

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-541457  
(P2023-541457A)

(43)公表日 令和5年10月2日(2023.10.2)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 C 0 8 7
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全83頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-516769(P2023-516769)	(71)出願人 519312511
(86)(22)出願日 令和3年9月14日(2021.9.14)	バイオアール バイオフーマ インコーポレーテッド
(85)翻訳文提出日 令和5年5月15日(2023.5.15)	VOR BIOPHARMA INC.
(86)国際出願番号 PCT/US2021/050328	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02140、ケンブリッジ、ケンブリッジパークドライブ 100、スイート 400
(87)国際公開番号 WO2022/056489	100 Cambridgepark Drive, Suite400, Cambridge, MA 02140, United States of America
(87)国際公開日 令和4年3月17日(2022.3.17)	
(31)優先権主張番号 63/078,035	(74)代理人 100102842
(32)優先日 令和2年9月14日(2020.9.14)	弁理士 葛和 清司
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	最終頁に続く
(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

(54)【発明の名称】 CD38修飾のための化合物および方法

(57)【要約】

本明細書では、例えば、細胞に修飾を行うために使用され得る、CD38を標的とする標的化ドメインを含むgRNAが提供される。また、本明細書では、CD38遺伝子に修飾(例えば、挿入または欠失)を有する遺伝子操作された細胞の方法、およびかかる遺伝子操作された細胞を、造血器悪性腫瘍を有する対象などの対象に投与することを伴う方法も提供される。

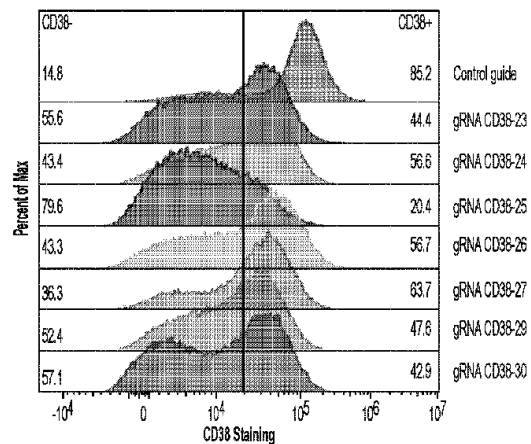


FIGURE 4A

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

標的化ドメインを含む gRNA であって、標的化ドメインが、表 1 ~ 5 に記載される配列を含む、前記 gRNA。

## 【請求項 2】

標的化ドメインを含む gRNA であって、標的化ドメインが、配列番号 12、58 ~ 84、85 ~ 155、および 180 ~ 190 のうちのいずれか 1 つの配列を含む、前記 gRNA。

## 【請求項 3】

gRNA が、第 1 の相補性ドメイン、結合ドメイン、第 1 の相補性ドメインに相補的である第 2 の相補性ドメイン、および近位ドメインを含む、請求項 1 または 2 に記載の gRNA。 10

## 【請求項 4】

gRNA が、単一ガイド RNA (sgRNA) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の gRNA。

## 【請求項 5】

gRNA が、化学的に修飾されている 1 つ以上のヌクレオチド残基を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の gRNA。

## 【請求項 6】

gRNA が、2' O - メチル部分を含む 1 つ以上のヌクレオチド残基を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の gRNA。 20

## 【請求項 7】

gRNA が、ホスホロチオアートを含有する 1 つ以上のヌクレオチド残基を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の gRNA。

## 【請求項 8】

gRNA が、チオ PACE 部分を含有する 1 つ以上のヌクレオチド残基を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の gRNA。

## 【請求項 9】

遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

a . 細胞を提供することと、 30

b . 前記細胞を、(i) 請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の gRNA、または gRNA もしくは請求項 1 ~ 8 のいずれか一項によって標的化される標的化ドメインを標的とする gRNA、および (ii) gRNA に結合する RNA 誘導ヌクレアーゼと接触させ、それにより、(i) の gRNA が (ii) の RNA 誘導ヌクレアーゼとリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成および / または維持するために好適な、かつ RNP 複合体が前記細胞のゲノム内の標的ドメインに結合するために好適な条件下で、RNP 複合体を形成することを含む、前記方法。

## 【請求項 10】

RNA 誘導ヌクレアーゼが、CRISPR / Cas ヌクレアーゼである、請求項 9 に記載の方法。 40

## 【請求項 11】

CRISPR / Cas ヌクレアーゼが、Cas9 ヌクレアーゼである、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

CRISPR / Cas ヌクレアーゼが、spCas ヌクレアーゼである、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 13】

Cas ヌクレアーゼが、saCas ヌクレアーゼである、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 14】

CRISPR / Cas ヌクレアーゼが、Cpf1 ヌクレアーゼである、請求項 10 に記 50

載の方法。

【請求項 15】

接触させることが、予備形成されたリボ核タンパク質 (RNP) 複合体の形態において (i) および (ii) を細胞に導入することを含む、請求項 9 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

接触させることが、(i) の gRNA および / または (ii) の RNA 誘導ヌクレアーゼをコードする核酸の形態において (i) および / または (ii) を細胞に導入することを含む、請求項 9 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

(i) の gRNA および / または (ii) の RNA 誘導ヌクレアーゼをコードする核酸が、RNA、好ましくは、mRNA または mRNA 類似体である、請求項 9 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

リボ核タンパク質複合体が、エレクトロポレーションを介して細胞に導入される、請求項 9 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

細胞が、造血細胞である、請求項 9 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

細胞が、造血幹細胞である、請求項 9 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

細胞が、造血前駆細胞である、請求項 9 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記細胞が、免疫エフェクター細胞である、請求項 9 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

細胞が、リンパ球である、請求項 9 ~ 18 または 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

細胞が、Tリンパ球である、請求項 9 ~ 18、22、または 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

遺伝子操作された細胞であって、細胞が、請求項 9 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法によって取得される、前記遺伝子操作された細胞。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の遺伝子操作された細胞を含む、細胞集団。

【請求項 27】

遺伝子操作された細胞を含む細胞集団であって、遺伝子操作された細胞が、表 1 ~ 5 のいずれかに記載されるとおりの標的化ドメインを含む gRNA に結合されたときに、RNA 誘導ヌクレアーゼによって切断された部位のすぐ近位の挿入または欠失からなるゲノム修飾を含む、前記細胞集団。

【請求項 28】

ゲノム修飾が、非相同末端結合 (NHEJ) 事象によって生成された挿入または欠失である、請求項 27 に記載の細胞集団。

【請求項 29】

ゲノム修飾が、相同誘導型修復 (HDR) 事象によって生成された挿入または欠失である、請求項 27 に記載の細胞集団。

【請求項 30】

ゲノム修飾が、かかるゲノム修飾を持つ遺伝子操作された細胞における CD38 の機能喪失をもたらす、請求項 27 ~ 29 のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項 31】

10

20

30

40

50

ゲノム修飾が、CD38のゲノム修飾を持たない同じ細胞型の野生型細胞におけるCD38の発現レベルと比較して、25%未満、20%未満、10%未満、5%未満、2%未満、1%未満、0.1%未満、0.01%未満、または0.001%未満までのCD38の発現の低減をもたらす、請求項27～30のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項32】

遺伝子操作された細胞が、造血幹または前駆細胞である、請求項27～31のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項33】

遺伝子操作された細胞が、免疫エフェクター細胞である、請求項27～31のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項34】

遺伝子操作された細胞が、Tリンパ球である、請求項27～31または33のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項35】

免疫エフェクター細胞が、キメラ抗原受容体(CAR)を発現する、請求項33または34に記載の細胞集団。

【請求項36】

CARが、CD38を標的とする、請求項35に記載の細胞集団。

【請求項37】

レシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着し、かつレシピエントにおける全ての血液系細胞型の分化した子孫を生成する能力によって特徴付けられる、請求項26～32のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項38】

少なくとも50%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる、請求項26～32または37のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項39】

少なくとも60%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる、請求項26～32、37、または38のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項40】

少なくとも70%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる、請求項26～32または37～39のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項41】

少なくとも80%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる、請求項26～32または37～40のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項42】

少なくとも90%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる、請求項26～32または37～41のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項43】

前記細胞集団が、未編集造血幹細胞の分化能力と同等である分化能によって特徴付けられるCD38編集造血幹細胞を含む、請求項26～32または37～42のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項44】

