 0 9 1 8 4 2 3 - 1 0 9 1 8 4 4 3、c h r 1 6 : 1 0 9 1 6 3 6 2 - 1 0 9 1 6 3 8 2、c h r 1 6 : 1 0 9 1 6 4 5 0 - 1 0 9 1 6 4 7 0、c h r 1 6 : 1 0 9 2 2 1 5 3 - 1 0 9 2 2 1 7 3、c h r 1 6 : 1 0 9 2 3 2 2 2 - 1 0 9 2 3 2 4 2、c h r 1 6 : 1 0 9 1 0 1 7 6 - 1 0 9 1 0 1 9 6、c h r 1 6 : 1 0 8 9 5 7 4 2 - 1 0 8 9 5 7 6 2、c h r 1 6 : 1 0 9 1 6 4 4 9 - 1 0 9 1 6 4 6 9、c h r 1 6 : 1 0 9 2 3 2 1 4 - 1 0 9 2 3 2 3 4、c h r 1 6 : 1 0 9 0 6 4 9 2 - 1 0 9 0 6 5 1 2、及び c h r 1 6 : 1 0 9 0 6 4 8 7 - 1 0 9 0 6 5 0、または任意選択で、c h r 1 6 : 1 0 9 1 6 4 3 2 - 1 0 9 1 6 4 5 2、c h r 1 6 : 1 0 9 2 2 4 4 4 - 1 0 9 2 2 4 6 4、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 9 2 4 - 1 0 9 0 7 9 4 4、c h r 1 6 : 1 0 9 0 6 9 8 5 - 1 0 9 0 7 0 0 5、c h r 1 6 : 1 0 9 0 8 0 7 3 - 1 0 9 0 8 0 9 3、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 4 3 3 - 1 0 9 0 7 4 5 3、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 9 7 9 - 1 0 9 0 7 9 9 9、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 1 3 9 - 1 0 9 0 7 1 5 9、c h r 1 6 : 1 0 9 2 2 4 3 5 - 1 0 9 2 2 4 5 5、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 3 8 4 - 1 0 9 0 7 4 0 4、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 4 3 4 - 1 0 9 0 7 4 5 4、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 1 1 9 - 1 0 9 0 7 1 3 9、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 5 3 9 - 1 0 9 0 7 5 5 9、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 8 1 0 - 1 0 9 0 7 8 3 0、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 3 1 5 - 1 0 9 0 7 3 3 5、c h r 1 6 : 1 0 9 1 6 4 2 6 - 1 0 9 1 6 4 4 6、c h r 1 6 : 1 0 9 0 9 1 3 8 - 1 0 9 0 9 1 5 8、c h r 1 6 : 1 0 9 0 8 1 0 1 - 1 0 9 0 8 1 2 1、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 7 9 0 - 1 0 9 0 7 8 1 0、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 7 8 7 - 1 0 9 0 7 8 0 7、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 4 5 4 - 1 0 9 0 7 4 7 4、c h r 1 6 : 1 0 8 9 5 7 0 2 - 1 0 8 9 5 7 2 2、c h r 1 6 : 1 0 9 0 2 7 2 9 - 1 0 9 0 2 7 4 9、c h r 1 6 : 1 0 9 1 8 4 9 2 - 1 0 9 1 8 5 1 2、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 9 3 2 - 1 0 9 0 7 9 5 2、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 6 2 3 - 1 0 9 0 7 6 4 3、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 4 6 1 - 1 0 9 0 7 4 8 1、c h r 1 6 : 1 0 9 0 2 7 2 3 - 1 0 9 0 2 7 4 3、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 6 2 2 - 1 0 9 0 7 6 4 2、c h r 1 6 : 1 0 9 2 2 4 4 1 - 1 0 9 2 2 4 6 1、c h r 1 6 : 1 0 9 0 2 6 6 2 - 1 0 9 0 2 6 8 2、c h r 1 6 : 1 0 9 1 5 6 2 6 - 1 0 9 1 5 6 4 6、c h r 1 6 : 1 0 9 1 5 5 9 2 - 1 0 9 1 5 6 1 2、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 3 8 5 - 1 0 9 0 7 4 0 5、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 0 3 0 - 1 0 9 0 7 0 5 0、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 9 3 5 - 1 0 9 0 7 9 5 5、c h r 1 6 : 1 0 9 0 6 8 5 3 - 1 0 9 0 6 8 7 3、c h r 1 6 : 1 0 9 0 6 7 5 7 - 1 0 9 0 6 7 7 7、c h r 1 6 : 1 0 9 0 7 7 3 0 - 1 0 9 0 7 7 5 0、及び c h r 1 6 : 1 0 8 9 5 3 0 2 - 1 0 8 9 5 3 2 2 から選択されるゲノム座標に特異的にハイブリダイズするガイドRNAをさらに含む、実施形態70～76のいずれか1つに記載の組成物。

【0309】

実施形態78

c h r 6 : 2 9 9 4 2 8 5 4 - 2 9 9 4 2 9 1 3 及び c h r 6 : 2 9 9 4 3 5 1 8 - 2 9 9 4 3 6 1 9 から選択されるゲノム座標、任意選択で、c h r 6 : 2 9 9 4 2 8 6 4 - 2 9 9 4 2 8 8 4、c h r 6 : 2 9 9 4 2 8 6 8 - 2 9 9 4 2 8 8 8、c h r 6 : 2 9 9 4 2 8 7 6 - 2 9 9 4 2 8 9 6、c h r 6 : 2 9 9 4 2 8 7 7 - 2 9 9 4 2 8 9 7、c h r 6 : 2 9 9 4 2 8 8 3 - 2 9 9 4 2 9 0 3、c h r 6 : 2 9 9 4 3 1 2 6 - 2 9 9 4 3 1 4 6、c h r 6 : 2 9 9 4 3 5 2 8 - 2 9 9 4 3 5 4 8、c h r 6 : 2 9 9 4 3 5 2 9 - 2 9 9 4 3 5 4 9、c h r 6 : 2 9 9 4 3 5 3 0 - 2 9 9 4 3 5 5 0、c h r 6 : 2 9 9 4 3 5 3 7 - 2 9 9 4 3 5 5 7、c h r 6 : 2 9 9 4 3 5 4 9 - 2 9 9 4 3 5 6 9、c h r 6 : 2 9 9 4 3 5 8 9 - 2 9 9 4 3 6 0 9、及び c h r 6 : 2 9 9 4 4 0 2 6 - 2 9 9 4 4 0 4 6 から選択されるゲノム座標に特異的にハイブリダイズするガイドRNAをさらに含む、実施形態70～77のいずれか1つに記載の組成物。

【0310】

実施形態79

前記組成物が、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、実施形態51～69のいずれか1つに記載のガイドRNA、または実施形態70～78のいずれか1つのいずれか1つに

記載の組成物。

【0311】

実施形態80

前記組成物が、非発熱性である、実施形態79に記載のガイドまたは組成物。

【0312】

実施形態81

前記ガイドRNAが、脂質ナノ粒子(LNP)と会合している、実施形態51～69のいずれか1つに記載のガイドRNAまたは実施形態70～80のいずれか1つに記載の組成物。

