

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年2月13日(2020.2.13)

【公表番号】特表2019-500043(P2019-500043A)

【公表日】平成31年1月10日(2019.1.10)

【年通号数】公開・登録公報2019-001

【出願番号】特願2018-534141(P2018-534141)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	15/861	(2006.01)
C 1 2 N	15/867	(2006.01)
C 1 2 N	15/864	(2006.01)
C 1 2 N	15/869	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	5/074	(2010.01)
C 1 2 N	1/00	(2006.01)
A 6 1 K	35/18	(2015.01)
A 6 1 P	7/06	(2006.01)
C 1 2 N	15/12	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 1 2 N	15/861	Z N A Z
C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N	15/869	Z
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/074	
C 1 2 N	1/00	A
A 6 1 K	35/18	Z
A 6 1 P	7/06	
C 1 2 N	15/12	

【手続補正書】

【提出日】令和1年12月26日(2019.12.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

t r a c r と c r R N A とを含む g R N A 分子であって、前記 c r R N A は、ヒト B C L 1 1 a 遺伝子、ヒト B C L 1 1 a エンハンサー、またはヒト H P F H 領域の標的配列に相補的な標的化ドメインを含む、g R N A 分子。

【請求項2】

(a) 前記標的配列は、前記ヒト B C L 1 1 A 遺伝子のものであり、かつ前記標的化ドメインは、配列番号1～配列番号85もしくは配列番号400～配列番号1231のいずれか1つまたはその断片を含むか；

(b) 前記標的配列は、前記ヒト B C L 1 1 a エンハンサーのものであり、かつ前記標的

化ドメインは、配列番号 182～配列番号 277、もしくは配列番号 278～配列番号 333、もしくは配列番号 334～配列番号 341、もしくは配列番号 1232～配列番号 1499、もしくは配列番号 1596～配列番号 1691のいずれか 1つまたはその断片を含むか；または

(c) 前記標的配列は、前記ヒトHFPH領域のものであり、かつ前記標的化ドメインは、配列番号 86～配列番号 181、配列番号 1500～配列番号 1595、もしくは配列番号 1692～配列番号 1761のいずれか 1つまたはその断片を含む、請求項 1に記載のgRNA分子。

【請求項 3】

(a) 前記標的化ドメインは、配列番号 338、配列番号 248、配列番号 253、配列番号 341、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 245、配列番号 249、配列番号 244、配列番号 199、配列番号 251、配列番号 250、配列番号 334、配列番号 185、配列番号 186、配列番号 336、もしくは配列番号 337のいずれか 1つまたはその断片を含むか；

(b) 前記標的化ドメインは、配列番号 318、配列番号 312、配列番号 313、配列番号 294、配列番号 310、配列番号 319、配列番号 298、配列番号 322、配列番号 311、配列番号 315、配列番号 290、配列番号 317、配列番号 309、配列番号 289、もしくは配列番号 281のいずれか 1つまたはその断片を含むか；または

(c) 前記標的化ドメインは、配列番号 1683、配列番号 1638、配列番号 1647、配列番号 1609、配列番号 1621、配列番号 1617、配列番号 1654、配列番号 1631、配列番号 1620、配列番号 1637、配列番号 1612、配列番号 1656、配列番号 1619、配列番号 1675、配列番号 1645、配列番号 1598、配列番号 1599、配列番号 1663、配列番号 1677、もしくは配列番号 1626のいずれか 1つまたはその断片を含むか；または

(d) 標的化ドメインは、配列番号 100、配列番号 165、配列番号 113、配列番号 99、配列番号 112、配列番号 98、配列番号 1505、配列番号 1580、配列番号 106、配列番号 1503、配列番号 1589、配列番号 160、配列番号 1537、配列番号 159、配列番号 101、配列番号 162、配列番号 104、配列番号 138、配列番号 1536、配列番号 1539、配列番号 1585、配列番号 1700、もしくは配列番号 1750のいずれか 1つまたはその断片を含む、請求項 1に記載のgRNA分子。

【請求項 4】

5'から3'に、[前記標的化ドメイン] - :

(a) 配列番号 6601；

(b) 配列番号 6602；

(c) 配列番号 6603；

(d) 配列番号 6604；

(e) 配列番号 7811；または

(f) 3'末端に1、2、3、4、5、6または7個のウラシル(U)ヌクレオチドをさらに含む前記(a)～(e)のいずれか

を含む、請求項 1～3のいずれか一項に記載のgRNA分子。

【請求項 5】

前記gRNA分子の前記核酸分子の1つ以上は、

(a) 前記1つまたは複数の核酸分子の3'末端における1つ以上のホスホロチオエート修飾；

(b) 前記1つまたは複数の核酸分子の5'末端における1つ以上のホスホロチオエート修飾；

(c) 前記1つまたは複数の核酸分子の前記3'末端における1つ以上の2'-O-メチル修飾；

(d) 前記1つまたは複数の核酸分子の前記5'末端における1つ以上の2'-O-メチル修飾；

(e) 前記 1 つまたは複数の核酸分子の末端から 4 番目、末端から 3 番目、および末端から 2 番目の 3' 残基の各々における 2' O - メチル修飾；

(f) 前記 1 つまたは複数の核酸分子の末端から 4 番目、末端から 3 番目、および末端から 2 番目の 5' 残基の各々における 2' O - メチル修飾；または

(g) これらの任意の組み合わせ

を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の gRNA 分子。

【請求項 6】

(a) 配列番号 342；

(b) 配列番号 343；

(c) 配列番号 1762；

(d) 配列番号 344 を含む crrRNA、および配列番号 6660 を含む tracr；

(e) 配列番号 344 を含む crrRNA、および配列番号 346 を含む tracr；

(f) 配列番号 345 を含む crrRNA、および配列番号 6660 を含む tracr；

(g) 配列番号 345 を含む crrRNA、および配列番号 346 を含む tracr；

(h) 配列番号 347；

(i) 配列番号 348；

(j) 配列番号 1763；

(k) 配列番号 349 を含む crrRNA、および配列番号 6660 を含む tracr；

(l) 配列番号 349 を含む crrRNA、および配列番号 346 を含む tracr；

(m) 配列番号 350 を含む crrRNA、および配列番号 6660 を含む tracr；または

(n) 配列番号 350 を含む crrRNA、および配列番号 346 を含む tracr

を含む、請求項 1 に記載の gRNA 分子。

【請求項 7】

(a) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の gRNA 分子、および Cas9 分子；

(b) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の gRNA 分子、および Cas9 分子をコードする核酸配列；

(c) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の gRNA 分子をコードする核酸配列、および Cas9 分子；

(d) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の gRNA 分子をコードする核酸配列、および Cas9 分子をコードする核酸配列；

(e) 前記 a) ~ d) のいずれか、および鑄型核酸；または

(f) 前記 a) ~ d) のいずれか、および鑄型核酸をコードする配列を含む核酸を含む組成物。

【請求項 8】

前記 Cas9 分子は、活性または不活性化膿レンサ球菌 (*S. pyogenes*) Cas9 である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 Cas9 分子は、配列番号 6611 またはそれと少なくとも 95 % の配列相同性を有する配列を含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記 Cas9 分子は、

(a) 配列番号 7821；

(b) 配列番号 7822；

(c) 配列番号 7823；

(d) 配列番号 7824；

(e) 配列番号 7825；

(f) 配列番号 7825 の 88 位にロイシン (C88L) をさらに含み、かつ配列番号 7825 の 582 位にグルタミン酸 (C582E) を含む配列番号 7825；

(g) 配列番号 7 8 2 6 ;
(h) 配列番号 7 8 2 7 ;
(i) 配列番号 7 8 2 8 ;
(j) 配列番号 7 8 2 9 ;
(k) 配列番号 7 8 3 0 ; または
(l) 配列番号 7 8 3 1

を含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記 g RNA 分子および前記 Cas 9 分子は、リボ核タンパク質複合体 (RNP) に存在する、請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

第 2 の g RNA 分子、または第 2 の g RNA 分子および第 3 の g RNA 分子をさらに含み、前記組成物の各 g RNA 分子は、異なる標的配列と相補的である、請求項 7 ~ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 g RNA 分子の各々は、前記 Cas 9 分子と共にリボ核タンパク質複合体 (RNP) 中にある、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

錆型核酸を含み、前記錆型核酸は、
(a) ヒト グロビンもしくはその断片；または
(b) ヒト グロビンもしくはその断片

をコードする核酸配列を含む、請求項 7 ~ 13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

エレクトロポレーションに好適な媒体中に製剤化される、請求項 7 ~ 14 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 g RNA 分子の各々は、前記 Cas 9 分子と共に RNP 中にあり、前記 RNP の各々は、約 10 μM 未満の濃度である、請求項 7 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g RNA 分子をコードする核酸配列。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 19】

細胞内の 1 つ以上の g RNA 分子の標的配列でまたはその近傍で前記細胞を改変する方法であって、前記細胞を、

(a) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g RNA 分子、および Cas 9 分子；

(b) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g RNA 分子、および Cas 9 分子をコードする核酸；

(c) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g RNA 分子をコードする核酸、および Cas 9 分子；

(d) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g RNA 分子をコードする核酸、および Cas 9 分子をコードする核酸；

(e) 前記 (a) ~ (d) のいずれか、および錆型核酸；

(f) 前記 (a) ~ (d) のいずれか、および錆型核酸をコードする配列を含む核酸；

(g) 請求項 7 ~ 16 のいずれか一項に記載の組成物；または

(h) 請求項 18 に記載のベクター

と接触させるステップを含む方法。

【請求項 20】

前記細胞は、哺乳類細胞、靈長類細胞またはヒト細胞である、請求項 19 に記載の方法

【請求項 2 1】

前記細胞は、造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記細胞は、CD34+細胞である、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記細胞は、CD34+CD90+細胞である、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記細胞は、CD34+細胞に関してエンリッチされた細胞の集団を含む組成物中に配置される、請求項 1 9 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記細胞は、骨髓、動員末梢血または臍帯血から単離されたものである、請求項 1 9 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記改変は、前記 1 つ以上の gRNA 分子の前記標的配列にまたはその近傍にインデルをもたらす、請求項 1 9 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記インデルは、図 2 5、表 1 5、表 2 6、表 2 7 または表 3 7 に示されるインデルである、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

細胞の集団をもたらし、前記集団の前記細胞の少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% が改変される、請求項 1 9 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記改変は、赤血球系統の分化細胞の集団への分化能を有する細胞の集団をもたらし、前記分化細胞の集団は、非改変細胞の集団と比べて胎児ヘモグロビンの増加したレベルを呈する、請求項 1 9 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記分化細胞の集団は、前記非改変細胞の集団と比べて F 細胞の増加した割合を有する、請求項 1 9 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記分化細胞の集団は、1 細胞当たり平均で少なくとも約 6 ピコグラム、少なくとも約 7 ピコグラム、少なくとも約 8 ピコグラム、少なくとも約 9 ピコグラム、少なくとも約 10 ピコグラム、約 8 ~ 約 9 ピコグラム、または約 9 ~ 約 10 ピコグラムの胎児ヘモグロビンを産生する、請求項 2 9 または 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