請求項25に記載の遺伝子操作された細胞または請求項26～43のいずれか一項に記載の細胞集団を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項45】

対象が、造血器悪性腫瘍を有するか、または造血器悪性腫瘍と診断されている、請求項

10

20

30

40

50

4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

有効量の C D 3 8 を標的とする薬剤を対象に投与することを更に含み、薬剤が、C D 3 8 に結合する抗原結合断片を含む、請求項 4 4 または 4 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、2020年9月14日に出版された米国仮出願第 6 3 / 0 7 8 , 0 3 5 号の米国特許法第 1 1 9 条 ( e ) に基づく利益を主張する。 10

【背景技術】

【0 0 0 2】

対象が、疾患または状態に関連する抗原を標的とする免疫療法、例えば、抗がん C A R - T 療法を施されるとき、当該療法は、標的化されることを意図している病的細胞だけでなく、標的抗原を発現し得る非病的細胞も枯渇させ得る。この「標的上・疾患外 ( on-t a r g e t , o f f - d i s e a s e ) 」効果が、いくつかの C A R - T 治療剤、例えば、C D 1 9 または C D 3 3 を標的とするものについて報告されている。標的抗原が、生存もしくは対象に必要とされる細胞の表面上に、または枯渇が対象の健康に著しい損害を与える細胞の表面上に発現される場合、対象は、免疫療法を受けることが可能ではない場合があるか、またはかかる療法を施されると、重度の副作用に直面しなければならない場合がある。他の事例では、免疫療法を構成する免疫エフェクター細胞上に、例えば、C A R - T 細胞の表面上に発現される抗原を標的とする免疫療法を施すことが望ましい場合があり、これは、フラトリサイドをもたらし、それぞれの治療剤を無効にするか、または生産することを事実上不可能にし得る。 20

【発明の概要】

【0 0 0 3】

本開示のいくつかの態様は、特定の免疫療法アプローチ、例えば、C A R - T 細胞または C A R - N K 細胞などの治療を必要とする対象における具体的な抗原を標的とするリンパ球エフェクター細胞を含む免疫治療剤の有害な標的上・疾患外効果に対処する組成物、方法、方略、および治療法を記載する。 30

【0 0 0 4】

本開示の態様は、表 1 ~ 5 に記載される配列を含む標的化ドメインを含む、ガイド R N A ( g R N A ) を提供する。いくつかの態様では、g R N A は、標的化ドメインを含み、標的化ドメインは、配列番号 1 2 , 5 8 ~ 8 4 , 8 5 ~ 1 5 5 , および 1 8 0 ~ 1 9 0 のうちのいずれか 1 つの配列を含む。いくつかの実施形態では、g R N A は、第 1 の相補性ドメインと、結合ドメインと、第 1 の相補性ドメインに相補的である第 2 の相補性ドメインと、近位ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、g R N A は、単一ガイド R N A ( s g R N A ) である。 40

【0 0 0 5】

いくつかの実施形態では、g R N A は、化学的に修飾されている 1 つ以上のヌクレオチド残基を含む。いくつかの実施形態では、g R N A は、2 ' O - メチル部分を含む 1 つ以上のヌクレオチド残基を含む。いくつかの実施形態では、g R N A は、ホスホロチオアートを 1 つ以上のヌクレオチド残基を含む。いくつかの実施形態では、g R N A は、チオ P A C E 部分を 1 つ以上のヌクレオチド残基を含む。 40

【0 0 0 6】

本開示の態様は、細胞を提供することと、細胞を、( i ) 本明細書に記載される g R N A のうちのいずれか、本明細書に記載される g R N A のうちのいずれかによって標的化される標的化ドメインを標的とする g R N A , および ( i i ) g R N A に結合する R N A 誘導ヌクレアーゼと接触させ、したがって、( i ) の g R N A が ( i i ) の R N A 誘導ヌク 50

レアーゼとリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成し、および/またはそれを維持するため、かつRNP複合体が細胞のゲノム内の標的ドメインに結合するために好適な条件下で、RNP複合体を形成することを含む、遺伝子操作された細胞を産生する方法を提供する。いくつかの実施形態では、接触させることは、予備形成されたリボ核タンパク質 (RNP) 複合体の形態で、(i) および (ii) を細胞に導入することを含む。いくつかの実施形態では、接触させることは、(i) の gRNA および/または (ii) の RNA 誘導ヌクレアーゼをコードする核酸の形態で、(i) および/または (ii) を細胞に導入することを含む。いくつかの実施形態では、(i) の gRNA および/または (ii) の RNA 誘導ヌクレアーゼをコードする核酸は、RNA、好ましくは、mRNA または mRNA 類似体である。いくつかの実施形態では、リボ核タンパク質複合体は、エレクトロポレーションを介して細胞に導入される。 10

【0007】

いくつかの実施形態では、RNA 誘導ヌクレアーゼは、CRISPR/Casヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、Cas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、spCas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、saCasヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、Cpf1ヌクレアーゼである。

【0008】

いくつかの実施形態では、細胞は、造血細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、造血幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、造血前駆細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、免疫エフェクター細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、リンパ球である。いくつかの実施形態では、細胞は、Tリンパ球である。 20

【0009】

本開示の態様は、本明細書に記載される方法のうちいずれかによって取得される遺伝子操作された細胞を提供する。本開示の態様は、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞を含む細胞集団を提供する。

【0010】

本開示の態様は、遺伝子操作された細胞を含む細胞集団を提供し、遺伝子操作された細胞は、表1~5のいずれかに記載される標的化ドメインを含むgRNAに結合されたときに、RNA誘導ヌクレアーゼによって切断された部位のすぐ近位の挿入または欠失からなるゲノム修飾を含む。いくつかの実施形態では、ゲノム修飾は、非相同末端結合 (NHEJ) 事象によって生成された挿入または欠失である。いくつかの実施形態では、ゲノム修飾は、相同誘導型修復 (HDR) 事象によって生成された挿入または欠失である。いくつかの実施形態では、ゲノム修飾は、かかるゲノム修飾を持つ遺伝子操作された細胞におけるCD38の機能喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、ゲノム修飾は、CD38のゲノム修飾を持たない同じ細胞型の野生型細胞におけるCD38の発現レベルと比較して、25%未満、20%未満、10%未満、5%未満、2%未満、1%未満、0.1%未満、0.01%未満、または0.001%未満までのCD38の発現の低減をもたらす。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、造血幹または前駆細胞である。 30 40

【0011】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、免疫エフェクター細胞である。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、キメラ抗原受容体 (CAR) を発現する。いくつかの実施形態では、CARは、CD38を標的とする。

【0012】

いくつかの実施形態では、細胞集団は、レシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着し、かつレシピエントにおける全ての血液系細胞型の分化した子孫を生成する能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも50%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる。いく 50

つかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも60%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも70%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも80%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも90%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞集団は、未編集造血幹細胞の分化能力と同等である分化能によって特徴付けられるCD38編集造血幹細胞を含む。

#### 【0013】

10

本開示の態様は、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞のうちのいずれかまたは本明細書に記載される細胞集団のうちのいずれかを、それを必要とする対象に投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、対象は、造血器悪性腫瘍を有するか、または造血器悪性腫瘍と診断されている。いくつかの実施形態では、本方法は、有効量のCD38を標的とする薬剤を対象に投与することを更に含み、薬剤は、CD38に結合する抗原結合断片を含む。

#### 【0014】

上記の要約は、非限定的な様式で、本明細書に開示される技術の実施形態、利点、特徴、および使用のうちのいくつかを例証するように意図されている。本明細書に開示される技術のその他の実施形態、利点、特徴、および使用が、発明を実施するための形態、図面、実施例、および特許請求の範囲から明らかであろう。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0015】

【図1】図1は、カルシウムによって誘発されるヒトCD38の触媒部位の立体配座閉鎖を含む、CD38の結晶構造(RCSBタンパク質データベースwww.rcsb.org/structure/3F6Yから検索された)を描写する。

【図2】図2は、ヒトCD38遺伝子に対する本明細書に記載されるガイドRNAの場所を示す概略図である。

【図3A-3B】図3A~3Fは、示された例示的なgRNAで編集されたヒトTリンパ芽球MOLT-4細胞のINDEL(挿入/欠失)分布を描写するグラフである。図3Aは、78.7%の全効率をもたらした、gRNA CD38-23を用いた編集を示す。図3Bは、82.8%の全効率をもたらした、gRNA CD38-7を用いた編集を示す。