【0313】

実施形態82

細胞を、実施形態51～81のいずれか1つに記載のガイドRNAまたは組成物と接触させることを含む、前記細胞内のTIM3配列において遺伝子修飾を行う方法。

【0314】

実施形態83

TCR配列においてTCR遺伝子の発現を阻害するための遺伝子修飾を行うことをさらに含む、実施形態82に記載の方法。

【0315】

実施形態84

免疫療法のための細胞集団を調製する方法であって、

a. TIM3ガイドRNAまたは実施形態51～81のいずれか1つに記載の組成物を有する集団内の細胞中のTIM3配列において遺伝子修飾を行うことと、

b. 前記集団の前記細胞中のTCR配列において遺伝子修飾を行い、前記集団内の前記細胞の前記表面上の前記TCRタンパク質の発現を低減することと、

c. 培養物中の前記細胞集団を増殖することと、を含む、前記方法。

【0316】

実施形態85

前記細胞の前記表面上の前記TCRタンパク質の発現が、前記集団内の前記細胞の少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、または95%の検出レベル未満に低減される、実施形態84に記載の方法。

【0317】

実施形態86

前記集団の前記細胞におけるTCR配列の前記遺伝子修飾が、2つ以上のTCR配列の修飾を含む、実施形態84または85に記載の方法。

【0318】

実施形態87

2つ以上の前記TCR配列が、TRAC及びTRBCを含む、実施形態86の方法。

【0319】

実施形態88

任意選択で、TRAC遺伝子座で、前記操作された細胞、例えば、TCRまたはCARの前記表面上に発現される標的化受容体をコードする外因性核酸の挿入を含む、実施形態84～87のいずれかに記載の方法。

【0320】

実施形態89

前記細胞を、前記TIM3ガイドRNAを含むLNP組成物と接触させることをさらに含む、実施形態84～88のいずれか1つに記載の方法。

【0321】

実施形態90

前記細胞を、ガイドRNAを含む第2のLNP組成物と接触させることを含む、実施形態

10

20

30

40

50

89に記載の方法。

【0322】

実施形態91

実施形態82～90のいずれか1つに記載の方法によって作製される細胞集団。

【0323】

実施形態92

細胞集団が、エキスピボで改変される、実施形態91に記載の細胞集団。

【0324】

実施形態93

実施形態91または92に記載の細胞集団を含む、薬学的組成物。

10

【0325】

実施形態94

実施形態91もしくは92に記載の細胞集団、または実施形態93に記載の薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与する方法。

【0326】

実施形態95

実施形態91もしくは92に記載の細胞集団、または実施形態93に記載の薬学的組成物を、養子細胞移植（ACT）療法として対象に投与する方法。

【0327】

実施形態96

ACT療法として使用するための、実施形態91もしくは92に記載の細胞集団、または実施形態91に記載の薬学的組成物。

20

【0328】

実施形態97

前記集団内の細胞の少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、または95%が、前記内因性TIM3配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、TIM3遺伝子の遺伝子修飾を含む細胞集団。

【0329】

実施形態98

前記遺伝子修飾が、実施形態1～4のいずれかで定義されるとおりである、実施形態97に記載の細胞集団。

30

【0330】

実施形態99

TIM3の発現が、例えば、前記TIM3遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、もしくは95%、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態97または98に記載の細胞集団。

【0331】

実施形態100

細胞の少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%が、前記内因性TCR遺伝子配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、TCR遺伝子の遺伝子修飾を含む、実施形態97～99のいずれか1つに記載の細胞集団。

40

【0332】

実施形態101

前記遺伝子修飾が、実施形態5～8のいずれかで定義されるとおりである、実施形態100に記載の細胞集団。

【0333】

50

実施形態 102

T C R の発現が、例えば、前記 T C R 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも 40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、好ましくは少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態 100 または 101 に記載の細胞集団。

【0334】**実施形態 103**

前記集団が、少なくとも 10^3 、 10^4 、 10^5 または 10^6 個の細胞、好ましくは 10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、または 10^8 個の細胞を含む、実施形態 97 ~ 102 のいずれかに記載の細胞集団。

10

【0335】**実施形態 104**

前記集団内の細胞の少なくとも 70 % が、前記内因性 T I M 3 配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、実施形態 97 ~ 103 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

【0336】**実施形態 105**

前記集団内の細胞の少なくとも 80 % が、前記内因性 T I M 3 配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、実施形態 97 ~ 104 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

20

【0337】**実施形態 106**

前記集団内の細胞の少なくとも 90 % が、前記内因性 T I M 3 配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、実施形態 97 ~ 105 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

【0338】**実施形態 107**

前記集団内の細胞の少なくとも 95 % が、前記内因性 T I M 3 配列における挿入、欠失、及び置換から選択される修飾を含む、実施形態 97 ~ 106 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

30

【0339】**実施形態 108**

T I M 3 の発現が、例えば、前記 T I M 3 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも 70 %、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態 97 ~ 107 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

【0340】**実施形態 109**

T I M 3 の発現が、例えば、前記 T I M 3 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも 80 %、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態 97 ~ 108 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

40

【0341】**実施形態 110**

T I M 3 の発現が、例えば、前記 T I M 3 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも 90 %、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態 97 ~ 109 のいずれか 1 つに記載の細胞集団。

【0342】**実施形態 111**

T I M 3 の発現が、例えば、前記 T I M 3 遺伝子が修飾されていない、好適な対照と比較して、少なくとも 95 %、またはアッセイの検出限界未満まで減少する、実施形態 97 ~

50

110のいずれか1つに記載の細胞集団。

【0343】

実施形態112

実施形態97～111のいずれか1つに記載の細胞集団を含む、薬学的組成物。

【0344】

実施形態113

ACT療法として使用するための、実施形態97～111のいずれかに記載の細胞集団または実施形態112に記載の薬学的組成物。

【0345】

実施形態114

前記遺伝子修飾が、chr5:157106867-157106887のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0346】

実施形態115

前記遺伝子修飾が、chr5:157106862-157106882のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0347】

実施形態116

前記遺伝子修飾が、chr5:157106803-157106823のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0348】

実施形態117

前記遺伝子修飾が、chr5:157106850-157106870のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0349】

実施形態118

前記遺伝子修飾が、chr5:157104726-157104746のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0350】

実施形態119

前記遺伝子修飾が、chr5:157106668-157106688のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0351】

実施形態120

前記遺伝子修飾が、chr5:157104681-157104701のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0352】

実施形態121

前記遺伝子修飾が、chr5:157104681-157104701のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0353】

実施形態122

10

20

30

40

50

前記遺伝子修飾が、chr5:157104680-157104700のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0354】

実施形態123

前記遺伝子修飾が、chr5:157106676-157106696のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0355】

実施形態124

前記遺伝子修飾が、chr5:157087271-157087291のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0356】