請求項 1 9 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法によって改変された細胞。

【請求項 3 3】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の第 1 の gRNA 分子、または請求項 7 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の組成物、請求項 1 7 に記載の核酸、または請求項 1 8 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 3 4】

前記細胞またはその子孫において、胎児ヘモグロビンの発現が、前記 gRNA 分子、または前記組成物、または前記核酸、または前記ベクターを含まない同じ細胞型の細胞またはその子孫と比べて増加している、請求項 3 3 に記載の細胞。

【請求項 3 5】

前記細胞またはその子孫は、少なくとも約 6 ピコグラム、少なくとも約 7 ピコグラム、少なくとも約 8 ピコグラム、少なくとも約 9 ピコグラム、少なくとも約 10 ピコグラム、

約 8 ~ 約 9 ピコグラム、または約 9 ~ 約 10 ピコグラムの胎児ヘモグロビンを産生する、請求項 3 4 に記載の細胞。

【請求項 3 6】

幹細胞増殖剤と接触した、請求項 3 2 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 3 7】

前記幹細胞増殖剤は、化合物 1、化合物 2、化合物 3、化合物 4、またはこれらの組み合わせである、請求項 3 6 に記載の細胞。

【請求項 3 8】

図 2 5、表 1 5、表 2 6、表 2 7 または表 3 7 に示されるインデルを含む細胞。

【請求項 3 9】

哺乳類細胞、靈長類細胞またはヒト細胞である、請求項 3 3 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 4 0】

造血幹細胞・前駆細胞 (HSPC) である、請求項 3 3 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 4 1】

CD34+ 細胞である、請求項 3 3 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 4 2】

CD34+ CD90+ 細胞である、請求項 4 1 に記載の細胞。

【請求項 4 3】

前記細胞は、骨髄、動員末梢血または臍帯血から単離されたものである、請求項 3 3 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 4 4】

請求項 3 3 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞の集団。

【請求項 4 5】

前記集団の前記細胞の少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% は、請求項 3 3 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の細胞である、請求項 4 4 に記載の細胞の集団。

【請求項 4 6】

分化細胞の集団への分化能を有し、前記分化細胞の集団は、同じタイプの修飾されていない細胞の集団と比べて F 細胞の増加した割合を有する、請求項 4 4 または 4 5 に記載の細胞の集団。

【請求項 4 7】

前記分化細胞の集団の前記 F 細胞は、1 細胞当たり平均で少なくとも約 6 ピコグラム、少なくとも約 7 ピコグラム、少なくとも約 8 ピコグラム、少なくとも約 9 ピコグラム、少なくとも約 10 ピコグラム、約 8 ~ 約 9 ピコグラム、または約 9 ~ 約 10 ピコグラムの胎児ヘモグロビンを産生する、請求項 4 6 に記載の細胞の集団。

【請求項 4 8】

(a) 少なくとも 1e6 の CD34+ 細胞 / 前記細胞が投与される患者の体重 kg、

(b) 少なくとも 2e6 の CD34+ 細胞 / 前記細胞が投与される患者の体重 kg、

(c) 少なくとも 3e6 の CD34+ 細胞 / 前記細胞が投与される患者の体重 kg、

(d) 少なくとも 4e6 の CD34+ 細胞 / 前記細胞が投与される患者の体重 kg、または

(e) 2e6 ~ 10e6 の CD34+ 細胞 / 前記細胞が投与される患者の体重 kg

を含む、請求項 4 4 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の細胞の集団。

【請求項 4 9】

前記集団の前記細胞の少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、または少なくとも約 90% は、CD34+ 細胞である、請求項 4 4 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の細胞の集団。

【請求項 5 0】

前記集団の前記細胞の少なくとも約 10%、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、または少なくとも約 30% は、CD34 + CD90 + 細胞である、請求項 4 9 に記載の細胞の集団。

【請求項 5 1】

骨髓、動員末梢血または臍帯血から単離されたものである、請求項 4 4 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の細胞の集団。

【請求項 5 2】

異常ヘモグロビン症を有する患者から単離されたものである、請求項 4 4 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の細胞の集団。

【請求項 5 3】

請求項 4 4 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の細胞の集団を含む組成物。

【請求項 5 4】

凍結保存に好適である薬学的に許容可能な媒体を含む、請求項 5 3 に記載の組成物。

【請求項 5 5】

異常ヘモグロビン症を治療するための、請求項 3 2 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の細胞、請求項 4 4 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の細胞の集団、または請求項 5 3 もしくは 5 4 に記載の組成物。

【請求項 5 6】

前記異常ヘモグロビン症は、 - サラセミアまたは鎌状赤血球症である、請求項 5 5 に記載の細胞、細胞の集団または組成物。

【請求項 5 7】

細胞の集団を調製する方法であって、

(a) 細胞の集団を提供するステップ；

(b) 幹細胞増殖剤を含む細胞培養培地中で前記細胞の集団をエキソビオで培養するステップ；および

(c) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の第 1 の gRNA 分子、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の第 1 の gRNA 分子をコードする核酸分子、請求項 7 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の組成物、請求項 1 7 に記載の核酸、または請求項 1 8 に記載のベクターを前記細胞の集団の細胞に導入するステップ

を含む方法。

【請求項 5 8】

前記幹細胞増殖剤は、化合物 1、化合物 2、化合物 3、化合物 4 またはこれらの組み合わせである、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記細胞培養培地は、前記幹細胞増殖剤を約 1 nM ~ 約 1 mM の範囲の濃度で含む、請求項 5 7 または 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記ステップ (b) の培養は、前記ステップ (c) の導入前の培養期間を含む、請求項 5 7 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記ステップ (c) の導入前の前記培養期間は、少なくとも 12 時間、約 1 日 ~ 約 3 日の期間、約 1 日 ~ 約 2 日の期間、または約 2 日の期間である、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記ステップ (b) の培養は、前記ステップ (c) の導入後の培養期間を含む、請求項 5 7 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記ステップ (c) の導入後の前記培養期間は、少なくとも 12 時間、約 1 日 ~ 約 10 日の期間、約 1 日 ~ 約 5 日の期間、約 2 日 ~ 約 4 日の期間、約 2 日の期間、約 3 日の期間、または約 4 日の期間である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記細胞の集団は、ステップ(b)によって培養されていない細胞の集団と比べて少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍増殖する、請求項57～63のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記ステップ(c)の導入は、エレクトロポレーションを含む、請求項57～64のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

ステップ(a)で提供される前記細胞の集団は、ヒト細胞の集団である、請求項57～65のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 7】

ステップ(a)で提供される前記細胞の集団は、骨髓、動員末梢血または臍帯血から単離されたものである、請求項66に記載の方法。

【請求項 6 8】

ステップ(a)で提供される前記細胞の集団は、異常ヘモグロビン症に罹患している患者から単離されたものである、請求項67に記載の方法。

【請求項 6 9】

ステップ(a)で提供される前記細胞の集団は、CD34+細胞に関してエンリッチされたものである、請求項57～68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記ステップ(c)の導入後、前記細胞の集団は凍結保存される、請求項57～69のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記ステップ(c)の導入後、前記細胞の集団の前記細胞の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%は、前記組成物の前記第1のgRNA分子の前記標的化ドメインと相補的なゲノムDNA配列にまたはその近傍にインデルを含み、任意選択で、前記インデルは、図25、表15、表26、表27または表37に示されるインデルである、請求項57～70のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 2】

請求項57～71のいずれか一項に記載の方法によって得ることが可能な細胞の集団。

【請求項 7 3】

ヒト患者において異常ヘモグロビン症を治療するための、請求項72に記載の細胞の集団を含む組成物。

【請求項 7 4】

前記異常ヘモグロビン症は、- サラセニアまたは鎌状赤血球症である、請求項73に記載の組成物。

【請求項 7 5】

前記ヒト患者の体重1kg当たり少なくとも約1e6個のCD34+細胞を含む、請求項73または74に記載の組成物。

【請求項 7 6】

薬剤として用いられる、請求項1～6のいずれか一項に記載のgRNA分子、請求項7～16または53もしくは54のいずれか一項に記載の組成物、請求項17に記載の核酸、請求項18に記載のベクター、請求項32～43のいずれか一項に記載の細胞、あるいは請求項44～52または72のいずれか一項に記載の細胞の集団。

【請求項 7 7】

薬剤の製造に用いられる、請求項1～6のいずれか一項に記載のgRNA分子、請求項7～16または53もしくは54のいずれか一項に記載の組成物、請求項17に記載の核酸、請求項18に記載のベクター、請求項32～43のいずれか一項に記載の細胞、ある

いは請求項 4 4 ~ 5 2 または 7 2 のいずれか一項に記載の細胞の集団。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 9 5 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 9 5 0】

均等物

当業者は、本明細書に記載される本発明の具体的な実施形態の多くの均等物を認識し、またはルーチンに過ぎない実験を用いて確認することができるであろう。本発明は具体的な態様を参照して開示されているが、本発明の他の態様および変形形態が当業者によって本発明の真の趣旨および範囲から逸脱することなく考案され得ることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、かかる態様および均等な変形形態の全てを含むものと解釈されることが意図される。

また、本発明は以下を提供する。

[1]

t r a c r と c r R N A を含む g R N A 分子であって、前記 c r R N A は、 B C L 1 1 A 遺伝子（例えば、ヒト B C L 1 1 a 遺伝子）、B C L 1 1 a エンハンサー（例えば、ヒト B C L 1 1 a エンハンサー）、または H F P H 領域（例えば、ヒト H P F H 領域）の標的配列に相補的な標的化ドメインを含む、g R N A 分子。

[2]

前記標的配列は、前記 B C L 1 1 A 遺伝子のものであり、かつ前記標的化ドメインは、配列番号 1 ~ 配列番号 8 5 または配列番号 4 0 0 ~ 配列番号 1 2 3 1 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[1] に記載の g R N A 分子。

[3]

前記標的配列は、B C L 1 1 a エンハンサーのものであり、かつ前記標的化ドメインは、配列番号 1 2 3 2 ~ 配列番号 1 4 9 9 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[1] に記載の g R N A 分子。

[4]

前記標的配列は、B C L 1 1 a エンハンサーのものであり、かつ前記標的化ドメインは、配列番号 1 8 2 ~ 配列番号 2 7 7 または配列番号 3 3 4 ~ 配列番号 3 4 1 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[1] に記載の g R N A 分子。

[5]