30

【図3C-3D】図3Cは、80.4%の全効率をもたらした、gRNA CD38-12を用いた編集を示す。図3Dは、76.3%の全効率をもたらした、gRNA CD38-26を用いた編集を示す。

【図3E-3F】図3Eは、88.6%の全効率をもたらした、gRNA CD38-29を用いた編集を示す。図3Fは、85.3%の全効率をもたらした、gRNA CD38-9を用いた編集を示す。X軸は、INDELのサイズを示し、Y軸は、混合物中の具体的なINDELの割合を示す。

40

【図4A-4B】図4A~4Bは、CD38修飾Molt-4細胞を示す。CD38の発現が、フローサイトメトリーによって評価された。図4Aは、対照ガイドで編集された対照細胞(CD38を標的としない)、または示されたCD38 gRNA、すなわち、上から下に、gRNA CD38-23、gRNA CD38-24、gRNA CD38-25、gRNA CD38-26、gRNA CD38-27、gRNA CD38-29、およびgRNA CD38-30で編集された細胞におけるCD38発現を示す。CD38+細胞の割合が、右パネルに示され、CD38-細胞の割合が、左パネルに示される。X軸は、抗体染色の強度を示し、Y軸は、細胞数に対応する。図4Bは、上から下に、生/死細胞、モックエレクトロポレーション細胞(「モック」)、未染色対照細胞、野生型Molt-4細胞、およびガイド対照で編集された細胞(スクランブルされた非標

50

的化ガイド、「ガイド対照」)におけるCD38発現を示す。

【図5A - 5B】図5A ~ 5Gは、示された例示的なgRNAで編集されたヒトTリンパ芽球MOLT-4-細胞のINDEL(挿入/欠失)分布を描写するグラフである。図5Aは、85.8%の全効率をもたらした、gRNA CD38-23を用いた編集を示す。図5Bは、66.8%の全効率をもたらした、gRNA CD38-12を用いた編集を示す。

【図5C - 5D】図5Cは、64.2%の全効率をもたらした、gRNA CD38-7を用いた編集を示す。図5Dは、70.8%の全効率をもたらした、gRNA CD38-7を用いた編集を示す。

【図5E - 5F】図5Eは、74.4%の全効率をもたらした、gRNA CD38-7を用いた編集を示す。図5Fは、84%の全効率をもたらした、gRNA CD38-7を用いた編集を示す。

【図5G】図5Gは、80.4%の全効率をもたらした、gRNA CD38-7を用いた編集を示す。X軸は、INDELのサイズを示し、Y軸は、混合物中の具体的なINDELの割合を示す。

【図6】図6は、CD38の細胞外ドメイン(ECD)の結晶構造を示し、システイン296およびトリプトファン46(左)の場所をマーキングし、予測される全体的なCD38構造(右)を示す、略図である。結晶構造ファイルは、[www.rcsb.org/3d-view/1YH3](http://www.rcsb.org/3d-view/1YH3)で見出すことができる。予測される構造は、[alphafold.ebi.ac.uk/entry/P28907](http://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P28907)で見出すことができる。

【図7A - 7C】図7A ~ 7Cは、示されたCD38 gRNAを用いた編集の2日後および5日後のCD37+細胞上のCD38表面発現の喪失を示すグラフである。図7Aは、その表面上のCD38について陽性の細胞の割合を示す。図7Bは、CD38の幾何平均蛍光強度(gMFI)を示す。図7Cは、モックの割合(モックエレクトロポレーション細胞のgMFIに対するCD38編集細胞のgMFIに100を掛けたもの)を示す。各記号は、異なるドナーからの細胞を表す。図7Bおよび図7Cの列については、記号は、左から右に、モック、gRNA CD38-8、gRNA CD38-11、およびgRNA CD38-7に対応する。

【図8A - 8B】図8Aおよび8Bは、CD34+造血幹および前駆細胞(HSPC)におけるCD38編集効率およびINDELスペクトルを示すグラフである。図8Aは、3人の異なるヒトドナーから取得され、示されたCD38 gRNAでエレクトロポレーションされたCD34+の編集効率の割合を示す。図8Bは、エレクトロポレーション後5日目のINDELスペクトルを示す。

【図9】図9は、ヒトCD38遺伝子に対する本明細書に記載されるガイドRNAの場所を示す概略図である。下側の斜線付きのボックスは、CD38遺伝子内のエクソン1の位置を示す。矢印は、実施例6~8における検討のために選択されたgRNAによって標的化された位置を示す。

【図10A - 10B】図10Aおよび10Bは、示されたCD38 gRNAを用いたエレクトロポレーション後の様々な日でのCD34+造血幹および前駆細胞(HSPC)におけるCD38編集効率およびCD38表面発現を示すグラフである。図10Aは、CD34+造血幹および前駆細胞(HSPC)陽性細胞におけるCD38編集効率の割合を示す。図10Bは、CD38陽性細胞の割合を示す。

【図11A - 11B】図11Aおよび11Bは、示されたCD38 gRNA、対照gRNA(gCtrl)、CD33 gRNA(gCD33)、モックエレクトロポレーション(モック)、または野生型細胞を用いたエレクトロポレーション後の様々な日での全THP-1細胞および生存率を示すグラフである。図11Aは、総細胞数を示す。図11Bは、サンプル生存率の割合を示す。

【図12A - 12C】図12A ~ 12Cは、示されたCD38 gRNAまたは対照gRNA(対照)を用いたエレクトロポレーション後の様々な日でのTHP-1細胞CD38におけるCD38の編集効率および発現の喪失を示すグラフである。図12Aは、CD3

8 編集効率の割合を示す。図 1 2 B は、対照の割合としての C D 3 8 R N A 転写物発現レベルを示す。図 1 2 C は、C D 3 8 表面発現について陽性の細胞の割合を示す。

【図 1 3 A - 1 3 C】図 1 3 A ~ 1 3 C は、S T E M v i s i o n ( 商 標 ) コロニー計数アッセイを使用して測定された、示された C D 3 8 g R N A またはモックエレクトロポレーション ( モック ) でエレクトロポレーションされた C D 3 8 編集 C D 3 4 + 造血幹および前駆細胞 ( H S P C ) のコロニー計数を示すグラフである。図 1 3 A は、赤血球 ( B F U - E : パースト形成単位 ) コロニー形成を示す。図 1 3 B は、多能性骨髄前駆細胞 ( G E M M : 多能性骨髄前駆細胞のコロニー形成単位 ) コロニー形成を示す。図 1 3 C は、顆粒球 / マクロファージ ( G / M / G M : 顆粒球 / マクロファージ ) コロニー形成を示す。2 通りに各サンプルについて 4 0 0 個の C D 3 4 + H S P C である。

【図 1 4 A - 1 4 B】図 1 4 A ~ 1 4 C は、示された C D 3 8 g R N A を使用したヒトドナー造血幹および前駆細胞 ( H S P C ) の C R I S P R 編集によって生じた I N D E L スペクトルを示すグラフである。図 1 4 A ~ 1 4 C の各々について、エレクトロポレーションの 2 日後のバルク培養編集 H S P C の I N D E L スペクトルが、上部パネルに示され、エレクトロポレーションの 1 4 日後にコロニーから採取されたコロニー形成 H S P C の I N D E L スペクトルが、下部パネルに示される。図 1 4 A は、g R N A C D 3 8 - 8 を用いた編集を示す。図 1 4 B は、g R N A C D 3 8 - 1 1 を用いた編集を示す。

【図 1 4 C】図 1 4 C は、g R N A C D 3 8 - 7 を用いた編集を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本開示のいくつかの態様は、治療剤、例えば、免疫療法剤によって標的化される抗原の発現が欠損している、遺伝子組換え細胞、例えば、造血細胞に関連する組成物、方法、方略、および治療法を提供する。本明細書で提供される遺伝子組換え細胞は、例えば、特定の免疫療法剤に関連する特定の望ましくない効果、例えば、任意の標的上・疾患外細胞傷害性を軽減または完全に回避するために有用である。