実施形態125

前記遺伝子修飾が、chr5:157095432-157095452のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0357】

実施形態126

前記遺伝子修飾が、chr5:157095361-157095381のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0358】

実施形態127

前記遺伝子修飾が、chr5:157095360-157095380のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0359】

実施形態128

前記遺伝子修飾が、chr5:157108945-157108965のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0360】

実施形態129

前記遺伝子修飾が、chr5:157106751-157106771のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0361】

実施形態130

前記遺伝子修飾が、chr5:157095419-157095439のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0362】

実施形態131

前記遺伝子修飾が、chr5:157104679-157104699のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0363】

実施形態132

10

20

30

40

50

前記遺伝子修飾が、chr5:157106824-157106844のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0364】

実施形態133

前記遺伝子修飾が、chr5:157087117-157087137のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0365】

実施形態134

前記遺伝子修飾が、chr5:157095379-157095399のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0366】

実施形態135

前記遺伝子修飾が、chr5:157106864-157106884のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0367】

実施形態136

前記遺伝子修飾が、chr5:157095405-157095425のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0368】

実施形態137

前記遺伝子修飾が、chr5:157095404-157095424のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0369】

実施形態138

前記遺伝子修飾が、chr5:157106888-157106908のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0370】

実施形態139

前記遺伝子修飾が、chr5:157106889-157106909のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0371】

実施形態140

前記遺伝子修飾が、chr5:157106935-157106955のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0372】

実施形態141

前記遺伝子修飾が、chr5:157106641-157106661のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0373】

実施形態142

10

20

30

40

50

前記遺伝子修飾が、chr5:157087084-157087104のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0374】

実施形態143

前記遺伝子修飾が、chr5:157104663-157104683のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0375】

実施形態144

前記遺伝子修飾が、chr5:157106875-157106895のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0376】

実施形態145

前記遺伝子修飾が、chr5:157087184-157087204のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0377】

実施形態146

前記遺伝子修飾が、chr5:157106936-157106956のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0378】

実施形態147

前記遺伝子修飾が、chr5:157104696-157104716のゲノム座標内にある、先行実施形態のいずれか1つに記載の操作された細胞、ガイドRNA、組成物、薬学的組成物、または方法。

【0379】

実施形態148

前記遺伝子修飾が、以下から選択されるゲノム座標：

10

20

30

40

50

【表 2 7】

PD1番号	ゲノム座標(hg38)
PD1-29	chr2:241852703-241852723
PD1-43	chr2:241858807-241858827
PD1-5	chr2:241858789-241858809
PD1-6	chr2:241858788-241858808
PD1-8	chr2:241858755-241858775
PD1-11	chr2:241852919-241852939
PD1-12	chr2:241852915-241852935
PD1-22	chr2:241852755-241852775
PD1-23	chr2:241852751-241852771
PD1-24	chr2:241852750-241852770
PD1-36	chr2:241852264-241852284
PD1-57	chr2:241852201-241852221
PD1-58	chr2:241852749-241852769
PD1-17	chr2:241852821-241852841
PD1-38	chr2:241852265-241852285
PD1-56	chr2:241851221-241851241
PD1-41	chr2:241852188-241852208

10

20

30

40

50

または

それぞれ、chr2:241852919-241852939、chr2:241852915-241852935、chr2:241852750-241852770、chr2:241852264-241852284、chr2:241852265-241852285、chr2:241858807-241858827、chr2:241852201-241852221、chr2:241858789-241858809、chr2:241858788-241858808、chr2:241858755-241858775、chr2:241852755-241852775、chr2:241852751-241852771、及びchr2:241852703-241852723から選択されるゲノム座標、または

それぞれ、chr2:241858788-241858808、chr2:241858755-241858775、chr2:241852919-241852939、chr2:241852915-241852935、chr2:241852751-241852771、chr2:241858807-241858827、及びchr2:241852703-241852723から選択されるゲノム座標、または

それぞれ、chr2:241858789-241858809、chr2:241852919-241852939、chr2:241852915-241852935、chr2:241852755-241852775、chr2:241852751-241852771、及びchr2:241858807-241858827から選択されるゲノム座標、または

それぞれ、chr2:241858788-241858808、chr2:241858755-241858775、chr2:241852751-241852771、及びchr2:241852703-241852723から選択されるゲノム座標、または

それぞれ、chr2:241858788-241858808及びchr2:241852703-241852723から選択されるゲノム座標、または

それぞれ、chr2:241858788-241858808、chr2:241852751-241852771、chr2:241852703-241852723、chr2:241852188-241852208、及びchr2:241852201-241852221から選択されるゲノム座標、またはそれぞれ、chr2:241858788-241858808、chr2:241852703-241852723、及びchr2:241852201-241852221から選択されるゲノム座標、またはchr2:241858807-241858827のゲノム座標内に少なくとも1個のヌクレオチドの修飾を含む、実施形態25に記載の操作された細胞。
【表28-1】

10

表14. 追加の配列

説明	配列番号	配列
CR003187	210	GACCCCCUCCACCCCGCCUCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
CR000961	211	AGAGUCUCUCAGCUGGUACAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
G016239	212	mG*mG*mC*CUCGGCGCUGACGAUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G013006	213	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G000294	214	GACCCCCUCCACCCCGCCUCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
G000739	215	mG*mA*mU*CACGUCGGCCGUUGGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G018438	216	mA*mG*mU*UGGGCAGAUACACUUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G018434	217	mG*mC*mG*GUCCUGAGGUGCACC GGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G021215	218	mC*mU*mG*AAUUUUCCAGAUUAACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
G021216	219	mU*mG*mA*CCAUGUGGUUAGCAUCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
ガイド足場	200	GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG

20

30

40

50

【表 28 - 2】

ガイド足場	201	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場	202	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU UU
ガイド足場	300	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
ガイド足場	400	GUUUUAGAGC UAGAAAUAGC AAGUUAAAAU AAGGCUAGUC CGUUAUCAAC UUGAAAAAGU GGCACCGAGU CGGUGC
ガイド足場81	401	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場 181	402	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAA GGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
ガイド足場94	403	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場 194	404	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG GCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
ガイド足場95	405	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場 195	406	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG GCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
ガイド足場 871	407	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場 971	408	mN*mN*mN*(N)17mGUUUfUAGmAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCmAmAGUfUmAfAmAfAmUAmAmGmGmCmUmA GUmCmCGUfUAmUmCmAmCmGmAmAmAmGmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
ガイド足場 872	409	(N)20GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGGUGC
ガイド足場 972	410	mN*mN*mN*(N)17GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAA GGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

10

20

30

40

50

【表 28 - 3】

tracrRNA	411	AACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
組換え Cas9- NLS アミノ酸 配列	800	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE KYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK SRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDA KLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDI LRVNTTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYK EIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEIFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDN REKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEE VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYFTVYNE LTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLK EDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDN EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLK RRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFQM LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQ TVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRER MKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMY VDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGK SDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGG LSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATA KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIA RKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLFELE NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSP EDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SA YNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYT STKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV

10

20

30

40

50

【表 28 - 4】

ORFエンコー ドSp.Cas9	801	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAC AAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAA GGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCT GTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGA AGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAAC AGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATG GCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAA AGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACA CCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCA CGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCT GGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTA CCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTT CCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGT CGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCA GCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGA CGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCA GAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAA AAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTG GCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATA CGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGA CCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAAAGAACCTGAG CGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACAC AGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA AGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGA AGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAG GAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGA TACATCGAC
---------------------	-----	--

10

20

30

40

50

【表 28 - 5】

		GGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGC CGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAAGTCTGGT CAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACA TTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGA ACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGT TCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGAC ATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAAC AATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAACTTCG ACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAG CCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAA AGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATT CCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTG TTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGG AAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAA ATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAA CATAACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTC CTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCG TCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAA GAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGG TCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGG AAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAG CAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACG GATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGAC AGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCA GCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCT GGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACA GTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGAC ACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAA CCAGACAACACAGA
--	--	---

10

20

30

40

50

【表 28 - 6】

	AGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCG AAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGA ACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTG TACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGA CCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTC GACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCAT CGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGA AAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGA TGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATC ACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAG GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAG ACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAA ACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAA GAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCT ACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGA CGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGA AGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTAC AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAC AGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGC AACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAA CGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGA GAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCG CAACAGTCAGAAAGG
--	---

10

20

30

40

50

【表 2 8 - 7】

	TCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAA GTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGA AGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTG GGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTC GCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAA AGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAAT CACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATC GACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAACTG GAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAC TGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGT CAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGG GAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCTGTCGA ACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATC AGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCT GGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAG CCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTTAC ACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCG ACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGA AGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGAC TGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGA CGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG
--	--

10

20

30

40

50

【表 28 - 8】

ORF エンコード Sp.Cas9	802	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCC GTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAG AAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAG AACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCTGACTCCGGCGAGACCGCCGAG GCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCG GAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGAT GGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCTT CCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCG GCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCA TCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCCG ACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCG GGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACCTCCGA CGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCT GTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGC CATCCTGTCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCT GATCGCCCAGCTGCCCCGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA CCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAAC TTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACC TACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAG TACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATC CTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATACCAAGGCC CCCCTGTCCGCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAG GACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGCAGCAGCTGCCCGAG AAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGCC GGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTC ATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTG GTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTC GACAACGGCTCCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCAC GCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGAC AACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTAC TACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGCAACTCCCGGTTTCGCTGGATG ACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAG GTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTCATCGAGCGGATG ACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAG CACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACC AAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTG TCCGCGGAGCAGAAGAAGGC
----------------------	-----	---

10

20

30

40

50

【表 28 - 9】

		CATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAA GCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACTC CGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCTCCCTGGG CACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCT GGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGA CCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGA AGACCTACGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGA AGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGA TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACT TCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGA TCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCC AGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAACC TGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGA AGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCC GAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCA GAAGGGCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG AGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACC TGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATC AACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCC TTCCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCC GACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGT GGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCA AGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGC GGGGCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGC AGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCC TGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTG ATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCC GACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAAC AACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGC ACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTG TACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAG TCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTAC TCCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAAC GGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGAC CGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCG GAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGT
--	--	--

10

20

30

40

50

【表 28 - 10】

		GAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTC TCCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCT GATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGC GGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTG GCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCG TGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCTC TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTA CAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAG TACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCT GGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCC CTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCTCCCAC TACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAGCAGA AGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAG ATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCT GGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCCTACAACA AGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACAT CATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCG CCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTAC ACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCA GTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCC AGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCTCCCCAAGAAGAAGCG GAAGGTGTGA
--	--	--

10

20

30

40

50

【表 28-11】

Hibitタグを 有するCas9 のオープン リーディング フレーム	803	AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAACUC CGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCA AGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCAAG AAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGC CGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCGGCGGCGGUACACCC GGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAAC GAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCACCGGCUGGAGGA GUCCUUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCA UCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUAC CCCACCAUCUACCACCGUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGA CAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUUGGCCACAUGA UCAAGUUCGGGGCCACUUCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCC GACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUGCAGAC CUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCG UGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGG CGGCUGGAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAA CGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCUGGGCCUGACCC CCAACUUAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUG CAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCU GGCCCAGAUCCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCUGGCCGCCA AGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUG AACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAA GCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCC UGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUC GACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGC CUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUAAGCCAUCCUGGAGA AGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGA GGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCC CCCACCAGAUCCACCGUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGG CAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAU CGAGAAGAUCUGACCUUCCGGAUCCCUACUACGUGGGCCCCC UGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCC GAGGAGACCAUACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGACAA GGGCGCCUCCGCCAGUCCUUAUCGAGCGGAUGACCAACUUCG ACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCUG CUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAA GUACGUGACCGAGGG
--	-----	--

10

20

30

40

50

【表 2 8 - 1 2】

	CAUGC GGAAGCCCGCCU UCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCA UCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAG CAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACUC CGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCUCCUGG GCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUAUCAAAGGACAAGGACUUC CUGGACAACGAGGAGAACGAGGACA UCCUGGAGGACAUCGUGCU GACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAU GAUCGAGGAGCGGC UGAAGACCUACGCCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAG CUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCGGCUGUCCCGGAA GCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCC UGGACUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCAUG CAGCUGAUCCACGACGACUCCUGACCUUCAAGGAGGACA UCCA GAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCUGCAGCAGCACA UCGCCAACCGGCCGCGCUCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGC AGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGG CACAAGCCCGAGAACAU CGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCA GACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGC GGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCAGAUCCUGAAG GAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUA CCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGG AGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUC GUGCCCCAGUCCUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGU GCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGC CCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAG CUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCU GACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCG GCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUACCAAG CACGUGGCCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGA CGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGA AGUCCAAGCUGGUGUCCGACUCCGGAAGGACUCCAGUUCUAC AAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUA CCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCUGAUCAAGAAGUACCCCA AGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGAC GUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAU CGGCAAGGC CACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUA AGACCGAGAUACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCC CUGAUCG
--	---

10

20

30

40

50

【表 28 - 13】

		AGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGG GCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCC CCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGC GGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCG ACAAGCUGAUCGCCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAA GUACGGCGGCUUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCGUG CUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAG CUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGG AGCGGUCCUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUGGA GGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAU CAAGCUGCCCAAGUACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGC CGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGG GCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCCU GUACCUGGCCUCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCC GAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCAC AAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCCGAGU UCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAA GGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUC CGGGAGCAGGCCGAGAACAUAUCCACCUGUUCACCCUGA CCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUAAGUACUUCGACAC CACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUG CUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGU ACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACGG CGGCGGCUCUCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUCCGAGUCC GCCACCCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGA AGAUCUCCUGA
--	--	--