前記標的化ドメインは、配列番号 3 4 1、配列番号 2 4 6、配列番号 2 4 8、配列番号 2 4 7、配列番号 2 4 5、配列番号 2 4 9、配列番号 2 4 4、配列番号 1 9 9、配列番号 2 5 1、配列番号 2 5 0、配列番号 3 3 4、配列番号 1 8 5、配列番号 1 8 6、配列番号 3 3 6、または配列番号 3 3 7 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[4] に記載の g R N A 分子。

[6]

前記標的化ドメインは、配列番号 2 4 7、配列番号 2 4 8、配列番号 3 3 5、配列番号 3 3 6、配列番号 3 3 7、または配列番号 3 3 8 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[4] に記載の g R N A 分子。

[7]

前記標的化ドメインは、配列番号 2 4 8 または配列番号 3 3 8 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[4] に記載の g R N A 分子。

[8]

前記標的化ドメインは、配列番号 2 4 8 を含む、例えばそれからなる、[4] に記載の g R N A 分子。

[9]

前記標的化ドメインは、配列番号 338 を含む、例えばそれからなる、[4] に記載の gRNA 分子。

[10]

前記標的配列は、BCL11a エンハンサーのものであり、かつ標的化ドメインは、配列番号 278 ~ 配列番号 333 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[11]

前記標的化ドメインは、配列番号 318 、配列番号 312 、配列番号 313 、配列番号 294 、配列番号 310 、配列番号 319 、配列番号 298 、配列番号 322 、配列番号 311 、配列番号 315 、配列番号 290 、配列番号 317 、配列番号 309 、配列番号 289 、または配列番号 281 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[10] に記載の gRNA 分子。

[12]

前記標的化ドメインは、配列番号 318 を含む、例えばそれからなる、[10] に記載の gRNA 分子。

[13]

前記標的配列は、BCL11a エンハンサーのものであり、かつ前記標的化ドメインは、配列番号 1596 ~ 配列番号 1691 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[14]

前記標的化ドメインは、配列番号 1683 、配列番号 1638 、配列番号 1647 、配列番号 1609 、配列番号 1621 、配列番号 1617 、配列番号 1654 、配列番号 1631 、配列番号 1620 、配列番号 1637 、配列番号 1612 、配列番号 1656 、配列番号 1619 、配列番号 1675 、配列番号 1645 、配列番号 1598 、配列番号 1599 、配列番号 1663 、配列番号 1677 、または配列番号 1626 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[13] に記載の gRNA 分子。

[15]

前記標的配列は、HFPH 領域（例えば、フランス型 HPFH 領域）のものであり、かつ前記標的化ドメインは、配列番号 86 ~ 配列番号 181 、配列番号 1500 ~ 配列番号 1595 、または配列番号 1692 ~ 配列番号 1761 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[16]

前記標的化ドメインは、配列番号 100 、配列番号 165 、配列番号 113 、配列番号 99 、配列番号 112 、配列番号 98 、配列番号 1580 、配列番号 106 、配列番号 1503 、配列番号 1589 、配列番号 160 、配列番号 1537 、配列番号 159 、配列番号 101 、配列番号 162 、配列番号 104 、配列番号 138 、配列番号 1536 、配列番号 1539 、配列番号 1585 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[15] に記載の gRNA 分子。

[17]

前記標的化ドメインは、配列番号 98 、配列番号 100 、配列番号 1505 、配列番号 1589 、配列番号 1700 、または配列番号 1750 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[15] に記載の gRNA 分子。

[18]

前記標的化ドメインは、配列番号 100 、配列番号 165 、または配列番号 113 のいずれか 1 つを含む、例えばそれからなる、[15] に記載の gRNA 分子。

[19]

前記標的化ドメインは、前記記載される標的化ドメイン配列のいずれか 1 つの 17 、 18 、 19 、 20 、 21 、 22 、 23 、または 24 個の連続する核酸を含む、例えばそれからなる、[2] ~ [18] のいずれか一項に記載の gRNA 分子。

[2 0]

前記記載される標的化ドメイン配列のいずれか1つの17、18、19、20、21、22、23、または24個の連続する核酸は、前記記載される標的化ドメイン配列の3'末端に配置された17、18、19、20、21、22、23、または24個の連続する核酸である、[16]に記載のgRNA分子。

[2 1]

前記記載される標的化ドメイン配列のいずれか1つの17、18、19、20、21、22、23、または24個の連続する核酸は、前記記載される標的化ドメイン配列の5'末端に配置された17、18、19、20、21、22、23、または24個の連続する核酸である、[16]に記載のgRNA分子。

[2 2]

前記記載される標的化ドメイン配列のいずれか1つの17、18、19、20、21、22、23、または24個の連続する核酸は、前記記載される標的化ドメイン配列の5'核酸または3'核酸のいずれも含まない、[16]に記載のgRNA分子。

[2 3]

前記標的化ドメインは、前記記載される標的化ドメイン配列からなる、[2]～[22]のいずれか一項に記載のgRNA分子。

[2 4]

前記c r RNAの一部分と前記t r a c rの一部分とは、ハイブリダイズして、配列番号6584または6585を含むフラッグポールを形成する、[1]～[23]のいずれか一項に記載のgRNA分子。

[2 5]

前記フラッグポールは、前記フラッグポールの前記c r RNA部分の3'側に位置する第1のフラッグポール伸長部をさらに含み、前記第1のフラッグポール伸長部は、配列番号6586を含む、[24]に記載のgRNA分子。

[2 6]

前記フラッグポールは、前記フラッグポールの前記c r RNA部分の3'側に位置する第2のフラッグポール伸長部および存在する場合には前記第1のフラッグポール伸長部をさらに含み、前記第2のフラッグポール伸長部は、配列番号6587を含む、[24]または[25]に記載のgRNA分子。

[2 7]

前記t r a c rは、配列番号6660または配列番号6661を含む、[1]～[26]のいずれか一項に記載のgRNA分子。

[2 8]

前記t r a c rは、配列番号7812を含み、任意選択で3'末端に追加の1、2、3、4、5、6、または7個のウラシル(U)ヌクレオチドをさらに含む、[1]～[26]のいずれか一項に記載のgRNA分子。

[2 9]

前記c r RNAは、5'から3'に、[標的化ドメイン]-：

- a) 配列番号6584；
- b) 配列番号6585；
- c) 配列番号6605；
- d) 配列番号6606；
- e) 配列番号6607；
- f) 配列番号6608；または
- g) 配列番号7806

を含む、[1]～[28]のいずれか一項に記載のgRNA分子。

[3 0]

前記t r a c rは、5'から3'に、

- a) 配列番号6589；

b) 配列番号 6 5 9 0 ;
 c) 配列番号 6 6 0 9 ;
 d) 配列番号 6 6 1 0 ;
 e) 配列番号 6 6 6 0 ;
 f) 配列番号 6 6 6 1 ;
 g) 配列番号 7 8 1 2 ;
 h) 配列番号 7 8 0 7 ;
 i) (配列番号 7 8 0 8 ;
 j) 配列番号 7 8 0 9 ;

k) 3' 末端に少なくとも 1、2、3、4、5、6 または 7 個のウラシル (U) ヌクレオチド、例えば 1、2、3、4、5、6、または 7 個のウラシル (U) ヌクレオチドをさらに含む前記 a) ~ j) のいずれか；

l) 3' 末端に少なくとも 1、2、3、4、5、6 または 7 個のアデニン (A) ヌクレオチド、例えば 1、2、3、4、5、6、または 7 個のアデニン (A) ヌクレオチドをさらに含む前記 a) ~ k) のいずれか；または

m) 5' 末端に (例えば、5' 側端に) 少なくとも 1、2、3、4、5、6 または 7 個のアデニン (A) ヌクレオチド、例えば 1、2、3、4、5、6、または 7 個のアデニン (A) ヌクレオチドをさらに含む前記 a) ~ l) のいずれか

を含む、[1] ~ [23] または [29] のいずれか一項に記載の g RNA 分子。

[31]

前記標的化ドメインと前記 tracr とは、別個の核酸分子に配置され、前記標的化ドメインを含む前記核酸分子は配列番号 6 6 0 7 を含み、配列番号 6 6 0 7 は任意選択で前記標的化ドメインのすぐ 3' 側に配置され、および前記 tracr を含む前記核酸分子は、配列番号 6 6 6 0 を含む、例えばそれからなる、[1] ~ [23] のいずれか一項に記載の g RNA 分子。

[32]

前記フラッグポールの前記 crRNA 部分は、配列番号 6 6 0 7 または配列番号 6 6 0 8 を含む、[27] または [28] に記載の g RNA 分子。

[33]

前記 tracr は、配列番号 6 5 8 9 または 6 5 9 0 と、任意選択で、第 1 のフラッグポール伸長部が存在する場合、配列番号 6 5 8 9 または 6 5 9 0 の 5' 側に配置された第 1 の tracr 伸長部とを含み、前記第 1 の tracr 伸長部は、配列番号 6 5 9 1 を含む、[1] ~ [26] のいずれか一項に記載の g RNA 分子。

[34]

前記標的化ドメインと前記 tracr とは、別個の核酸分子に配置される、[1] ~ [33] のいずれか一項に記載の g RNA 分子。

[35]

前記標的化ドメインと前記 tracr とは、単一の核酸分子に配置され、前記 tracr は、前記標的化ドメインの 3' 側に配置される、[1] ~ [33] のいずれか一項に記載の g RNA 分子。

[36]

前記標的化ドメインの 3' 側かつ前記 tracr の 5' 側に配置されたループをさらに含む、[35] に記載の g RNA 分子。

[37]

前記ループは、配列番号 6 5 8 8 を含む、[36] に記載の g RNA 分子。

[38]

5' から 3' に、[標的化ドメイン] - :
 (a) 配列番号 6 6 0 1 ;
 (b) 配列番号 6 6 0 2 ;
 (c) 配列番号 6 6 0 3 ;

(d) 配列番号 6 6 0 4 ;

(e) 配列番号 7 8 1 1 ; または

(f) 3' 末端に 1、2、3、4、5、6 または 7 個のウラシル (U) ヌクレオチドをさらに含む前記 (a) ~ (e) のいずれか

を含む、[1] ~ [2 3] のいずれか一項に記載の gRNA 分子。

[3 9]

前記標的化ドメインと前記 tracr とは、単一の核酸分子に配置され、前記核酸分子は、前記標的化ドメインと配列番号 7 8 1 1 とを含み、例えばそれからなり、配列番号 7 8 1 1 は任意選択で前記標的化ドメインのすぐ 3' 側に配置される、[1] ~ [4 0] のいずれか一項に記載の gRNA 分子。

[4 0]