【0017】

特定の免疫療法剤に関連するかかる望ましくない効果は、例えば、免疫療法の介入を必要とする対象内の健康な細胞が免疫療法剤によって標的化される抗原を発現するときを生じ得る。例えば、対象は、典型的には健康な細胞では発現されないが、対象内の非悪性細胞のサブセットでは比較的低いレベルで発現され得る、具体的な抗原の発現の上昇したレベルに関連する悪性腫瘍と診断され得る。免疫療法剤、例えば、C A R - T 細胞治療剤、または抗原を標的とする治療用抗体もしくは抗体薬物コンジュゲート ( A D C ) の対象への投与は、悪性細胞の効率的な殺傷をもたらし得るが、対象において抗原を発現する非悪性細胞の除去ももたらし得る。この標的上・疾患外細胞傷害性は、重大な副作用をもたらし、場合によっては、免疫療法剤の使用を完全に無効にし得る。

【0018】

本明細書で提供される組成物、方法、方略、および治療法は、特定の免疫療法剤の標的上・疾患外細胞傷害性の問題に対処する。例えば、本開示のいくつかの態様は、免疫療法剤によって標的化される抗原、またはその抗原の具体的な形態の発現の欠如をもたらす、そのゲノムに修飾を有する遺伝子操作された細胞を提供する。かかる遺伝子操作された細胞およびその子孫は、免疫療法剤によって標的化されず、したがって、免疫療法剤によってもたらされるいかなる細胞傷害性も受けない。例えば、細胞療法剤によって標的化かつ殺傷された可能性のある健康な細胞に取って代わるために、および / または細胞療法剤による標的化に耐性がある細胞の集団を提供するために、かかる細胞を、抗原を標的とする免疫療法剤を受けている対象に投与することができる。例えば、対象における健康な造血細胞が抗原を発現する場合、抗原を発現せず、したがって、細胞療法剤によって標的化されない、本明細書で提供される遺伝子操作された造血細胞、例えば、遺伝子操作された造血幹または前駆細胞が、対象に投与され得る。かかる造血幹または前駆細胞は、対象における造血ニッチに再集合することができ、その子孫は、細胞療法剤によって除去された可能性のあるいずれかを含む、様々な造血系統を再構成することができる。

10

20

30

40

50

## 【0019】

環状ADPリボースヒドロラーゼとも称されるCD38は、第2のメッセージの環状ADP-リボースを合成する45kDa糖タンパク質であり、ニコチン酸アデニンジヌクオチドリ酸CD38もまた、環状アデノシン5'-リン酸リボース(cADPr)ヒドロラーゼ活性を有することが報告されており、免疫細胞上の受容体として機能する。CD38は、2つの反対の膜配向で天然に存在する。例えば、Liu et al. PNAS (2017) 114 (31): 8283-8288を参照されたい。CD38の大部分は、触媒部位が細胞の外側に面している、II型膜配向を有する。しかしながら、CD38はまた、核膜、ミトコンドリア膜、および小胞体などの細胞膜の内表面に局在化することもできる。CD38のごく一部は、細胞内に誘導される触媒部位を有するIII型原形質膜タンパク質である。CD38の可溶性細胞内および細胞外形態も記載されている。

10

## 【0020】

CD38をコードする遺伝子は、ゲノム凝集データベース(gnomAD)を使用した分析に基づいて、タンパク質が2つのアイソフォームに存在すると報告されている、8つのエクソンからなる。

## 【0021】

CD38は、典型的には、健康な形質細胞ならびに他のリンパ系細胞および骨髄細胞、例えば、B細胞、NK細胞、骨髄前駆細胞、ならびに活性化TおよびBリンパ球、赤血球、血小板、臍帯血細胞を含む前駆細胞の表面上に発現される。例えば、Morandi et al. Front. Immunol. (2018)を参照されたい。リンパ系細胞および骨髄細胞に加えて、CD38はまた、腸上皮細胞、固有層、前立腺内の上皮細胞、中枢神経系の細胞、膵臓のベータ細胞、ならびに網膜および筋細胞などの固形組織でも発現され得る。

20

## 【0022】

健康な細胞上のその正常な発現に加えて、CD38はまた、血液がん細胞の表面上でも高度に発現される。例えば、高い均一なCD38発現が、多発性骨髄腫細胞などの悪性形質細胞上で報告されている。CD38はまた、B細胞慢性リンパ性白血病(B-CLL)などの白血病における予後マーカーとしても利用される。かかる悪性細胞上の高レベルの発現に起因して、CD38は、多数の治療剤が開発されている、かかる適応症に対する免疫療法のための魅力的な標的である。例えば、現在、CD38特異的キメラ抗原受容体を発現するエフェクターT細胞(CAR T細胞)、ならびに抗体治療剤、例えば、ダラツムマブ(Darzalex, Janssen Pharmaceuticals)、イツキシマブ(SAR650984, Sanofi)、MOR202(MorphoSys, I-Mab Biopharma)、TAK-079(Takeda)の使用を伴う、いくつかの継続中の臨床試験がある。

30

## 【0023】

正常で健康な細胞上の共有発現、ならびに悪性BまたはT細胞などの悪性細胞上の広く発現される抗原であることの両方に起因して、CD38の治療標的化は、健康な細胞に向けた実質的な「標的上・疾患外」活性をもたらし得る。具体的な免疫療法を使用したCD38の標的化は、健康なBまたはT細胞などの正常で健康な(非がん)細胞の殺傷に関連し、BまたはT細胞無形成と称される、一時的免疫抑制につながると報告されている。加えて、CD38特異的CAR T細胞療法は、療法の有効性を低減する、CAR T細胞のフラトリサイドに関連する。例えば、Huang et al. J Zhejiang Univ Sci B. 2020 Jan; 21(1): 29-41を参照されたい。

40

## 【0024】

本明細書では、CD38をコードする遺伝子の遺伝子修飾を特異的に誘導するために開発されたgRNAが記載される。また、本明細書では、修飾された細胞がCD38特異的免疫療法によって認識されないように、CD38が欠損しているか、またはCD38の発現が低減した、造血細胞、免疫細胞、リンパ球、およびかかる細胞の集団などの遺伝子組換え細胞を産生するためのかかるgRNAの使用も提供される。また、本明細書では、特

50

定の免疫療法剤の標的上・疾患外細胞傷害性の問題に対処するために、かかる細胞またはその組成物を対象に投与することを伴う、方法も提供される。いくつかの実施例では、本明細書に記載されるように、遺伝子組換え細胞は、例えば、CD38が欠損しているか、またはCD38の発現が低減し、したがって、CD38特異的免疫療法による殺傷に耐性があるT細胞などの系統に専念した細胞に進化することが可能である、CD38が欠損しているか、またはCD38の発現が低減した造血細胞である。代替的に、または加えて、いくつかの実施例では、本明細書に記載されるように、遺伝子組換え細胞は、CD38が欠損しているか、またはCD38の発現が低減し、したがって、他のCD38特異的CAR T細胞によるフラトリサイド殺傷に耐性がある、CD38特異的CAR T細胞などの免疫細胞である。

10

**【0025】**

遺伝子操作された細胞ならびに関連する組成物および方法

本開示のいくつかの態様は、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらす、そのゲノムにおける修飾を含む、遺伝子操作された細胞を提供する。いくつかの実施形態では、細胞のゲノムにおける修飾は、CD38をコードするゲノム配列における変異である。

**【0026】**

本明細書で使用される場合の「変異」という用語は、参照配列、例えば、かかる変異を有していない細胞の対応する配列、または対応する野生型核酸配列と比較して、核酸配列の変化（例えば、挿入、欠失、逆位、または置換）を指す。本明細書で提供されるいくつかの実施形態では、CD38をコードする遺伝子における変異は、変異を持つ細胞におけるCD38の発現の喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、CD38をコードする遺伝子における変異は、CD38を標的とする免疫療法剤によって結合されていないか、または遺伝子によってコードされる非変異CD38形態よりも著しく低いレベルで結合されている、CD38のバリエーション型の発現をもたらす。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるCD38遺伝子におけるゲノム変異を持つ細胞は、CD38を標的とする免疫療法剤、例えば、抗CD38抗体またはキメラ抗原受容体（CAR）によって結合されないか、または著しく低いレベルで結合される。