10

20

30

40

50

【表 2 8 - 1 4】

ITRを含む HD1 TCR 挿入	1001	TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTTGCCAACATACCA TAAACCTCCCATTTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAG ACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCC TTTTCCCATGCTGCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCT GGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAG TATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCA GGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTC TTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGT CCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATA AAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCC CTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGG CAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCTAACCCTGATCCTCTT GTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCGGCTCCGGTG CCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAG AAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGA GAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTGA CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATA TAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGG TTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCTCG CGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTTG AATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATC CCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCT TGCCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGC CTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGC
-------------------------	------	--

10

20

30

【表 2 8 - 1 5】

		ACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGC CATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCT GGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATGTGCACA CTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGG CCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCC TGCAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTC AAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGC CGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGT CGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCG GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCT CGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAA AGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCA CGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCT CGAGCTTTTGGAGTACGTCTTTAGGTTGGGGGGAGG GGT
--	--	--

40

50

【表 28 - 16】

	TTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAG TTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCT TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCAATTCTCAAGCCTCAGACAGTGTT CAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGATGCGGCCGCCACC ATGGGATCTTGGACACTGTGTTGCGTGTCCCTGTGCATCCTGGTGG CCAAGCACACAGATGCCGGCGTGATCCAGTCTCCTAGACACGAAG TGACCGAGATGGGCCAAGAAGTGACCCTGCGCTGCAAGCCTATCA GCGGCCACGATTACCTGTTCTGGTACAGACAGACCATGATGAGAG GCCTGGAAGTGTGATCTACTTCAACAACAACGTGCCCATCGACG ACAGCGGCATGCCGAGGATAGATTCAGCGCCAAGATGCCCAACG CCAGCTTCAGCACCTGAAGATCCAGCCTAGCGAGCCCAGAGATA GCGCCGTGTACTTCTGCGCCAGCAGAAAGACAGGCGGCTACAGCA ATCAGCCCCAGCACTTTGGAGATGGCACCCGGCTGAGCATCCTGG AAGATCTGAAGAACGTGTTCCACCTGAGGTGGCCGTGTTTCGAGC CTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGT GTCTGGCCACCGGCTTCTATCCCGATCACGTGGAAGTGTCTTGGTG GGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACCGATCCTCA GCCTCTGAAAGAGCAGCCCGCTCTGAACGACAGCAGATACTGCCT GAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCAG AAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAA CGATGAGTGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCTGTGACACAGATCGT GTCTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGA GAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGTCTGCCACAATCCTGTACGAGAT CCTGCTGGGCAAAGCCACTCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCCCTG GTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGATAGCAGGGGCGGCTCC GGTGCCACAACTTCTCCCTGCTCAAGCAGGCCGGAGATGTGGAA GAGAACCTTGGCCCTATGGAAACCCTGCTGAAGGTGCTGAGCGGC ACACTGCTGTGGCAGCTGACATGGGTCCGATCTCAGCAGCCTGTG CAGTCTCCTCAGGCCGTGATTCTGAGAGAAGGCGAGGACGCCGTG ATCAACTGCAGCAGCTCTAAGGCCCTGTACAGCGTGCACTGGTAC AGACAGAAGCACGGCGAGGCCCTGTGTTCTCTGATGATCCTGCTG AAAGGCGGCGAGCAGAAGGGCCACGAGAAGATCAGCGCCAGCTT CAACGAGAAGAAGCAGCAGTCCAGCCTGTACCTGACAGCCAGCC AGCTGAGCTACAGCGGCACCTACTTTTGTGGCACCGCCTGGATCA ACGACTACAAGCTGTCTTTCGGAGCCGGCACACAGTGACAGTGC GGGCCAATATTCAGAACCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAG ACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCG
--	--

10

20

30

40

50

【表 28 - 17】

		TGTGCCTGTTACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCC CAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGACTG TGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCC GTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGATTTGCGCTGCGCCAACGC CTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAA GTCCTGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAG CTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTGAGCG TGATCGGCTTCAGAATCCTGCTGCTCAAGGTGGCCGGCTTC AACCTGCTGATGACCCTGAGACTGTGGTCCAGCTAACCTCG ACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCC CCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTC CTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAG TAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA GCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG GGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCA GCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACTAGTCGTGTACCAGC TGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTC ACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGA TTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGA GGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGC AACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAG CATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGG GCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAA TGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAA ACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAA AACCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAG TCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGG TGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTAGATC TAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGC GTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA
--	--	---