前記 gRNA 分子を含む前記核酸分子の 1 つまたは任意選択で 2 つ以上は、

a) 前記 1 つまたは複数の核酸分子の 3' 末端における 1 つ以上、例えば 3 つのホスホロチオエート修飾；

b) 前記 1 つまたは複数の核酸分子の 5' 末端における 1 つ以上、例えば 3 つのホスホロチオエート修飾；

c) 前記 1 つまたは複数の核酸分子の前記 3' 末端における 1 つ以上、例えば 3 つの 2'-O-メチル修飾；

d) 前記 1 つまたは複数の核酸分子の前記 5' 末端における 1 つ以上、例えば 3 つの 2'-O-メチル修飾；

e) 前記 1 つまたは複数の核酸分子の末端から 4 番目、末端から 3 番目、および末端から 2 番目の 3' 残基の各々における 2'-O-メチル修飾；

f) 前記 1 つまたは複数の核酸分子の末端から 4 番目、末端から 3 番目、および末端から 2 番目の 5' 残基の各々における 2'-O-メチル修飾；または

f) これらの任意の組み合わせ

を含む、[1] ~ [3 9] のいずれか一項に記載の gRNA 分子。

[4 1]

配列：

(a) 配列番号 3 4 2 ;

(b) 配列番号 3 4 3 ; または

(c) 配列番号 1 7 6 2

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[4 2]

(a) 配列番号 3 4 4 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6 6 6 0 を含む、例えばそれからなる tracr；

(b) 配列番号 3 4 4 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 3 4 6 を含む、例えばそれからなる tracr；

(c) 配列番号 3 4 5 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6 6 6 0 を含む、例えばそれからなる tracr；または

(d) 配列番号 3 4 5 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 3 4 6 を含む、例えばそれからなる tracr

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[4 3]

配列：

(a) 配列番号 3 4 7 ;

(b) 配列番号 3 4 8 ; または

(c) 配列番号 1 7 6 3

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[4 4]

(a) 配列番号 3 4 9 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6 6 6

0を含む、例えばそれからなるtracr；

(b) 配列番号349を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号346を含む、例えばそれからなるtracr；

(c) 配列番号350を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号6660を含む、例えばそれからなるtracr；または

(d) 配列番号350を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号346を含む、例えばそれからなるtracr

を含む、例えばそれからなる、[1]に記載のgRNA分子。

[45]

配列：

(a) 配列番号351；

(b) 配列番号352；または

(c) 配列番号1764

を含む、例えばそれからなる、[1]に記載のgRNA分子。

[46]

(a) 配列番号353を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号6660を含む、例えばそれからなるtracr；

(b) 配列番号353を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号346を含む、例えばそれからなるtracr；

(c) 配列番号354を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号6660を含む、例えばそれからなるtracr；または

(d) 配列番号354を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号346を含む、例えばそれからなるtracr

を含む、例えばそれからなる、[1]に記載のgRNA分子。

[47]

配列：

(a) 配列番号355；

(b) 配列番号356；または

(c) 配列番号1765

を含む、例えばそれからなる、[1]に記載のgRNA分子。

[48]

(a) 配列番号357を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号6660を含む、例えばそれからなるtracr；

(b) 配列番号357を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号346を含む、例えばそれからなるtracr；

(c) 配列番号358を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号6660を含む、例えばそれからなるtracr；または

(d) 配列番号358を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号346を含む、例えばそれからなるtracr

を含む、例えばそれからなる、[1]に記載のgRNA分子。

[49]

配列：

(a) 配列番号359；

(b) 配列番号360；または

(c) 配列番号1766

を含む、例えばそれからなる、[1]に記載のgRNA分子。

[50]

(a) 配列番号361を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号6660を含む、例えばそれからなるtracr；

(b) 配列番号361を含む、例えばそれからなるcrrNA、および配列番号346を

含む、例えばそれからなる tracr ;

(c) 配列番号 362 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 660 を含む、例えばそれからなる tracr；または

(d) 配列番号 362 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[51]

配列：

(a) 配列番号 363；

(b) 配列番号 364；または

(c) 配列番号 1767

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[52]

(a) 配列番号 365 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 660 を含む、例えばそれからなる tracr；

(b) 配列番号 365 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr；

(c) 配列番号 366 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6660 を含む、例えばそれからなる tracr；または

(d) 配列番号 366 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[53]

配列：

(a) 配列番号 367；

(b) 配列番号 368；または

(c) 配列番号 1768

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[54]

(a) 配列番号 369 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6660 を含む、例えばそれからなる tracr；

(b) 配列番号 369 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr；

(c) 配列番号 370 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6660 を含む、例えばそれからなる tracr；または

(d) 配列番号 370 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[55]

配列：

(a) 配列番号 371；

(b) 配列番号 372；または

(c) 配列番号 1769

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[56]

(a) 配列番号 373 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6660 を含む、例えばそれからなる tracr；

(b) 配列番号 373 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr；

(c) 配列番号 374 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6660

を含む、例えばそれからなる tracr；または

(d) 配列番号 374 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[57]

配列：

(a) 配列番号 375；

(b) 配列番号 376；または

(c) 配列番号 1770

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[58]

(a) 配列番号 377 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6660 を含む、例えばそれからなる tracr；

(b) 配列番号 377 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr；

(c) 配列番号 378 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6660 を含む、例えばそれからなる tracr；または

(d) 配列番号 378 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[59]

配列：

(a) 配列番号 379；

(b) 配列番号 380；または

(c) 配列番号 1771

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[60]

(a) 配列番号 381 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6660 を含む、例えばそれからなる tracr；

(b) 配列番号 381 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr；

(c) 配列番号 382 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6660 を含む、例えばそれからなる tracr；または

(d) 配列番号 382 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[61]

配列：

(a) 配列番号 383；

(b) 配列番号 384；または

(c) 配列番号 1772

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の gRNA 分子。

[62]

(a) 配列番号 385 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6660 を含む、例えばそれからなる tracr；

(b) 配列番号 385 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を含む、例えばそれからなる tracr；

(c) 配列番号 386 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 6660 を含む、例えばそれからなる tracr；または

(d) 配列番号 386 を含む、例えばそれからなる crRNA、および配列番号 346 を

含む、例えばそれからなる t r a c r

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の g R N A 分子。

[6 3]

配列 :

(a) 配列番号 3 8 7 ;

(b) 配列番号 3 8 8 ; または

(c) 配列番号 1 7 7 3

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の g R N A 分子。

[6 4]

(a) 配列番号 3 8 9 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 6 6 6 0 を含む、例えばそれからなる t r a c r ;

(b) 配列番号 3 8 9 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 3 4 6 を含む、例えばそれからなる t r a c r ;

(c) 配列番号 3 9 0 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 6 6 6 0 を含む、例えばそれからなる t r a c r ; または

(d) 配列番号 3 9 0 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 3 4 6 を含む、例えばそれからなる t r a c r

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の g R N A 分子。

[6 5]

配列 :

(a) 配列番号 3 9 1 ;

(b) 配列番号 3 9 2 ; または

(c) 配列番号 1 7 7 4

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の g R N A 分子。

[6 6]

(a) 配列番号 3 9 3 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 6 6 6 0 を含む、例えばそれからなる t r a c r ;

(b) 配列番号 3 9 3 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 3 4 6 を含む、例えばそれからなる t r a c r ;

(c) 配列番号 3 9 4 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 6 6 6 0 を含む、例えばそれからなる t r a c r ; または

(d) 配列番号 3 9 4 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 3 4 6 を含む、例えばそれからなる t r a c r

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の g R N A 分子。

[6 7]

配列 :

(a) 配列番号 3 9 5 ;

(b) 配列番号 3 9 6 ; または

(c) 配列番号 1 7 7 5

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の g R N A 分子。

[6 8]

(a) 配列番号 3 9 7 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 6 6 6 0 を含む、例えばそれからなる t r a c r ;

(b) 配列番号 3 9 7 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 3 4 6 を含む、例えばそれからなる t r a c r ;

(c) 配列番号 3 9 8 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 6 6 6 0 を含む、例えばそれからなる t r a c r ; または

(d) 配列番号 3 9 8 を含む、例えばそれからなる c r R N A 、および配列番号 3 4 6 を含む、例えばそれからなる t r a c r

を含む、例えばそれからなる、[1] に記載の g R N A 分子。

[6 9]

前記 g RNA 分子を含む C R I S P R システム（例えば、本明細書に記載されるとおりの R N P ）が細胞に導入されると、インデルは、前記 g RNA 分子の前記標的化ドメインと相補的な前記標的配列にまたはその近傍に形成される、[1] ~ [6 8] のいずれか一項に記載の g RNA 分子。

[7 0]

前記インデルは、 G A T A - 1 または T A L - 1 結合部位のヌクレオチドを含まない、[6 9] に記載の g RNA 分子。

[7 1]

前記 g RNA 分子を含む C R I S P R システム（例えば、本明細書に記載されるとおりの R N P ）が細胞の集団に導入されると、インデルは、前記集団の細胞の少なくとも約 4 0 %、例えば少なくとも約 5 0 %、例えば少なくとも約 6 0 %、例えば少なくとも約 7 0 %、例えば少なくとも約 8 0 %、例えば少なくとも約 9 0 %、例えば少なくとも約 9 5 %、例えば少なくとも約 9 6 %、例えば少なくとも約 9 7 %、例えば少なくとも約 9 8 %、例えば少なくとも約 9 9 %において、前記 g RNA 分子の前記標的化ドメインと相補的な前記標的配列にまたはその近傍に形成される、[1] ~ [7 0] のいずれか一項に記載の g RNA 分子。

[7 2]

前記 g RNA 分子を含む C R I S P R システム（例えば、本明細書に記載されるとおりの R N P ）が細胞の集団に導入されると、 G A T A - 1 または T A L - 1 結合部位のヌクレオチドを含まないインデルは、前記集団の細胞の少なくとも約 2 0 %、例えば少なくとも約 3 0 %、例えば少なくとも約 3 5 %、例えば少なくとも約 4 0 %、例えば少なくとも約 4 5 %、例えば少なくとも約 5 0 %、例えば少なくとも約 5 5 %、例えば少なくとも約 6 0 %、例えば少なくとも約 6 5 %、例えば少なくとも約 7 0 %、例えば少なくとも約 7 5 %、例えば少なくとも約 8 0 %、例えば少なくとも約 8 5 %、例えば少なくとも約 9 0 %、例えば少なくとも約 9 5 %、例えば少なくとも約 9 9 %において、前記 g RNA 分子の前記標的化ドメインと相補的な前記標的配列にまたはその近傍に形成される、[1] ~ [6 8] のいずれか一項に記載の g RNA 分子。

[7 3]

前記インデルは、前記集団の細胞の少なくとも約 3 0 %、例えば少なくとも約 4 0 %、例えば少なくとも約 5 0 %、例えば少なくとも約 6 0 %、例えば少なくとも約 7 0 %、例えば少なくとも約 8 0 %、例えば少なくとも約 9 0 %、例えば少なくとも約 9 5 %、例えば少なくとも約 9 6 %、例えば少なくとも約 9 7 %、例えば少なくとも約 9 8 %、例えば少なくとも約 9 9 %において、図 2 5 、表 1 5 、表 2 6 、表 2 7 または表 3 7 のいずれかに挙げられるインデルである、[7 1] または [7 2] に記載の g RNA 分子。