20

**【0027】**

本開示のいくつかの態様は、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞、例えば、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらす、そのゲノムにおける修飾を含む、遺伝子操作された細胞を生成するための組成物および方法を提供する。本明細書で提供されるかかる組成物および方法は、限定されるものではないが、例えば、CRISPR/CasヌクレアーゼなどのRNA誘導ヌクレアーゼを使用することによる、遺伝子操作された細胞のための好適な方略およびアプローチ、ならびにかかるRNA誘導ヌクレアーゼに結合し、それらを細胞のゲノム内の好適な標的部位に標的化して、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらす、ゲノム修飾を生じさせることが可能である好適なRNAを含む。

30

**【0028】**

いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞（例えば、遺伝子操作された造血幹もしくは前駆細胞または遺伝子操作された免疫エフェクター細胞などの遺伝子操作された造血細胞）が、「編集」とも称される標的化された変化を細胞のゲノムに導入することが可能な任意の技術を含む、ゲノム編集技術を介して生成される。

40

**【0029】**

1つの例示的な好適なゲノム編集技術は、細胞のゲノムに標的一本鎖または二本鎖DNA切断を導入するためのRNA誘導ヌクレアーゼ、例えば、CRISPR/Casヌクレアーゼの使用を含む、「細胞編集」であり、これは、例えば、非相同末端結合（NHEJ）、マイクロホモロジー媒介末端結合（「代替NHEJ」もしくは「alt-NHEJ」

50

と称されることもあるMMEJ)、または典型的には(例えば、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列挿入、欠失、逆位、または置換を介して)ヌクレーゼ切断の部位に、またはそのすぐ近位に改変された核酸配列をもたらす相同誘導型修復(HDR)などの細胞修復機構を誘起する。Yeh et al. Nat. Cell Biol. (2019) 21:1468-1478、例えば、Hsu et al. Cell (2014) 157:1262-1278、Jasin et al. DNA Repair (2016) 44:6-16、Sfeir et al. Trends Biochem. Sci. (2015) 40:701-714を参照されたい。

#### 【0030】

別の例示的な好適なゲノム編集技術は、「塩基編集」であり、これは、塩基エディタ、例えば、具体的な核酸塩基、例えば、細胞ミスマッチ修復機構を介して、CヌクレオチドからTヌクレオチドへの変化、またはAヌクレオチドからGヌクレオチドへの変化をもたらす、CまたはAヌクレオチドのシトシンまたはアデノシン核酸塩基を標的とし、脱アミン化する、デアミナーゼに融合されたヌクレーゼ損傷または部分的ヌクレーゼ損傷CRISPR/Casタンパク質の使用を含む。例えば、Komor et al. Nature (2016) 533:420-424、Rees et al. Nat. Rev. Genet. (2018) 19(12):770-788、Anzaolne et al. Nat. Biotechnol. (2020) 38:824-844を参照されたい。

10

#### 【0031】

更に別の例示的な好適なゲノム編集技術には、触媒的に損なわれたまたは部分的に触媒的に損なわれたRNA誘導ヌクレーゼ、例えば、操作された逆転写酵素(RT)ドメインに融合されたCRISPR/Casヌクレーゼを使用した、新しい遺伝情報、例えば、改変されたヌクレオチド配列の特異的に標的化されたゲノム部位への導入改を含む、「プライム編集」が含まれる。Cas/RT融合は、所望の編集をコードする核酸配列も含み、RTのためのプライマーとして機能することができる、ガイドRNAによってゲノム内の標的部位に標的化される。例えば、Anzaolone et al. Nature (2019) 576(7785):149-157を参照されたい。

20

#### 【0032】

ゲノム編集技術の使用は、典型的には、いくつかの実施形態では、例えば、塩基編集またはプライム編集のために、触媒的に損なわれるか、または部分的に触媒的に損なわれ得る、好適なRNA誘導ヌクレーゼの使用を特徴とする。好適なRNA誘導ヌクレーゼの例としては、CRISPR/Casヌクレーゼが挙げられる。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書で提供される細胞を遺伝子操作する方法で使用するための好適なRNA誘導ヌクレーゼは、Cas9ヌクレーゼ、例えば、spCas9またはsaCas9ヌクレーゼである。別の例について、いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作細胞の方法で使用するための好適なRNA誘導ヌクレーゼは、Cas12ヌクレーゼ、例えば、Cas12aヌクレーゼである。例示的な好適なCas12ヌクレーゼには、限定されるものではないが、AsCas12a、FnCas12a、他のCas12aオルソログ、およびMAD7システム(MAD7(商標)、Inscripta, Inc.)、またはAlt-R Cas12a(Cpf1)Ultraヌクレーゼ(Alt-R(登録商標)Cas12a Ultra、Integrated DNA Technologies, Inc.)などのCas12a誘導体が含まれる。例えば、Gill et al. LIPSCOMB 2017. In United States: Inscripta Inc., Price et al. Biotechnol. Bioeng. (2020) 117(60):1805-1816を参照されたい。

30

40

#### 【0033】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞(例えば、遺伝子操作された造血細胞、例えば、遺伝子操作された造血幹もしくは前駆細胞、または遺伝

50

子操作された免疫エフェクター細胞など)は、RNA誘導ヌクレアーゼが標的部位に結合し、細胞のゲノムDNAを切断するために好適な条件下で、RNA誘導ヌクレアーゼ、例えば、CRISPR/Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9ヌクレアーゼまたはCas12aヌクレアーゼなどを、細胞のゲノム内の好適な標的部位に標的化することによって生成される。好適なRNA誘導ヌクレアーゼは、好適なガイドRNA(gRNA)によってゲノム内の具体的な標的部位に標的化され得る。本開示の態様によるCRISPR/Casヌクレアーゼを標的化するための好適なgRNAが、本明細書で提供され、例示的な好適なgRNAが、本明細書の他の場所でより詳細に記載される。

#### 【0034】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCD38 gRNAは、CRISPR/Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9ヌクレアーゼと複合体化される。様々なCas9ヌクレアーゼが、例えば、CD38遺伝子にゲノム修飾を生成するために、本開示の態様によるゲノム編集を生じさせるために本明細書で提供されるgRNAとともに使用するために好適である。典型的には、CasヌクレアーゼおよびgRNAは、細胞のゲノム上の標的部位、例えば、CD38遺伝子内の標的部位を標的とする、Cas/gRNA複合体の形成に好適な形態および条件下で提供される。いくつかの実施形態では、Cas/gRNA複合体をCD38遺伝子内の所望の標的ドメインに標的化するための所望のPAM特異性を示す、Casヌクレアーゼが使用される。好適な標的ドメインおよび対応するgRNA標的化ドメイン配列が、本明細書で提供される。

#### 【0035】

いくつかの実施形態では、Cas/gRNA複合体が、例えば、インビトロで形成され、標的細胞が、例えば、細胞内へのCas/gRNA複合体のエレクトロポレーションを介して、Cas/gRNA複合体と接触される。いくつかの実施形態では、細胞は、別々にCasタンパク質およびgRNAと接触され、Cas/gRNA複合体は、細胞内に形成される。いくつかの実施形態では、細胞は、Casタンパク質をコードする核酸、例えば、DNAもしくはRNA、および/またはgRNAをコードする核酸、または両方と接触される。

#### 【0036】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された細胞は、好適なゲノム編集技術を使用して生成され、ゲノム編集技術は、Cas9ヌクレアーゼの使用によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、Cas9分子は、Streptococcus pyogenes (SpCas9)、Staphylococcus aureus (SaCas9)、もしくはStreptococcus thermophilus (stCas9)のものであるか、またはそれらに由来する。追加の好適なCas9分子としては、Neisseria meningitidis (NmCas9)、Acidovorax avenae、Actinobacillus pleuropneumoniae、Actinobacillus succinogenes、Actinobacillus suis、Actinomyces属、Cycliphilus denitrificans、Aminomonas paucivorans、Bacillus cereus、Bacillus smithii、Bacillus thuringiensis、Bacteroides属、Blastopirellula marina、Bradyrhizobium属、Brevibacillus laterosporus、Campylobacter coli、Campylobacter jejuni (CjCas9)、Campylobacter lari、Candidatus punicispirillum、Clostridium cellulolyticum、Clostridium perfringens、Corynebacterium accolens、Corynebacterium diphtheria、Corynebacterium matruchotii、Dinoroseobacter shibae、Eubacterium dolichum、gamma proteobacterium、Gluconacetobacter