10

20

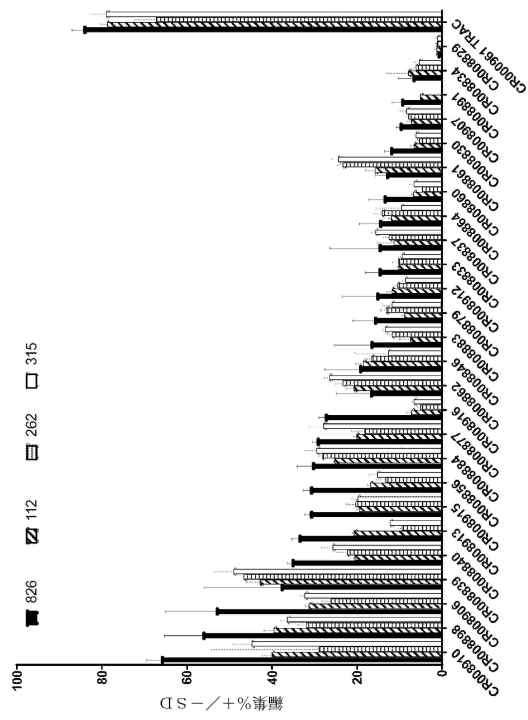
30

40

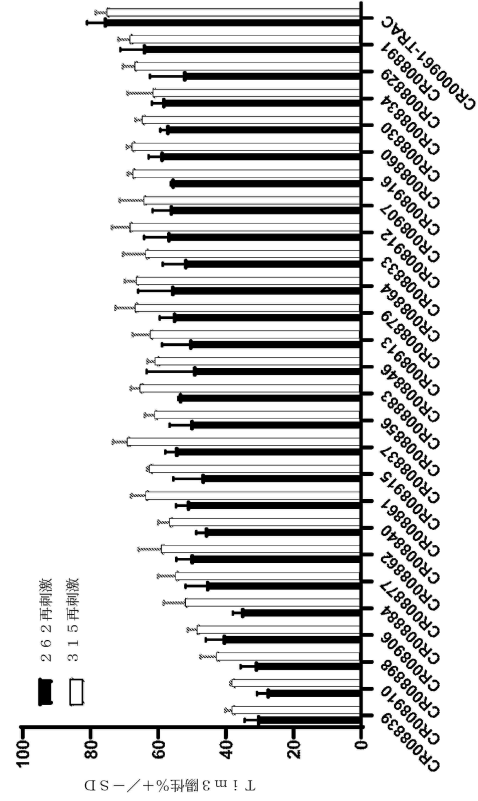
50

【図面】

【図 1】



【図 2 A】



10

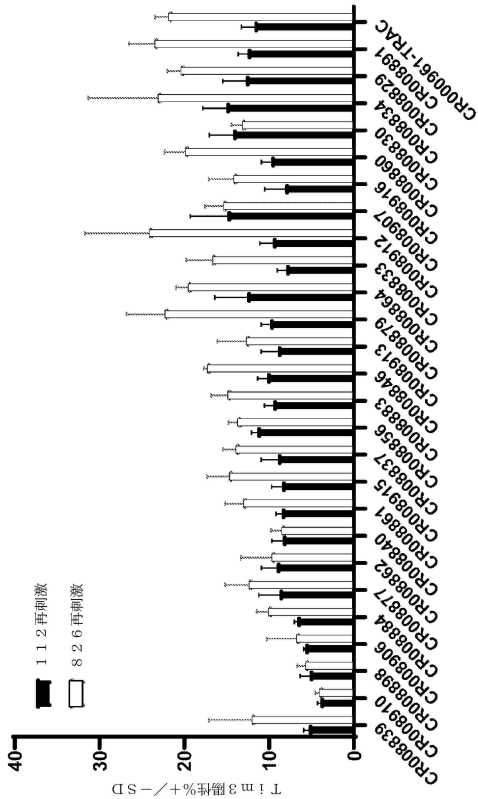
20

30

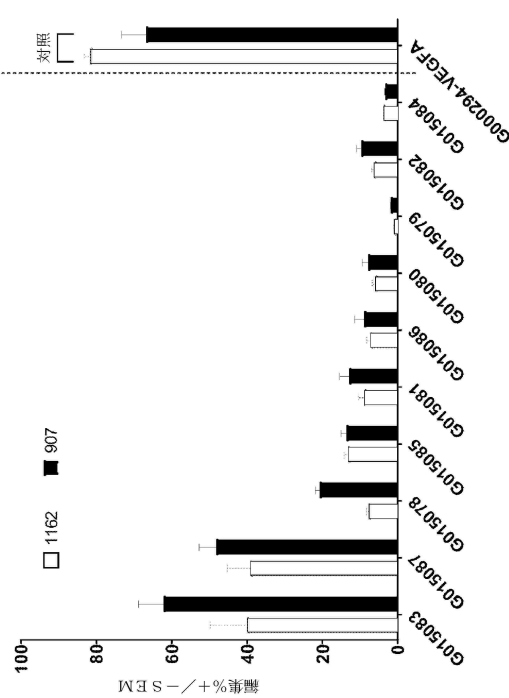
40

50

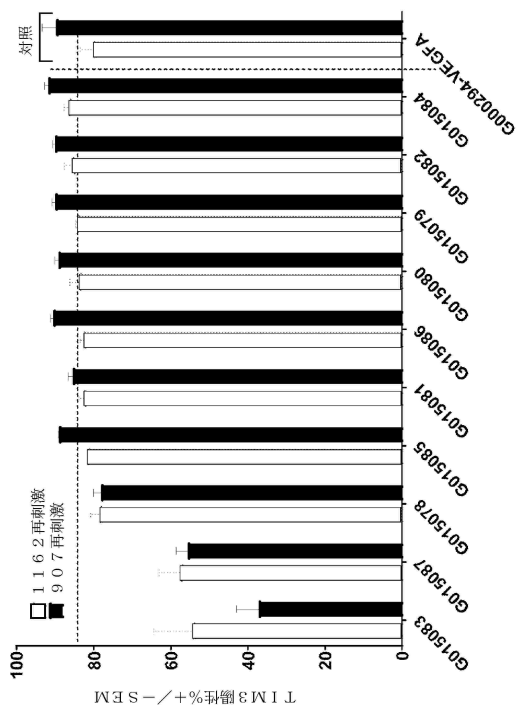
【図 2 B】



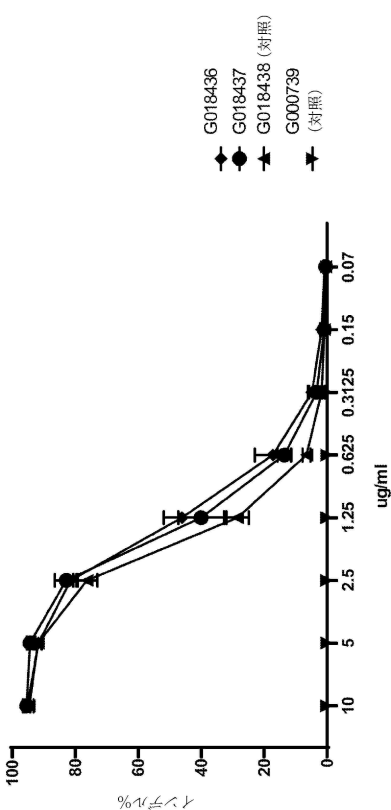
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 4】