[7 4]

前記細胞の集団中において最も高頻度で検出される 3 つのインデルは、図 2 5 、表 1 5 、表 2 6 、表 2 7 または表 3 7 のいずれかに挙げられる任意の g RNA 分子に関連するインデルを含む、[7 1] ~ [7 3] のいずれか一項に記載の g RNA 分子。

[7 5]

前記インデルは、次世代シーケンシング(N G S)によって計測されるとおりである、[6 9] ~ [7 4] のいずれか一項に記載の g RNA 分子。

[7 6]

前記 g RNA 分子を含む C R I S P R システム（例えば、本明細書に記載されるとおりの R N P ）が細胞に導入されると、胎児ヘモグロビンの発現は、前記細胞またはその子孫、例えばその赤血球系子孫、例えばその赤血球細胞子孫において増加する、[1] ~ [7 5] のいずれか一項に記載の g RNA 分子。

[7 7]

胎児ヘモグロビンの発現は、前記細胞またはその子孫、例えばその赤血球系子孫、例えばその赤血球細胞子孫において少なくとも約 2 0 %、例えば少なくとも約 3 0 %、例えば

少なくとも約40%、例えば少なくとも約50%、例えば少なくとも約60%、例えば少なくとも約70%、例えば少なくとも約80%、例えば少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%、例えば少なくとも約96%、例えば少なくとも約97%、例えば少なくとも約98%、例えば少なくとも約99%増加する、[76]に記載のgRNA分子。

[78]

前記細胞またはその子孫、例えばその赤血球系子孫、例えばその赤血球細胞子孫は、1細胞当たり少なくとも約6ピコグラム（例えば、少なくとも約7ピコグラム、少なくとも約8ピコグラム、少なくとも約9ピコグラム、少なくとも約10ピコグラム、または約8～約9ピコグラム、または約9～約10ピコグラム）の胎児ヘモグロビンを産生する、[76]または[77]に記載のgRNA分子。

[79]

前記gRNA分子を含むCRISPRシステム（例えば、本明細書に記載されるとおりのRNP）が細胞に導入されると、オフターゲットインデル、例えば次世代シーケンシングおよび/またはヌクレオチド挿入アッセイによって検出可能などおりのオフターゲットインデルは、前記細胞において形成されない、[1]～[78]のいずれか一項に記載のgRNA分子。

[80]

前記gRNA分子を含むCRISPRシステム（例えば、本明細書に記載されるとおりのRNP）が細胞の集団に導入されると、オフターゲットインデル、例えば次世代シーケンシングおよび/またはヌクレオチド挿入アッセイによって検出可能などおりのオフターゲットインデルは、前記細胞の集団の細胞の約5%超、例えば約1%超、例えば約0.1%超、例えば約0.01%超において検出されない、[1]～[78]のいずれか一項に記載のgRNA分子。

[81]

前記細胞は、哺乳動物細胞、靈長類細胞またはヒト細胞であり、例えばヒト細胞である（または細胞の集団はそれを含む）、[69]～[80]のいずれか一項に記載のgRNA分子。

[82]

前記細胞は、HSPCである（または細胞の集団はそれを含む）、[81]に記載のgRNA分子。

[83]

前記HSPCは、CD34+である、[82]に記載のgRNA分子。

[84]

前記HSPCは、CD34+CD90+である、[83]に記載のgRNA分子。

[85]

前記細胞は、前記細胞が投与される患者にとって自己由来である、[69]～[84]のいずれか一項に記載のgRNA分子。

[86]

前記細胞は、前記細胞が投与される患者にとって同種異系由来である、[69]～[84]のいずれか一項に記載のgRNA分子。

[87]

1) [1]～[86]のいずれか一項に記載の1つ以上のgRNA分子（第1のgRNA分子を含む）、およびCas9分子；

2) [1]～[86]のいずれか一項に記載の1つ以上のgRNA分子（第1のgRNA分子を含む）、およびCas9分子をコードする核酸；

3) [1]～[86]のいずれか一項に記載の1つ以上のgRNA分子（第1のgRNA分子を含む）をコードする核酸、およびCas9分子；

4) [1]～[86]のいずれか一項に記載の1つ以上のgRNA分子（第1のgRNA分子を含む）をコードする核酸、およびCas9分子をコードする核酸；または

5) 前記1)～4)のいずれか、および鑄型核酸；または

6) 前記 1) ~ 4) のいずれか、および鑄型核酸をコードする配列を含む核酸を含む組成物。

[8 8]

C a s 9 分子をさらに含む、[1] ~ [8 6] のいずれか一項に記載の第 1 の g R N A 分子を含む組成物。

[8 9]

前記 C a s 9 分子は、活性または不活性化膿レンサ球菌 (s . p y o g e n e s) C a s 9 である、[8 7] または [8 8] に記載の組成物。

[9 0]

前記 C a s 9 分子は、配列番号 6 6 1 1 を含む、[8 7] ~ [8 9] のいずれか一項に記載の組成物。

[9 1]

前記 C a s 9 分子は、

- (a) 配列番号 7 8 2 1 ;
- (b) 配列番号 7 8 2 2 ;
- (c) 配列番号 7 8 2 3 ;
- (d) 配列番号 7 8 2 4 ;
- (e) 配列番号 7 8 2 5 ;
- (f) 配列番号 7 8 2 6 ;
- (g) 配列番号 7 8 2 7 ;
- (h) 配列番号 7 8 2 8 ;
- (i) 配列番号 7 8 2 9 ;
- (j) 配列番号 7 8 3 0 ; または
- (k) 配列番号 7 8 3 1

を含む、例えばそれからなる、[8 7] ~ [8 9] のいずれか一項に記載の組成物。

[9 2]

前記第 1 の g R N A 分子および C a s 9 分子は、リボ核タンパク質複合体 (R N P) に存在する、[8 8] ~ [9 1] のいずれか一項に記載の組成物。

[9 3]

第 2 の g R N A 分子；第 2 の g R N A 分子および第 3 の g R N A 分子；または第 2 の g R N A 分子、任意選択で第 3 の g R N A 分子、および任意選択で第 4 の g R N A 分子をさらに含み、前記第 2 の g R N A 分子、前記任意選択の第 3 の g R N A 分子、および前記任意選択の第 4 の g R N A 分子は、[1] ~ [6 8] のいずれか一項に記載の g R N A 分子であり、前記組成物の各 g R N A 分子は、異なる標的配列と相補的である、[8 7] ~ [9 2] のいずれか一項に記載の組成物。

[9 4]

前記第 1 の g R N A 分子、前記第 2 の g R N A 分子、前記任意選択の第 3 の g R N A 分子、および前記任意選択の第 4 の g R N A 分子の 2 つ以上は、同じ遺伝子または領域内の標的配列と相補的である、[9 3] に記載の組成物。

[9 5]

前記第 1 の g R N A 分子、前記第 2 の g R N A 分子、前記任意選択の第 3 の g R N A 分子、および前記任意選択の第 4 の g R N A 分子は、2 0 0 0 0 ヌクレオチド以下、1 0 0 0 0 ヌクレオチド以下、6 0 0 0 以下、5 0 0 0 ヌクレオチド以下、4 0 0 0 以下、1 0 0 0 ヌクレオチド以下、5 0 0 ヌクレオチド以下、4 0 0 ヌクレオチド以下、3 0 0 ヌクレオチド以下、2 0 0 ヌクレオチド以下、1 0 0 ヌクレオチド以下、9 0 ヌクレオチド以下、8 0 ヌクレオチド以下、7 0 ヌクレオチド以下、6 0 ヌクレオチド以下、5 0 ヌクレオチド以下、4 0 ヌクレオチド以下、3 0 ヌクレオチド以下、2 0 ヌクレオチド以下または1 0 ヌクレオチド以下離れた標的配列と相補的である、[9 3] または [9 4] に記載の組成物。

[9 6]

前記第1のgRNA分子、前記第2のgRNA分子、前記任意選択の第3のgRNA分子、および前記任意選択の第4のgRNA分子の2つ以上は、異なる遺伝子または領域内の標的配列と相補的である、[93]に記載の組成物。

[97]

第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とを含み、前記第1のgRNA分子および第2のgRNA分子は、

(a) [4]に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的であるか；

(b) [5]に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的であるか；

(c) [6]に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的であるか；または

(d) [7]に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的であるか；または

(e) [41]～[56]のいずれか一項に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的である、[94]または[95]に記載の組成物。

[98]

第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とを含み、前記第1のgRNA分子および第2のgRNA分子は、

(a) [10]に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的であるか；または

(b) [11]に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的である、[94]または[95]に記載の組成物。

[99]

第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とを含み、前記第1のgRNA分子および第2のgRNA分子は、

(a) [13]に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的であるか；または

(b) [14]に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的である、[94]または[95]に記載の組成物。

[100]

第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とを含み、前記第1のgRNA分子および第2のgRNA分子は、

(a) [16]に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的であるか；

(b) [17]に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的であるか；

(c) [18]に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的であるか；または

(d) [57]～[68]のいずれか一項に記載のgRNA分子から独立して選択され、かつ異なる標的配列に相補的である、[94]～[96]のいずれか一項に記載の組成物。

[101]

第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とを含み、

(1) 前記第1のgRNA分子は、(a) [4]に記載のgRNA分子から選択されるか、(b) [5]に記載のgRNA分子から選択されるか、(c) [6]に記載のgRNA分子から選択されるか、(d) [7]に記載のgRNA分子から選択されるか、または(e) [41]～[56]のいずれか一項に記載のgRNA分子から選択され；および

(2) 前記第2のgRNA分子は、(a) [10]に記載のgRNA分子から選択されるか、または(b) [11]に記載のgRNA分子から選択される、[94]～[96]の

いずれか一項に記載の組成物。

[1 0 2]

第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とを含み、

- (1) 前記第1のgRNA分子は、(a) [4]に記載のgRNA分子から選択されるか、(b) [5]に記載のgRNA分子から選択されるか、(c) [6]に記載のgRNA分子から選択されるか、(d) [7]に記載のgRNA分子から選択されるか、または(e) [41]～[56]のいずれか一項に記載のgRNA分子から選択され；および
 (2) 前記第2のgRNA分子は、(a) [13]に記載のgRNA分子から選択され、
 (b) [14]に記載のgRNA分子から選択される、[94]～[96]のいずれか一項に記載の組成物。

[1 0 3]