10

20

30

40

50

*diazotrophicus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus sputorum*, *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter mustelae*, *Ilyobacter polytropus*, *Kingella kingae*, *Lactobacillus crispatus*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ceae bacterium*, *Methylocystis* 属、*Methylosinus trichosporium*, *Mobiluncus mulieris*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, 10  
*Neisseria* 属、*Neisseria wadsworthii*, *Nitrosomonas* 属、*Parvibaculum lavamentivorans*, *Pasteurella multocida*, *Phascolarctobacterium succinatutens*, *Ralstonia syzygii*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodovulum* 属、*Simonsiella muelleri*, *Sphingomonas* 属、*Sporolactobacillus vineae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus* 属、*Subdoligranulum* 属、*Tistrella mobilis*, *Treponema* 属、もしくは *Verminephrobacter eiseniae* のもの、またはそれらに由来するものが含まれる。いくつかの実施形態 20  
 では、かかる Cas9ヌクレアーゼの触媒的に損なわれたまたは部分的に損なわれたバリエーションが、使用され得る。追加の好適な Cas9ヌクレアーゼ、およびヌクレアーゼバリエーションが、本開示に基づいて当業者に明らかであろう。本開示は、この点に関して限定されない。

#### 【0037】

いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、天然に存在する Cas 分子である。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、例えば、少なくとも1つのアミノ酸残基だけ、参照配列、例えば、最も類似する天然に存在する Cas9 分子、または参照によりその全体で本明細書に組み込まれる PCT 公開 WO2015/157070 号の表 50 の配列と異なる、操作、改変、または修飾された Cas 分子である。 30

#### 【0038】

いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼのクラス2のV型に属する Casヌクレアーゼが使用される。クラス2のV型 Casヌクレアーゼは、V-A型、V-B型、V-C型、およびV-U型として更に分類することができる。例えば、Stella et al. *Nature Structural & Molecular Biology* (2017) を参照されたい。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、C2c1 などの V-B型 Cas エンドヌクレアーゼである。例えば、Shmakov et al. *Mol Cell* (2015) 60:385-397 を参照されたい。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるゲノム編集の方法で使用される Casヌクレアーゼは、Cpf1 (Cas12a)ヌクレアーゼなどの V-A型 Cas エンドヌクレアーゼである。例えば、Strohkendl et al. *Mol. Cell* (2018) 71:1-9 を参照されたい。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるゲノム編集の方法で使用される Casヌクレアーゼは、*Provetella* 属、もしくは *Francisella* 属、*Acidaminococcus* 属 (AsCpf1)、*Lachnospiraceae* 細菌 (LpCpf1)、または *Eubacterium rectale* に由来する 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、MAD7 (商標) (*Inscripta*) である。 40

#### 【0039】

CRISPR/Casヌクレアーゼの天然に存在するバリエーションおよび修飾されたバリエーションの両方が、本開示の態様による使用に好適である。例えば、dCas またはニッカ 50

ーゼバリエーション、改変された PAM 特異性を有する Cas バリエーション、および改善されたヌクレアーゼ活性を有する Cas バリエーションが、本開示のいくつかの実施形態によって包含される。

【0040】

いくつかの例示的で非限定的な好適な Cas ヌクレアーゼのいくつかの特徴が、いかなる特定の理論にも拘束されることを所望することなく、本明細書により詳細に記載される。

【0041】

天然に存在する Cas9 ヌクレアーゼは、典型的には、2つのローブ：認識 (REC) ローブおよびヌクレアーゼ (NUC) ローブを含み、その各々は、例えば、PCT 公開第 WO2015/157070 号、例えば、その中の図 9A~9B (その出願が参照によりその全体で本明細書に組み込まれる) に記載されるドメインを更に含む。

10

【0042】

REC ローブは、アルギニン豊富ブリッジヘリックス (BH)、REC1 ドメイン、および REC2 ドメインを含む。REC ローブは、Cas9 特異的機能ドメインであると考えられる。BH ドメインは、長いアルファヘリックスおよびアルギニン豊富領域であり、S. pyogenes Cas9 の配列のアミノ酸 60~93 を含む。REC1 ドメインは、例えば、gRNA または tracrRNA の反復：抗反復二本鎖の認識に関与する。REC1 ドメインは、S. pyogenes Cas9 の配列のアミノ酸 94~179 および 308~717 に2つの REC1 モチーフを含む。これら2つの REC1 ドメインは、線形一次構造では REC2 ドメインによって分離されているが、三次構造に集合し、REC1 ドメインを形成する。REC2 ドメインまたはその一部はまた、反復：抗反復二本鎖の認識において役割を果たし得る。REC2 ドメインは、S. pyogenes Cas9 の配列のアミノ酸 180~307 を含む。

20

【0043】

NUC ローブは、RuvC ドメイン (本明細書では RuvC 様ドメインとも称される)、HNH ドメイン (本明細書では HNH 様ドメインとも称される)、および PAM 相互作用 (PI) ドメインを含む。RuvC ドメインは、レトロウイルスインテグラーゼスーパーファミリーメンバーと構造的類似性を共有し、一本鎖、例えば、標的核酸分子の非相補鎖を切断する。RuvC ドメインは、それぞれ、S. pyogenes Cas9 の配列のアミノ酸 1~59、718~769、および 909~1098 において、3つの分割 RuvC モチーフ (当技術分野ではしばしば、RuvC I ドメイン、または N 末端 RuvC ドメイン、RuvC II ドメイン、および RuvC III ドメインと一般的に称される、RuvC I、RuvC II、および RuvC III) から組み立てられる。REC1 ドメインと同様に、3つの RuvC モチーフは、一次構造内の他のドメインによって直線的に分離されるが、三次構造では、3つの RuvC モチーフは、集合して RuvC ドメインを形成する。HNH ドメインは、HNH エンドヌクレアーゼと構造的類似性を共有し、一本鎖、例えば、標的核酸分子の相補鎖を切断する。HNH ドメインは、RuvC III - III モチーフの間に存在し、S. pyogenes Cas9 の配列のアミノ酸 775~908 を含む。PI ドメインは、標的核酸分子の PAM と相互作用し、S. pyogenes Cas9 の配列のアミノ酸 1099~1368 を含む。

30

40

【0044】

結晶構造が、天然に存在する細菌 Cas9 ヌクレアーゼ (例えば、Jinek et al., Science, 343 (6176): 1247997, 2014 を参照)、およびガイド RNA (例えば、crRNA および tracrRNA の合成融合) を有する S. pyogenes Cas9 (Nishimasu et al., Cell (2014) 156: 935-949、および Anders et al., Nature (2014) doi: 10.1038/nature13579 を参照) について決定されている。

【0045】

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される Cas 9 分子は、標的部位に、またはその直接近位に二本鎖 DNA 切断の導入をもたらす、ヌクレアーゼ活性を示す。いくつかの実施形態では、Cas 9 分子は、エンドヌクレアーゼの触媒残基のうちの 1 つを不活化するように修飾されている。いくつかの実施形態では、Cas 9 分子は、ニックアーゼであり、一本鎖切断を生じる。例えば、Dabrowska et al. *Frontiers in Neuroscience* (2018) 12 (75) を参照されたい。酵素の RuvC および HNH 触媒ドメイン内の 1 つ以上の変異が、Cas 9 効率を改善し得ることが示されている。例えば、Sarai et al. *Currently Pharma. Biotechnol.* (2017) 18 (13) を参照されたい。いくつかの実施形態では、Cas 9 分子は、第 2 のドメイン、例えば、DNA またはクロマチンを修飾するドメイン、例えば、デアミナーゼまたはデメチラーゼドメインに融合される。いくつかのかかる実施形態では、Cas 9 分子は、そのエンドヌクレアーゼ活性を排除するように修飾される。

10

## 【0046】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される Cas ヌクレアーゼまたは Cas / g RNA 複合体は、相同誘導型修復 (HDR) のためのテンプレートとともに投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される Cas ヌクレアーゼまたは Cas / g RNA 複合体は、HDR テンプレートを伴わずに投与される。