10

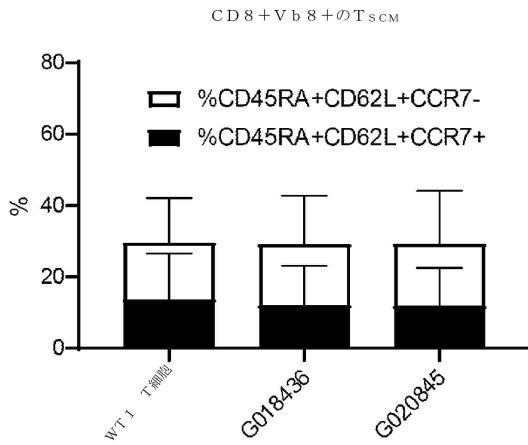
20

30

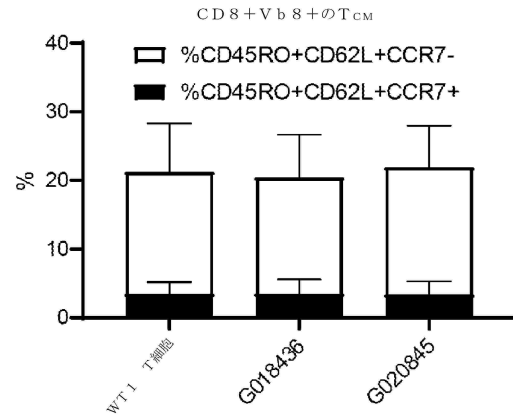
40

50

【図 5 A】

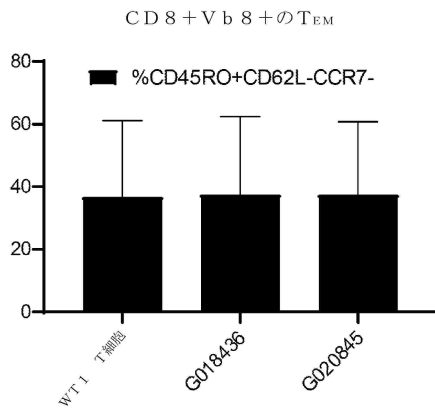


【図 5 B】

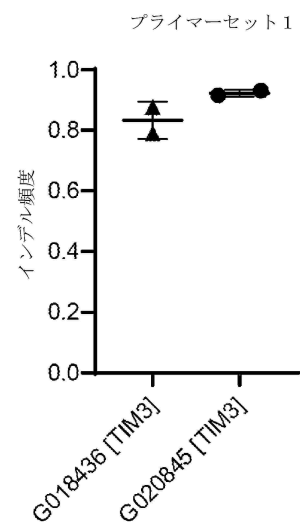


10

【図 5 C】



【図 6 A】



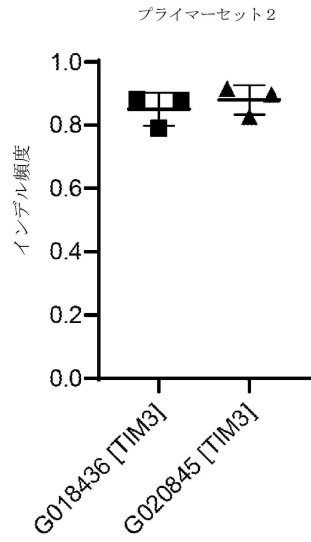
20

30

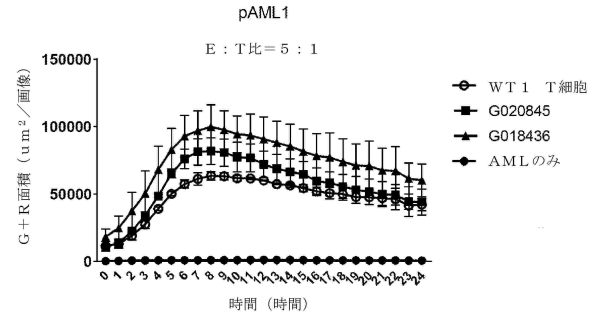
40

50

【図 6 B】

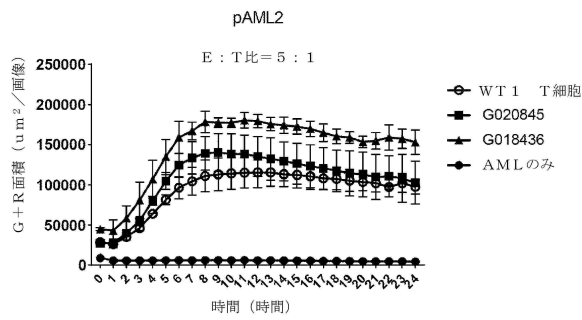


【図 7 A】

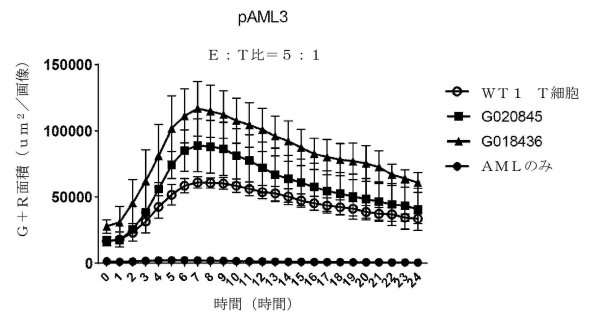


10

【図 7 B】



【図 7 C】



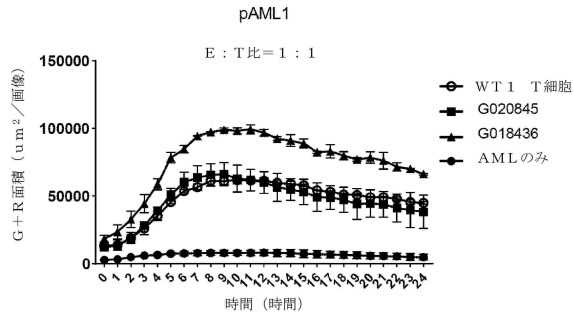
20

30

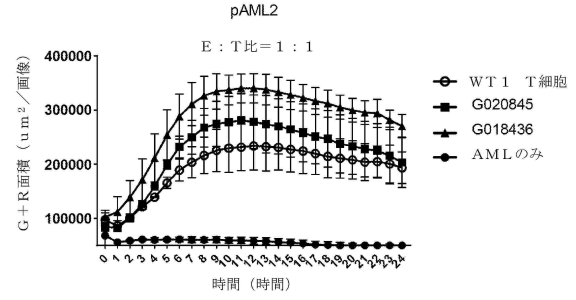
40

50

【図 7 D】

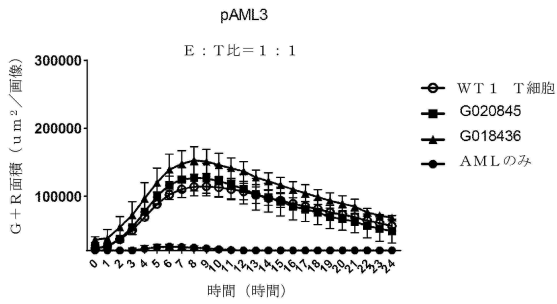


【図 7 E】

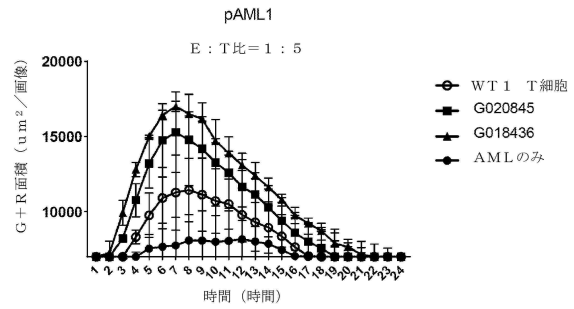


10

【図 7 F】

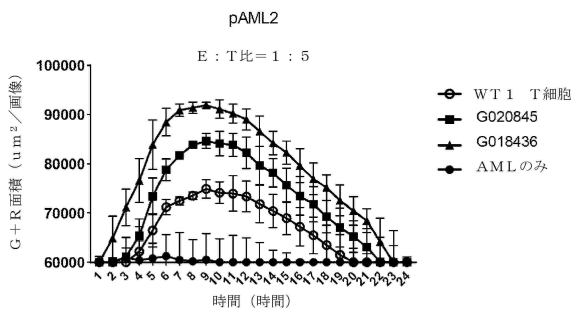


【図 7 G】

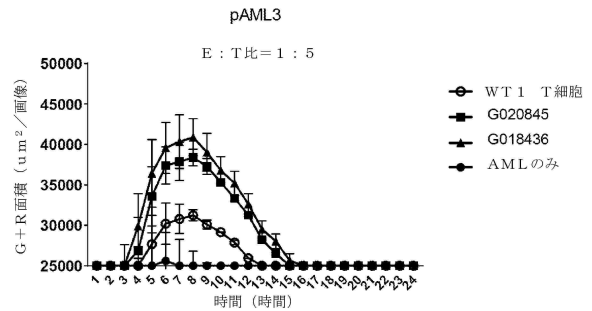


20

【図 7 H】



【図 7 I】



30

【配列表】

2024506016000001.app

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/015496

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. **A61K39/00 A61P35/00 C07K14/725 C12N5/0783 C12N15/11**
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)