第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とを含み、

- (1) 前記第1のgRNA分子は、(a) [4]に記載のgRNA分子から選択されるか、(b) [5]に記載のgRNA分子から選択されるか、(c) [6]に記載のgRNA分子から選択されるか、(d) [7]に記載のgRNA分子から選択されるか、または(e) [41]～[56]のいずれか一項に記載のgRNA分子から選択され；および
 (2) 前記第2のgRNA分子は、(a) [16]に記載のgRNA分子から選択されるか、(b) [17]に記載のgRNA分子から選択されるか、(c) [18]に記載のgRNA分子から選択されるか、または(d) [57]～[68]のいずれか一項に記載のgRNA分子から選択される、[94]～[96]のいずれか一項に記載の組成物。

[1 0 4]

第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とを含み、

- (1) 前記第1のgRNA分子は、(a) [10]に記載のgRNA分子から選択されるか、または(b) [11]に記載のgRNA分子から選択され；および
 (2) 前記第2のgRNA分子は、(a) [13]に記載のgRNA分子から選択され、
 (b) [14]に記載のgRNA分子から選択される、[94]～[96]のいずれか一項に記載の組成物。

[1 0 5]

第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とを含み、

- (1) 前記第1のgRNA分子は、(a) [10]に記載のgRNA分子から選択されるか、または(b) [11]に記載のgRNA分子から選択され；および
 (2) 前記第2のgRNA分子は、(a) [16]に記載のgRNA分子から選択されるか、(b) [17]に記載のgRNA分子から選択されるか、(c) [18]に記載のgRNA分子から選択されるか、または(d) [57]～[68]のいずれか一項に記載のgRNA分子から選択される、[94]～[96]のいずれか一項に記載の組成物。

[1 0 6]

第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とを含み、

- (1) 前記第1のgRNA分子は、(a) [13]に記載のgRNA分子から選択され、
 (b) [14]に記載のgRNA分子から選択され；および
 (2) 前記第2のgRNA分子は、(a) [16]に記載のgRNA分子から選択されるか、(b) [17]に記載のgRNA分子から選択されるか、(c) [18]に記載のgRNA分子から選択されるか、または(d) [57]～[68]のいずれか一項に記載のgRNA分子から選択される、[94]～[96]のいずれか一項に記載の組成物。

[1 0 7]

第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とを含み、

- (1) 前記第1のgRNA分子は、(a) [16]に記載のgRNA分子から選択されるか、(b) [17]に記載のgRNA分子から選択されるか、(c) [18]に記載のgRNA分子から選択されるか、または(d) [57]～[68]のいずれか一項に記載のgRNA分子から選択され；および(2) 前記第2のgRNA分子は、グロビン遺伝子の標的配列に相補的な標的化ドメインを含むか、または

(1) 前記第1のgRNA分子は、(a) [4]に記載のgRNA分子から選択されるか、(b) [5]に記載のgRNA分子から選択されるか、(c) [6]に記載のgRNA分子から選択されるか、(d) [7]に記載のgRNA分子から選択されるか、(e) [41]～[56]のいずれか一項に記載のgRNA分子から選択されるか、(f) [10]に記載のgRNA分子から選択されるか、(g) [11]に記載のgRNA分子から選択されるか、(h) [13]に記載のgRNA分子から選択されるか、または(i) [14]に記載のgRNA分子から選択され；および(2)前記第2のgRNA分子は、グロビン遺伝子の標的配列に相補的な標的化ドメインを含む、[96]に記載の組成物。

[108]

前記第1のgRNA分子および前記第2のgRNA分子は、[41]～[68]のいずれか一項に記載のgRNA分子から独立して選択される、[94]～[96]のいずれか一項に記載の組成物。

[109]

前記組成物の前記gRNA分子成分について、第1のgRNA分子と第2のgRNA分子とからなる、[87]～[108]のいずれか一項に記載の組成物。

[110]

前記gRNA分子の各々は、本明細書に記載されるCas9分子、例えば[90]または[91]に記載のCas9分子と共にリボ核タンパク質複合体(RNP)中にある、[87]～[109]のいずれか一項に記載の組成物。

[111]

錆型核酸を含み、前記錆型核酸は、前記第1のgRNA分子の前記標的配列にまたはその近傍にあるスクレオチドに対応するスクレオチドを含む、[87]～[110]のいずれか一項に記載の組成物。

[112]

前記錆型核酸は、
(a)ヒトグロビン、例えば突然変異G16D、E22AおよびT87Qの1つ以上を含むヒトグロビン、もしくはその断片；または

(b)ヒトグロビン、もしくはその断片をコードする核酸を含む、[111]に記載の組成物。

[113]

エレクトロポレーションに好適な媒体中に製剤化される、[87]～[112]のいずれか一項に記載の組成物。

[114]

前記gRNA分子の各々は、本明細書に記載されるCas9分子と共にRNP中にあり、前記RNPの各々は、約10μM未満、例えば約3μM未満、例えば約1μM未満、例えば約0.5μM未満、例えば約0.3μM未満、例えば約0.1μM未満の濃度である、[87]～[113]のいずれか一項に記載の組成物。

[115]

[1]～[68]のいずれか一項に記載の1つ以上のgRNA分子をコードする核酸配列。

[116]

前記核酸は、前記1つ以上のgRNA分子をコードする前記配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む、[115]に記載の核酸配列。

[117]

前記プロモーターは、RNAポリメラーゼIIまたはRNAポリメラーゼIIIによって認識されるプロモーターである、[116]に記載の核酸配列。

[118]

前記プロモーターは、U6プロモーターまたはH1プロモーターである、[117]に記載の核酸配列。

[119]

前記核酸は、C a s 9 分子をさらにコードする、[1 1 5] ~ [1 1 8] のいずれか一項に記載の核酸配列。

[1 2 0]

前記 C a s 9 分子は、配列番号 6 6 1 1、配列番号 7 8 2 1、配列番号 7 8 2 2、配列番号 7 8 2 3、配列番号 7 8 2 4、配列番号 7 8 2 5、配列番号 7 8 2 6、配列番号 7 8 2 7、配列番号 7 8 2 8、配列番号 7 8 2 9、配列番号 7 8 3 0、または配列番号 7 8 3 1 のいずれかを含む、[1 1 9] に記載の核酸配列。

[1 2 1]

前記核酸は、C a s 9 分子をコードする前記配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む、[1 1 9] または [1 2 0] に記載の核酸配列。

[1 2 2]

前記プロモーターは、E F - 1 プロモーター、C M V I E 遺伝子プロモーター、E F - 1 プロモーター、ユビキチン C プロモーター、またはホスホグリセリン酸キナーゼ (P G K) プロモーターである、[1 2 1] に記載の核酸配列。

[1 2 3]

[1 1 5] ~ [1 2 2] のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

[1 2 4]

前記ベクターは、レンチウイルスペクター、アデノウイルスペクター、アデノ隨伴ウイルス (A A V) ベクター、単純ヘルペスウイルス (H S V) ベクター、プラスミド、ミニサークル、ナノプラスミド、および R N A ベクターからなる群から選択される、[1 2 3] に記載のベクター。

[1 2 5]

細胞（例えば、細胞の集団）を前記細胞内の標的配列でまたはその近傍で改変する（例えば、核酸の構造（例えば、配列）を改変する）方法であって、前記細胞（例えば、細胞の集団）を、

1) [1] ~ [6 8] のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子、および C a s 9 分子；

2) [1] ~ [6 8] のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子、および C a s 9 分子をコードする核酸；

3) [1] ~ [6 8] のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子をコードする核酸、および C a s 9 分子；

4) [1] ~ [6 8] のいずれか一項に記載の 1 つ以上の g R N A 分子をコードする核酸、および C a s 9 分子をコードする核酸；

5) 前記 1) ~ 4) のいずれか、および鑄型核酸；

6) 前記 1) ~ 4) のいずれか、および鑄型核酸をコードする配列を含む核酸；

7) [8 7] ~ [1 1 4] のいずれか一項に記載の組成物；または

8) [1 2 3] または [1 2 4] に記載のベクター

と接触させる（例えば、それに導入する）ステップを含む方法。

[1 2 6]

前記 g R N A 分子または前記 g R N A 分子をコードする核酸と、前記 C a s 9 分子または前記 C a s 9 分子をコードする核酸とは、単一の組成物に製剤化される、[1 2 5] に記載の方法。

[1 2 7]

前記 g R N A 分子または前記 g R N A 分子をコードする核酸と、前記 C a s 9 分子または前記 C a s 9 分子をコードする核酸とは、2 つ以上の組成物に製剤化される、[1 2 5] に記載の方法。

[1 2 8]

前記 2 つ以上の組成物は、同時にまたは逐次的に送達される、[1 2 7] に記載の方法。

[1 2 9]

前記細胞は、動物細胞である、[125]～[128]のいずれか一項に記載の方法。

[130]

前記細胞は、哺乳動物細胞、靈長類細胞またはヒト細胞である、[125]～[128]のいずれか一項に記載の方法。

[131]

前記細胞は、造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）（例えば、HSPCの集団）である、[130]に記載の方法。

[132]

前記細胞は、CD34+細胞である、[125]～[131]のいずれか一項に記載の方法。

[133]

前記細胞は、CD34+CD90+細胞である、[125]～[132]のいずれか一項に記載の方法。

[134]

前記細胞は、CD34+細胞に関して富化された細胞の集団を含む組成物中に配置される、[125]～[133]のいずれか一項に記載の方法。

[135]

前記細胞（例えば、細胞の集団）は、骨髄、動員末梢血または臍帯血から単離されている、[125]～[134]のいずれか一項に記載の方法。

[136]

前記細胞は、前記細胞が投与される患者にとって自己由来または同種異系由来である、[125]～[135]のいずれか一項に記載の方法。

[137]

前記改変は、前記1つ以上のgRNA分子の前記標的化ドメインと相補的なゲノムDNA配列にまたはその近傍にインデルをもたらす、[125]～[136]のいずれか一項に記載の方法。

[138]

前記インデルは、図25、表15、表26、表27または表37に示されるインデルである、[137]に記載の方法。

[139]

前記インデルは、約40ヌクレオチド未満、例えば30ヌクレオチド未満、例えば20ヌクレオチド未満、例えば10ヌクレオチド未満の挿入または欠失である、[137]または[138]に記載の方法。

[140]

前記インデルは、単一のヌクレオチド欠失である、[139]に記載の方法。

[141]

細胞の集団をもたらし、前記集団の細胞の少なくとも約50%、例えば少なくとも約60%、例えば少なくとも約70%、例えば少なくとも約80%、例えば少なくとも約90%（例えば、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%）は、改変されている、例えばインデルを含む、[137]～[140]のいずれか一項に記載の方法。

[142]

前記改変は、赤血球系統の分化細胞（例えば、赤血球細胞）への分化能を有する細胞（例えば、細胞の集団）をもたらし、前記分化細胞は、胎児ヘモグロビンの増加したレベル、例えば非改変細胞（例えば、細胞の集団）と比べて胎児ヘモグロビンの増加したレベルを呈する、[125]～[141]のいずれか一項に記載の方法。