## 【0047】

いくつかの実施形態では、酵素の特異性を強化する (例えば、標的外効果を低減し、堅調な標的上切断を維持する) ように修飾される、Cas 9 ヌクレアーゼが使用される。いくつかの実施形態では、Cas 9 分子は、強化特異性 Cas 9 バリエーション (例えば、eSPCas9) である。例えば、Slaymaker et al. *Science* (2016) 351 (6268) : 84 - 88 を参照されたい。いくつかの実施形態では、Cas 9 分子は、高忠実度 Cas 9 バリエーション (例えば、SpCas9 - HF1) である。例えば、Kleinstiver et al. *Nature* (2016) 529 : 490 - 495 を参照されたい。

20

## 【0048】

様々な Cas ヌクレアーゼが、当技術分野で公知であり、様々な供給源から入手され、酵素の 1 つ以上の活性または特異性を調節するように操作 / 修飾され得る。好適な Cas ヌクレアーゼ、例えば、spCas9 および saCas9 などの好適な Cas 9 ヌクレアーゼの PAM 配列の選好および特異性が、当技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、Cas ヌクレアーゼは、1 つ以上の PAM 配列を認識するように操作 / 修飾されている。いくつかの実施形態では、Cas ヌクレアーゼは、Cas ヌクレアーゼが操作 / 修飾を伴わずに認識する PAM 配列とは異なる 1 つ以上の PAM 配列を認識するように操作 / 修飾されている。いくつかの実施形態では、Cas ヌクレアーゼは、酵素の標的外活性を低減するように操作 / 修飾されている。

30

## 【0049】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼ活性の特異性を改変する (例えば、標的外切断を低減し、細胞内のエンドヌクレアーゼ活性または存続期間を減少させ、相同誘導型組換えを増加させ、非相同末端結合を低減する) ように更に修飾される、Cas ヌクレアーゼが使用される。例えば、Komor et al. *Cell* (2017) 168 : 20 - 36 を参照されたい。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼの PAM 認識または選好を改変するように修飾される、Cas ヌクレアーゼが使用される。例えば、SpCas9 が、PAM 配列 NGG を認識する一方で、1 つ以上の修飾を含む SpCas9 のいくつかのバリエーション (例えば、VQR SpCas9、EQR SpCas9、VRE SpCas9) は、バリエーション PAM 配列、例えば、NGA、NGAG、および / または NGCG を認識し得る。別の例について、SaCas9 が、PAM 配列 NNRRR T を認識する一方で、1 つ以上の修飾を含む SaCas9 のいくつかのバリエーション (例えば、KKH SaCas9) は、PAM 配列 NNNRRR T を認識し得る。別の実施例では

40

50

、FnCas9が、PAM配列NNGを認識する一方で、FnCas9のバリエーションは、1つ以上の修飾（例えば、RHA-FnCas9）を含み、PAM配列YGを認識し得る。別の実施例では、置換変異S542RおよびK607Rを含むCas12aヌクレアーゼは、PAM配列TYCVを認識する。別の実施例では、置換変異S542R、K607R、およびN552Rを含むCpf1エンドヌクレアーゼは、PAM配列TATVを認識する。例えば、Gao et al. Nat. Biotechnol. (2017) 35 (8) : 789 - 792を参照されたい。

#### 【0050】

いくつかの実施形態では、1つより多く（例えば、2つ、3つ、またはそれ以上）のCas9分子が使用される。いくつかの実施形態では、Cas9分子のうち少なくとも1つは、Cas9酵素である。いくつかの実施形態では、Cas分子のうち少なくとも1つは、Cpf1酵素である。いくつかの実施形態では、Cas9分子のうち少なくとも1つは、Streptococcus pyogenesに由来する。いくつかの実施形態では、Cas9分子のうち少なくとも1つは、Streptococcus pyogenesに由来し、少なくとも1つのCas9分子は、Streptococcus pyogenesではない生物に由来する。

#### 【0051】

いくつかの実施形態では、塩基エディタが、CD38の発現の喪失、または免疫療法によって標的化されないCD38バリエーションの発現をもたらす、ゲノム修飾を生成するために使用される。塩基エディタは、典型的には、機能ドメイン、例えば、デアミナーゼドメインに融合された触媒的に不活性または部分的に不活性なCasヌクレアーゼを含む。例えば、Eid et al. Biochem. J. (2018) 475 (11) : 1955 - 1964、Rees et al. Nature Reviews Genetics (2018) 19 : 770 - 788を参照されたい。いくつかの実施形態では、触媒的に不活性なCasヌクレアーゼは、「死Cas」または「dCas」と称される。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、アデニン塩基エディタ（ABE）、例えば、RNAアデニンデアミナーゼTadAから進化したABEに融合されたdCasを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、シチジンデアミナーゼ酵素（例えば、APOBECデアミナーゼ、pmCDA1、活性化誘発性シチジンデアミナーゼ（AID））に融合されたdCasを含む。いくつかの実施形態では、触媒的に不活性なCas分子は、低減した活性を有し、例えば、ニックアーゼ（nCAsと称される）である。

#### 【0052】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、1つ以上のウラシルグリコシラーゼ阻害剤（UGI）ドメインに融合されたdCas9を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、アデニン塩基エディタ（ABE）、例えば、RNAアデニンデアミナーゼTadAから進化したABEに融合されたdCas9を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、シチジンデアミナーゼ酵素（例えば、APOBECデアミナーゼ、pmCDA1、活性化誘発性シチジンデアミナーゼ（AID））に融合されたdCas9を含む。いくつかの実施形態では、触媒的に不活性なCas9分子は、低減した活性を有し、nCAs9である。いくつかの実施形態では、触媒的に不活性なCas9分子（dCas9）は、1つ以上のウラシルグリコシラーゼ阻害剤（UGI）ドメインに融合される。いくつかの実施形態では、Cas9分子は、アデニン塩基エディタ（ABE）、例えば、RNAアデニンデアミナーゼTadAから進化したABEに融合された不活性Cas9分子（dCas9）を含む。いくつかの実施形態では、Cas9分子は、アデニン塩基エディタ（ABE）、例えば、RNAアデニンデアミナーゼTadAから進化したABEに融合されたnCAs9を含む。いくつかの実施形態では、Cas9分子は、シチジンデアミナーゼ酵素（例えば、APOBECデアミナーゼ、pmCDA1、活性化誘発性シチジンデアミナーゼ（AID））に融合されたdCas9を含む。いくつかの実施形態では、Cas9分子は、シチジンデアミナーゼ酵素（例えば、APOBECデアミナーゼ、pmCDA1、活性化誘発性シチジンデアミナーゼ（AID））に融合されたnCAs9を含む。

s 9 を含む。

【0053】

好適な塩基エディタの例としては、限定されるものではないが、BE1、BE2、BE3、HF-BE3、BE4、BE4max、BE4-Gam、YE1-BE3、EE-BE3、YE2-BE3、YEE-CE3、VQR-BE3、VREER-BE3、SaBE3、SaBE4、SaBE4-Gam、Sa(KKH)-BE3、Target-AID、Target-AID-NG、xBE3、eA3A-BE3、BE-PLUS、TAM、CRISPR-X、ABE7.9、ABE7.10、ABE7.10\*、xABE、ABESa、VQR-ABE、VREER-ABE、Sa(KKH)-ABE、およびCRISPR-SKIPが挙げられる。塩基エディタの追加の例は、例えば、参照によりそれらの全体で本明細書に組み込まれる、米国公開第2018/0312825A1号、米国公開第2018/0312828A1号、およびPCT公開第2018/165629A1号で見出すことができる。

10

【0054】

本開示のいくつかの態様は、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらす細胞のゲノムにおける修飾を生じさせるために、例えば、本明細書で提供されるRNA誘導ヌクレアーゼを細胞のゲノム内の好適な標的部位に標的化するために好適であるガイドRNAを提供する。