A61K C12N A61P C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/205926 A1 (INST ZOOLOGY CAS [CN]) 15 November 2018 (2018-11-15)	1-4, 13, 16, 18-40, 42, 44-52
Y	the whole document	5-12, 14, 15, 17, 41, 43
A	----- WO 2019/118508 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 20 June 2019 (2019-06-20) the whole document ----- -/-	1-52

☒ 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

8 June 2022

Date of mailing of the international search report

26/10/2022

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

Manu, Dominique

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/015496

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HONG MIHE ET AL: "Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 38, no. 4, 30 July 2020 (2020-07-30), pages 473-488, XP086291382, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCELL.2020.07.005 [retrieved on 2020-07-30] the whole document -----	5-10, 43
Y	WO 2016/183041 A2 (HARVARD COLLEGE [US]) 17 November 2016 (2016-11-17) the whole document -----	11, 12, 14, 15
Y	WO 2016/183345 A1 (SEATTLE CHILDREN' S HOSPITAL [US]) 17 November 2016 (2016-11-17) the whole document -----	17
Y	WO 2017/173054 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 5 October 2017 (2017-10-05) the whole document -----	41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/015496

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

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

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

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/015496**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.:
1-52 (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 Application No. PCT/US2022 /015496

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-52 (partially)

An engineered cell comprising a genetic modification in a human TIM3 sequence, within genomic coordinates of chr5:157106867-157106887. A pharmaceutical composition comprising said cells. A population of cells comprising said cells. A method of treating a subject with said cells. The cells, the population of cells or the pharmaceutical composition for use in ACT. A TIM3 guide RNA that specifically hybridizes to a TIM3 sequence comprising the nucleotide sequence with SEQ ID NOs 1. A TIM3 guide RNA comprising a guide sequence that directs an RNA-guided DNA binding agent to a chromosomal location within the genomic coordinates targeted by SEQ ID NO: 1. A composition comprising said guide RNA. A method of making a genetic modification in the TIM3 sequence and a method of preparing cells for immunotherapy with said guide RNA. The population of cells made by said methods. A method of treating a subject with said population. The population for use in ACT. A population of cells comprising a genetic modification of a TIM3 gene, wherein at least 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, preferably at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, or 95% of cells in the population comprise a modification selected from an insertion, a deletion, and a substitution in the endogenous TIM3 sequence

2-36. claims: 1-52 (partially)

Same as Group I for the genomic coordinates TIM3-2
 (chr5:157106862-157106882), TIM3-3
 (chr5:157106803-157106823), TIM3-4
 (chr5:157106850-157106870), TIM3-5
 (chr5:157104726-157104746), TIM3-6
 (chr5:157106668-157106688), TIM3-7
 (chr5:157104681-157104701), TIM3-8
 (chr5:157104681-157104701), TIM3-9
 (chr5:157104680-157104700), TIM3-10
 (chr5:157106676-157106696), TIM3-11
 (chr5:157087271-157087291), TIM3-12
 (chr5:157095432-157095452), TIM3-13
 (chr5:157095361-157095381), TIM3-14
 (chr5:157095360-157095380), TIM3-15
 (chr5:157108945-157108965), TIM3-18
 (chr5:157106751-157106771), TIM3-19
 (chr5:157095419-157095439), TIM3-22
 (chr5:157104679-157104699), TIM3-23
 (chr5:157106824-157106844), TIM3-26
 (chr5:157087117-157087137), TIM3-29
 (chr5:157095379-157095399), TIM3-32
 (chr5:157106864-157106884), TIM3-42
 (chr5:157095405-157095425), TIM3-44

International Application No. PCT/US2022 /015496

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

(chr5:157095404-157095424), TIM3-56
(chr5:157106888-157106908), TIM3-58
(chr5:157087126-157087146), TIM3-59
(chr5:157087253-157087273), TIM3-62
(chr5:157106889-157106909), TIM3-63
(chr5:157106935-157106955), TIM3-66
(chr5:157106641-157106661), TIM3-69
(chr5:157087084-157087104), TIM3-75
(chr5:157104663-157104683), TIM3-82
(chr5:157106875-157106895), TIM3-86
(chr5:157087184-157087204), TIM3-87
(chr5:157106936-157106956), and TIM3-88
(chr5:157104696-157104716) and for the guide RNAs comprising
the sequence with SEQ ID NOs: 2-15, 18, 19, 22, 23, 26, 29,
32, 42, 44, 56, 58, 59, 62, 63, 66, 69, 75, 82, 86, 87, and
88; respectively

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/015496

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018205926 A1	15-11-2018	CN 109790518 A	21-05-2019
		CN 109797171 A	24-05-2019
		WO 2018205926 A1	15-11-2018
WO 2019118508 A1	20-06-2019	TW 201928052 A	16-07-2019
		US 2019247432 A1	15-08-2019
		WO 2019118508 A1	20-06-2019
WO 2016183041 A2	17-11-2016	AU 2016261600 A1	04-01-2018
		AU 2021221859 A1	30-09-2021
		CA 2988854 A1	17-11-2016
		CN 107921148 A	17-04-2018
		EP 3294342 A2	21-03-2018
		HK 1254190 A1	12-07-2019
		JP 2018515139 A	14-06-2018
		JP 2022090109 A	16-06-2022
		US 2019309259 A1	10-10-2019
		US 2021261916 A1	26-08-2021
		US 2022112459 A1	14-04-2022
		WO 2016183041 A2	17-11-2016
WO 2016183345 A1	17-11-2016	AU 2016262093 A1	30-11-2017
		CA 2985650 A1	17-11-2016
		CN 108136047 A	08-06-2018
		EP 3294343 A1	21-03-2018
		HK 1252144 A1	17-05-2019
		JP 2018520648 A	02-08-2018
		US 2016333377 A1	17-11-2016
		US 2018119174 A1	03-05-2018
		US 2020377911 A1	03-12-2020
		WO 2016183345 A1	17-11-2016
WO 2017173054 A1	05-10-2017	AU 2017244143 A1	11-10-2018
		BR 112018069795 A2	29-01-2019
		CA 3018978 A1	05-10-2017
		CN 109475646 A	15-03-2019
		CO 2018011554 A2	08-02-2019
		EP 3436077 A1	06-02-2019
		JP 2019516351 A	20-06-2019
		KR 20190002493 A	08-01-2019
		TW 201802242 A	16-01-2018
		US 2019136231 A1	09-05-2019
		WO 2017173054 A1	05-10-2017

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 0 7 K	14/725	(2006.01)	C 0 7 K	14/725	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	

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

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 , イ
ンテリア セラピューティクス, インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA01 CA24 CA25 CA44
4C084 AA13 MA67 NA14 ZB092 ZB222 ZB262 ZB322
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB65 CA04 CA05 MA67 NA14 ZB09
ZB22 ZB26 ZB32
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20 FA74