[143]

前記改変は、分化細胞の集団、例えば赤血球系統の細胞の集団（例えば、赤血球細胞の集団）への分化能を有する細胞の集団をもたらし、前記分化細胞の集団は、F細胞の増加した割合、例えば非改変細胞の集団と比べてF細胞の増加した割合（例えば、少なくとも

約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、または少なくとも約 40 %高い)を有する、[125]～[142]のいずれか一項に記載の方法。

[144]

前記改変は、分化細胞、例えば赤血球系統の細胞(例えば、赤血球細胞)への分化能を有する細胞をもたらし、前記分化細胞は、1細胞当たり少なくとも約 6 ピコグラム(例えば、少なくとも約 7 ピコグラム、少なくとも約 8 ピコグラム、少なくとも約 9 ピコグラム、少なくとも約 10 ピコグラム、または約 8～約 9 ピコグラム、または約 9～約 10 ピコグラム)の胎児ヘモグロビンを産生する、[125]～[142]のいずれか一項に記載の方法。

[145]

[125]～[144]のいずれか一項に記載の方法によって改変された細胞。

[146]

[125]～[144]のいずれか一項に記載の方法によって得ることが可能な細胞。

[147]

[1]～[68]のいずれか一項に記載の第 1 の gRNA 分子、または [87]～[14]のいずれか一項に記載の組成物、[115]～[122]のいずれか一項に記載の核酸、または [123]もしくは [124]に記載のベクターを含む細胞。

[148]

Cas9 分子を含む、[147]に記載の細胞。

[149]

前記 Cas9 分子は、配列番号 6611、配列番号 7821、配列番号 7822、配列番号 7823、配列番号 7824、配列番号 7825、配列番号 7826、配列番号 7827、配列番号 7828、配列番号 7829、配列番号 7830、または配列番号 7831 のいずれかを含む、[148]に記載の細胞。

[150]

[1]～[68]のいずれか一項に記載の第 2 の gRNA 分子、または [1]～[68]のいずれか一項に記載の第 2 の gRNA 分子をコードする核酸を含むか、それを含んでいたか、またはそれを含むことになり、前記第 1 の gRNA 分子および第 2 の gRNA 分子は、同一でない標的化ドメインを含む、[145]～[149]のいずれか一項に記載の細胞。

[151]

胎児ヘモグロビンの発現は、gRNA 分子を含むように修飾されていない同じ細胞型の細胞またはその子孫と比べて前記細胞またはその子孫(例えば、その赤血球系子孫、例えばその赤血球細胞子孫)において増加する、[145]～[150]のいずれか一項に記載の細胞。

[152]

分化細胞、例えば赤血球系統の細胞(例えば、赤血球細胞)への分化能を有し、前記分化細胞は、胎児ヘモグロビンの増加したレベル、例えば gRNA 分子を含むように修飾されていない同じタイプの細胞と比べて胎児ヘモグロビンの増加したレベルを呈する、[145]～[150]のいずれか一項に記載の細胞。

[153]

前記分化細胞(例えば、赤血球系統の細胞、例えば赤血球細胞)は、少なくとも約 6 ピコグラム(例えば、少なくとも約 7 ピコグラム、少なくとも約 8 ピコグラム、少なくとも約 9 ピコグラム、少なくとも約 10 ピコグラム、または約 8～約 9 ピコグラム、または約 9～約 10 ピコグラム)の胎児ヘモグロビンを、例えば gRNA 分子を含むように修飾されていない同じタイプの細胞と比べて、産生する、[152]に記載の細胞。

[154]

幹細胞増殖剤と接触されていた、[145]～[153]のいずれか一項に記載の細胞。

。

[155]

前記幹細胞増殖剤は、化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、またはこれらの組み合わせ（例えば、化合物1および化合物4）である、[154]に記載の細胞。

[156]

前記幹細胞増殖剤は、化合物4である、[155]に記載の細胞。

[157]

[1]～[68]のいずれか一項に記載のgRNA分子の前記標的化ドメインと相補的なゲノムDNA配列にまたはその近傍にインデルを含む細胞、例えば[145]～[156]のいずれか一項に記載の細胞。

[158]

前記インデルは、図25、表15、表26、表27または表37に示されるインデルである、[157]に記載の細胞。

[159]

前記インデルは、約40ヌクレオチド未満、例えば30ヌクレオチド未満、例えば20ヌクレオチド未満、例えば10ヌクレオチド未満の挿入または欠失である、[157]または[158]に記載の細胞。

[160]

前記インデルは、単一のヌクレオチド欠失である、[157]～[159]のいずれか一項に記載の細胞。

[161]

動物細胞である、[145]～[160]のいずれか一項に記載の細胞。

[162]

哺乳動物細胞、靈長類細胞またはヒト細胞である、[161]に記載の細胞。

[163]

造血幹細胞・前駆細胞(HSPC)（例えば、HSPCの集団）である、[145]～[162]のいずれか一項に記載の細胞。

[164]

CD34+細胞である、[145]～[163]のいずれか一項に記載の細胞。

[165]

CD34+CD90+細胞である、[164]に記載の細胞。

[166]

前記細胞（例えば、細胞の集団）は、骨髓、動員末梢血または臍帯血から単離されている、[145]～[165]のいずれか一項に記載の細胞。

[167]

前記細胞が投与される患者にとって自己由来である、[145]～[166]のいずれか一項に記載の細胞。

[168]

前記細胞が投与される患者にとって同種異系由来である、[145]～[166]のいずれか一項に記載の細胞。

[169]

[145]～[168]のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞の集団。

[170]

前記集団の細胞の少なくとも約50%、例えば少なくとも約60%、例えば少なくとも約70%、例えば少なくとも約80%、例えば少なくとも約90%（例えば、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%）は、[145]～[168]のいずれか一項に記載の細胞である、[169]に記載の細胞の集団。

[171]

分化細胞の集団、例えば赤血球系統の細胞の集団（例えば、赤血球細胞の集団）への分化能を有し、前記分化細胞の集団は、F細胞の増加した割合、例えば同じタイプの修飾されていない細胞の集団と比べてF細胞の増加した割合（例えば、少なくとも約15%、少

なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、または少なくとも約40%高い)を有する、[169]または[170]に記載の細胞の集団。

[172]

前記分化細胞の集団のF細胞は、1細胞当たり平均で少なくとも約6ピコグラム(例えば、少なくとも約7ピコグラム、少なくとも約8ピコグラム、少なくとも約9ピコグラム、少なくとも約10ピコグラム、または約8~約9ピコグラム、または約9~約10ピコグラム)の胎児ヘモグロビンを産生する、[171]に記載の細胞の集団。

[173]

1) 少なくとも 1×10^6 のCD34+細胞 / 前記細胞が投与される前記患者の体重kg、
2) 少なくとも 2×10^6 のCD34+細胞 / 前記細胞が投与される前記患者の体重kg、
3) 少なくとも 3×10^6 のCD34+細胞 / 前記細胞が投与される前記患者の体重kg、
4) 少なくとも 4×10^6 のCD34+細胞 / 前記細胞が投与される前記患者の体重kg、または
5) $2 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ のCD34+細胞 / 前記細胞が投与される前記患者の体重kg
を含む、[169]~[172]のいずれか一項に記載の細胞の集団。

[174]

前記集団の細胞の少なくとも約40%、例えば少なくとも約50%(例えば、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%)は、CD34+細胞である、[169]~[173]のいずれか一項に記載の細胞の集団。

[175]

前記集団の細胞の少なくとも約10%、例えば少なくとも約15%、例えば少なくとも約20%、例えば少なくとも約30%は、CD34+CD90+細胞である、[174]に記載の細胞の集団。

[176]

骨髄に由来する、[169]~[175]のいずれか一項に記載の細胞の集団。

[177]

哺乳動物細胞、例えばヒト細胞を含む、例えばそれからなる、[169]~[176]のいずれか一項に記載の細胞の集団。

[178]

前記細胞の集団が投与される患者に対して自己由来である、[169]~[177]のいずれか一項に記載の細胞の集団。

[179]

前記細胞の集団が投与される患者に対して同種異系由来である、[169]~[177]のいずれか一項に記載の細胞の集団。

[180]

[145]~[168]のいずれか一項に記載の細胞または[169]~[179]のいずれか一項に記載の細胞の集団を含む組成物。

[181]

薬学的に許容可能な媒体、例えば凍結保存に好適である薬学的に許容可能な媒体を含む、[180]に記載の組成物。

[182]

異常ヘモグロビン症を治療する方法であって、[145]~[168]のいずれか一項に記載の細胞、[169]~[179]のいずれか一項に記載の細胞の集団、または[180]もしくは[181]に記載の組成物を患者に投与するステップを含む方法。

[183]

哺乳動物における胎児ヘモグロビン発現を増加させる方法であって、[145]~[168]のいずれか一項に記載の細胞、[169]~[179]のいずれか一項に記載の細胞の集団、または[180]もしくは[181]に記載の組成物を患者に投与するステップを含む方法。

[184]

前記異常ヘモグロビン症は、 - サラセミアまたは鎌状赤血球症である、 [182] に記載の方法。

[185]

細胞（例えば、細胞の集団）を調製する方法であって、

(a) 細胞（例えば、細胞の集団）（例えば、HSPC（例えば、HSPCの集団））を提供するステップ；

(b) 幹細胞増殖剤を含む細胞培養培地で前記細胞（例えば、前記細胞の集団）をエキソビオで培養するステップ；および

(c) [1] ~ [68] のいずれか一項に記載の第1のgRNA分子、[1] ~ [68] のいずれか一項に記載の第1のgRNA分子をコードする核酸分子、[87] ~ [114] のいずれか一項に記載の組成物、[115] ~ [122] のいずれか一項に記載の核酸、または[123] もしくは[124] に記載のベクターを前記細胞に導入するステップを含む方法。

[186]

前記ステップ(c)の導入の後、前記細胞（例えば、細胞の集団）は、分化細胞（例えば、分化細胞の集団）、例えば赤血球系統の細胞（例えば、赤血球系統の細胞の集団）、例えば赤血球細胞（例えば、赤血球細胞の集団）への分化能を有し、前記分化細胞（例えば、分化細胞の集団）は、増加した胎児ヘモグロビン、例えばステップ(c)に供されていない同じ細胞と比べて増加した胎児ヘモグロビンを産生する、[185] に記載の方法。

[187]

前記幹細胞増殖剤は、化合物1、化合物2、化合物3、化合物4またはこれらの組み合わせ（例えば、化合物1および化合物4）である、[185] または[186] に記載の方法。

[188]

前記幹細胞増殖剤は、化合物4である、[187] に記載の方法。

[189]

前記細胞培養培地は、トロンボポエチン(Tpo)、Flt3リガンド(Flt-3L)、およびヒト幹細胞因子(SCF)を含む、[185] ~ [188] のいずれか一項に記載の方法。

[190]

前記細胞培養培地は、ヒトイントロイキン-6(IL-6)をさらに含む、[189] に記載の方法。

[191]

前記細胞培養培地は、トロンボポエチン(Tpo)、Flt3リガンド(Flt-3L)、およびヒト幹細胞因子(SCF)をそれぞれ約10ng/mL ~ 約1000ng/mLの範囲の濃度で含む、[189] または[190] に記載の方法。

[192]

前記細胞培養培地は、トロンボポエチン(Tpo)、Flt3リガンド(Flt-3L)、およびヒト幹細胞因子(SCF)をそれぞれ約50ng/mLの濃度、例えば50ng/mLの濃度で含む、[191] に記載の方法。

[193]

前記細胞培養培地は、ヒトイントロイキン-6(IL-6)を約10ng/mL ~ 約1000ng/mLの範囲の濃度で含む、[190] ~ [192] のいずれか一項に記載の方法。

[194]

前記細胞培養培地は、ヒトイントロイキン-6(IL-6)を約50ng/mLの濃度、例えば50ng/mLの濃度で含む、[193] に記載の方法。

[195]

前記細胞培養培地は、幹細胞増殖剤を約1nM ~ 約1mMの範囲の濃度で含む、[18]

5] ~ [1 9 4] のいずれか一項に記載の方法。

[1 9 6]

前記細胞培養培地は、幹細胞増殖剤を約 $1 \mu M$ ~ 約 $100 \mu M$ の範囲の濃度で含む、[1 9 5] に記載の方法。

[1 9 7]

前記細胞培養培地は、幹細胞増殖剤を約 $50 \mu M$ ~ 約 $75 \mu M$ の範囲の濃度で含む、[1 9 6] に記載の方法。

[1 9 8]

前記細胞培養培地は、幹細胞増殖剤を約 $50 \mu M$ の濃度、例えば $50 \mu M$ の濃度で含む、[1 9 7] に記載の方法。

[1 9 9]

前記細胞培養培地は、幹細胞増殖剤を約 $75 \mu M$ の濃度、例えば $75 \mu M$ の濃度で含む、[1 9 7] に記載の方法。

[2 0 0]

前記ステップ (b) の培養は、前記ステップ (c) の導入の前の培養期間を含む、[1 8 5] ~ [1 9 9] のいずれか一項に記載の方法。

[2 0 1]

前記ステップ (c) の導入の前の前記培養期間は、少なくとも 12 時間、例えば約 1 日 ~ 約 3 日の期間であり、例えば約 1 日 ~ 約 2 日の期間であり、例えば約 2 日の期間である、[2 0 0] に記載の方法。

[2 0 2]

前記ステップ (b) の培養は、前記ステップ (c) の導入の後の培養期間を含む、[1 8 5] ~ [2 0 1] のいずれか一項に記載の方法。

[2 0 3]

前記ステップ (c) の導入の後の前記培養期間は、少なくとも 12 時間、例えば約 1 日 ~ 約 10 日の期間であり、例えば約 1 日 ~ 約 5 日の期間であり、例えば約 2 日 ~ 約 4 日の期間であり、例えば約 2 日の期間であり、または約 3 日の期間であり、または約 4 日の期間である、[2 0 2] に記載の方法。

[2 0 4]

前記細胞の集団は、少なくとも 4 倍、例えば少なくとも 5 倍、例えば少なくとも 10 倍、例えばステップ (b) によって培養されていない細胞と比べて、増殖する、[1 8 5] ~ [2 0 3] のいずれか一項に記載の方法。

[2 0 5]

前記ステップ (c) の導入は、エレクトロポレーションを含む、[1 8 5] ~ [2 0 4] のいずれか一項に記載の方法。

[2 0 6]

前記エレクトロポレーションは、1 ~ 5 パルス、例えば 1 パルスを含み、各パルスは、700 ボルト ~ 2000 ボルトの範囲のパルス電圧であり、かつ 10 m s ~ 100 m s の範囲のパルス持続時間有する、[2 0 5] に記載の方法。

[2 0 7]

前記エレクトロポレーションは、1 パルスを含む、[2 0 6] に記載の方法。

[2 0 8]

前記パルス電圧は、1500 ~ 1900 ボルトの範囲、例えば 1700 ボルトである、[2 0 6] または [2 0 7] に記載の方法。

[2 0 9]

前記パルス持続時間は、 10 m s ~ 40 m s の範囲、例えば 20 m s である、[2 0 6] ~ [2 0 8] のいずれか一項に記載の方法。

[2 1 0]

ステップ (a) で提供される前記細胞（例えば、細胞の集団）は、ヒト細胞（例えば、ヒト細胞の集団）である、[1 8 5] ~ [2 0 9] のいずれか一項に記載の方法。

[2 1 1]

ステップ(a)で提供される前記細胞(例えば、細胞の集団)は、骨髄、末梢血(例えば、動員末梢血)または臍帯血から単離されたものである、[2 1 0]に記載の方法。

[2 1 2]

ステップ(a)で提供される前記細胞(例えば、細胞の集団)は、骨髄から単離されたものである、例えば異常ヘモグロビン症に罹患している患者の骨髄から単離されたものである、[2 1 1]に記載の方法。

[2 1 3]

ステップ(a)で提供される前記細胞の集団は、C D 3 4 + 細胞に関して富化されたものである、[1 8 5] ~ [2 1 2]のいずれか一項に記載の方法。

[2 1 4]

前記ステップ(c)の導入の後、前記細胞(例えば、細胞の集団)は、凍結保存される、[1 8 5] ~ [2 1 3]のいずれか一項に記載の方法。

[2 1 5]

前記ステップ(c)の導入の後、前記細胞(例えば、細胞の集団)は、前記第1のg R N A分子の前記標的化ドメインと相補的なゲノムD N A配列にまたはその近傍にインデルを含む、[1 8 5] ~ [2 1 4]のいずれか一項に記載の方法。

[2 1 6]

前記インデルは、図25、表15、表26、表27または表37に示されるインデルである、[1 3 2]に記載の方法。

[2 1 7]

前記ステップ(c)の導入の後、前記細胞の集団の細胞の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%は、前記第1のg R N A分子の前記標的化ドメインと相補的なゲノムD N A配列にまたはその近傍にインデルを含む、[1 8 5] ~ [2 1 6]のいずれか一項に記載の方法。

[2 1 8]

前記細胞の集団の細胞の各々における前記インデルは、図25、表15、表26、表27または表37に示されるインデルである、[2 1 7]に記載の方法。

[2 1 9]

[1 8 5] ~ [2 1 8]のいずれか一項に記載の方法によって得ることが可能な細胞(例えば、細胞の集団)。

[2 2 0]

異常ヘモグロビン症を治療する方法であって、[2 1 9]に記載の細胞(例えば、細胞の集団)を含む組成物をヒト患者に投与するステップを含む方法。

[2 2 1]

ヒト患者における胎児ヘモグロビン発現を増加させる方法であって、[2 1 9]に記載の細胞(例えば、細胞の集団)を含む組成物を前記ヒト患者に投与するステップを含む方法。

[2 2 2]

前記異常ヘモグロビン症は、- サラセニアまたは鎌状赤血球症である、[2 2 0]に記載の方法。

[2 2 3]

前記ヒト患者は、前記ヒト患者の体重1k g当たり少なくとも約1e6個の[2 1 9]に記載の細胞、例えば前記ヒト患者の体重1k g当たり少なくとも約1e6個の[2 1 9]に記載のC D 3 4 + 細胞を含む組成物を投与される、[2 2 0] ~ [2 2 2]のいずれか一項に記載の方法。

[2 2 4]

前記ヒト患者は、前記ヒト患者の体重1k g当たり少なくとも約2e6個の[2 1 9]

に記載の細胞、例えば前記ヒト患者の体重 1 kg 当たり少なくとも約 2 e 6 個の [219] に記載の C D 3 4 + 細胞を含む組成物を投与される、[223] に記載の方法。

[225]

前記ヒト患者は、前記ヒト患者の体重 1 kg 当たり約 2 e 6 ~ 約 10 e 6 個の [219] に記載の細胞、例えば前記ヒト患者の体重 1 kg 当たり少なくとも約 2 e 6 ~ 約 10 e 6 個の [219] に記載の C D 3 4 + 細胞を含む組成物を投与される、[223] に記載の方法。

[226]

薬剤として用いられる、[1] ~ [86] のいずれか一項に記載の g R N A 分子、[87] ~ [114] または [180] もしくは [181] のいずれか一項に記載の組成物、[115] ~ [122] のいずれか一項に記載の核酸、[123] または [124] に記載のベクター、[145] ~ [168] または [219] のいずれか一項に記載の細胞、あるいは [169] ~ [179] のいずれか一項に記載の細胞の集団。

[227]

薬剤の製造に用いられる、[1] ~ [86] のいずれか一項に記載の g R N A 分子、[87] ~ [114] または [180] もしくは [181] のいずれか一項に記載の組成物、[115] ~ [122] のいずれか一項に記載の核酸、[123] または [124] に記載のベクター、[145] ~ [168] または [219] のいずれか一項に記載の細胞、あるいは [169] ~ [179] のいずれか一項に記載の細胞の集団。

[228]

疾患の治療に用いられる、[1] ~ [86] のいずれか一項に記載の g R N A 分子、[87] ~ [114] または [180] もしくは [181] のいずれか一項に記載の組成物、[115] ~ [122] のいずれか一項に記載の核酸、[123] または [124] に記載のベクター、[145] ~ [168] または [219] のいずれか一項に記載の細胞、あるいは [169] ~ [179] のいずれか一項に記載の細胞の集団。

[229]

疾患の治療に用いられ、前記疾患は、異常ヘモグロビン症である、[1] ~ [86] のいずれか一項に記載の g R N A 分子、[87] ~ [114] または [180] もしくは [181] のいずれか一項に記載の組成物、[115] ~ [122] のいずれか一項に記載の核酸、[123] または [124] に記載のベクター、[145] ~ [168] または [219] のいずれか一項に記載の細胞、あるいは [169] ~ [179] のいずれか一項に記載の細胞の集団。

[230]

疾患の治療に用いられ、前記異常ヘモグロビン症は、 - サラセニアまたは鎌状赤血球症である、[1] ~ [86] のいずれか一項に記載の g R N A 分子、[87] ~ [114] または [180] もしくは [181] のいずれか一項に記載の組成物、[115] ~ [122] のいずれか一項に記載の核酸、[123] または [124] に記載のベクター、[145] ~ [168] または [219] のいずれか一項に記載の細胞、または [169] ~ [179] のいずれか一項に記載の細胞の集団。