【0055】

「ガイドRNA」および「gRNA」という用語は、本明細書では同義的に使用され、核酸、典型的には、RNA誘導ヌクレアーゼによって結合され、標的核酸、例えば、細胞のゲノム内の標的部位へのRNA誘導ヌクレアーゼの特異的標的化またはホーミングを促進するRNAを指す。gRNAは、典型的には、少なくとも2つのドメイン：RNA誘導ヌクレアーゼへの結合を媒介する「gRNA足場」または「gRNA骨格」と称されることもある（「結合ドメイン」とも称される）「結合ドメイン」、および標的部位へのgRNA結合RNA誘導ヌクレアーゼの標的化を媒介する「標的化ドメイン」を含む。いくつかのgRNAは、追加のドメイン、例えば、相補性ドメイン、またはステムループドメインを含む。天然に存在するgRNA結合ドメインおよびその操作されたバリエーションの構造および配列は、当業者に周知されている。いくつかの好適なgRNAが、単一の核酸配列を含む単分子である一方で、他の好適なgRNAは、2つの配列（例えば、crRNAおよびtracrRNA配列）を含む。

20

30

【0056】

いくつかの例示的な好適なCas9 gRNA足場配列が本明細書で提供され、追加の好適なgRNA足場配列が、本開示に基づいて当業者に明らかであろう。かかる追加の好適な足場配列には、限定されるものではないが、Jinek, et al. Science (2012) 337(6096): 816-821、Ran, et al. Nature Protocols (2013) 8: 2281-2308、PCT公開第WO2014/093694号、およびPCT公開第WO2013/176772号に記載されているものが含まれる。

40

【0057】

例えば、天然に存在するspCas9 gRNAの結合ドメインは、典型的には、crRNA（部分的に）およびtracrRNAという2つのRNA分子を含む。例えば、テトラループを介して、またはクリックケミストリー型共有結合を介して、互いに共有結合されたcrRNAおよびtracrRNA配列の両方を含む、単一のRNA分子のみを含むspCas9 gRNAのバリエーションが、操作されており、一般的に「単一ガイドRNA」または「sgRNA」と称される。天然に存在するCas12aガイドRNAが単一のRNA分子を含むため、他のCasヌクレアーゼ、例えば、Cas12aヌクレアーゼとともに使用するための好適なgRNAは、典型的には、単一のRNA分子のみを含む。したがって、好適なgRNAは、本明細書ではsgRNAと称されることもある、単分子

50

(単一のRNA分子を有する)、またはモジュール式(1つより多く、典型的には、2つの別個のRNA分子を含む)であり得る。

【0058】

CD38遺伝子内の標的部位を標的とするために好適なgRNAは、いくつかのドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、例えば、Cas9ヌクレアーゼが使用されるいくつかの実施形態では、単分子sgRNAは、5'から3'まで、

CD38遺伝子内の標的部位配列に対応する標的化ドメインと、

第1の相補性ドメインと、

結合ドメインと、

第2の相補性ドメイン(第1の相補性ドメインに相補的である)と、

近位ドメインと、

任意選択的に、テールドメインとを含み得る。

10

【0059】

これらのドメインの各々が、ここでより詳細に記載される。

【0060】

本明細書で提供されるgRNAは、典型的には、細胞のゲノム内の標的部位に結合する標的化ドメインを含む。標的部位は、典型的には、PAM配列と、PAM配列と同一の鎖上に、かつそれに直接隣接して、標的ドメインとを含む、二本鎖DNA配列である。gRNAの標的化ドメインは、典型的には、時として1つ以上のミスマッチを伴う標的ドメインの配列に類似するが、典型的には、DNA配列の代わりにRNAを含むという点で標的ドメイン配列に対応する、RNA配列を含む。したがって、gRNAの標的化ドメインは、(完全または部分的相補性で)標的ドメインの配列に相補的である二本鎖標的部位の配列と、したがって、PAM配列を含む鎖に相補的である鎖と塩基対合する。gRNAの標的化ドメインは、典型的には、PAM配列を含まないことが理解されるであろう。PAMの場所は、採用されるヌクレアーゼに応じて、標的ドメイン配列の5'または3'であり得ることが更に理解されるであろう。例えば、PAMは、典型的には、Cas9ヌクレアーゼについては標的ドメイン配列の3'、Cas12aヌクレアーゼについては標的ドメイン配列の5'である。PAMの場所および標的部位に結合するgRNAの機構の例証については、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Vanegas et al., Fungal Biol Biotechnol. 2019; 6:6の図1を参照されたい。RNA誘導ヌクレアーゼを標的部位に標的化するgRNAの機構の追加の例証および説明については、両方とも参照により本明細書に組み込まれる、Fu Y et al., Nat Biotechnol. 2014 (doi: 10.1038/nbt.2808)およびSternberg SH et al., Nature 2014 (doi: 10.1038/nature13011)を参照されたい。

20

30

【0061】

標的化ドメインは、標的ドメインの配列に対応するヌクレオチド配列、すなわち、PAM配列に直接隣接するDNA配列(例えば、Cas9ヌクレアーゼについてはPAM配列の5'、またはCas12aヌクレアーゼについてはPAM配列の3')を含み得る。標的化ドメイン配列は、典型的には、17~30個のヌクレオチドを含み、標的ドメイン配列に完全に対応する(すなわち、いかなるミスマッチヌクレオチドも伴わない)か、または1つ以上であるが典型的には4つ以下のミスマッチを含み得る。標的化ドメインが、RNA分子の一部であるため、gRNAが、典型的には、リボヌクレオチドを含む一方で、DNA標的化ドメインは、デオキシリボヌクレオチドを含むであろう。

40

【0062】

22ヌクレオチド標的ドメインおよびNGG PAM配列を含むCas9標的部位、ならびに標的ドメインに完全に対応する(したがって、標的ドメインおよびPAMを含む鎖に相補的なDNA鎖と完全な相補性で塩基対合する)標的化ドメインを含むgRNAの例示的な例証が、以下に提供される。

50



の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメイン配列に対して2つのミスマッチを含む。いくつかの実施形態では、標的ドメインは、標的ドメイン配列に対して3つのミスマッチを含む。

【0065】

いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、例えば、参照によりその全体で組み込まれる、PCT公開第WO2015/157070号に記載されるように、コアダメインと、二次標的化ドメインとを含む。いくつかの実施形態では、コアダメインは、標的化ドメインの3'末端から約8~約13個のヌクレオチド(例えば、標的化ドメインの最も3'位の8~13個のヌクレオチド)を含む。いくつかの実施形態では、二次ドメインは、コアダメインに対して5'に位置付けられる。いくつかの実施形態では、コアダメインは、標的ドメイン配列またはその一部に完全に対応する。他の実施形態では、コアダメインは、標的ドメイン配列の対応するヌクレオチドとミスマッチである、1つ以上のヌクレオチドを含み得る。

10

【0066】

いくつかの実施形態では、例えば、Cas9 gRNAが提供されるいくつかの実施形態では、gRNAは、第1の相補性ドメインと、第2の相補性ドメインを含み、第1の相補性ドメインは、第2の相補性ドメインと相補的であり、少なくともいくつかの実施形態では、少なくともいくつかの生理学的条件下で二本鎖領域を形成するために、第2の相補性ドメインに対して十分な相補性を有する。いくつかの実施形態では、第1の相補性ドメインは、長さが5~30個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、第1の相補性ドメインは、5'から3'の方向に、5'サブドメイン、中央サブドメイン、および3'サブドメインである、3つのサブドメインを含む。いくつかの実施形態では、5'サブドメインは、長さが4~9個、例えば、4、5、6、7、8または9個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、中央サブドメインは、長さが1つ、2つ、または3つ、例えば、1つのヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、3'サブドメインは、長さが3~25個、例えば、4~22個、4~18個、または4~10個、または3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個のヌクレオチドである。第1の相補性ドメインは、天然に存在する第1の相補性ドメインと同一性を共有するか、またはそれに由来し得る。一実施形態では、これは、S. pyogenes、S. aureus、またはS. thermophilusの第1の相補性ドメインと少なくとも50%の同一性を有する。

20

サ

30

【0067】

上述のドメインの配列および配置は、その中のページ88~112を含む、参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2015/157070号により詳細に記載されている。

【0068】

結合ドメインは、単分子gRNAの第1の相補性ドメインを第2の相補性ドメインと結合する役割を果たし得る。結合ドメインは、第1および第2の相補性ドメインを共有結合的または非共有結合的に結合することができる。いくつかの実施形態では、結合は、共有結合である。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、第1の相補性ドメインと第2の相補性ドメインとの間に介在する共有結合であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、1つ以上、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2018/126176号に開示される、少なくとも1つの非ヌクレオチド結合を含む。

40

【0069】

いくつかの実施形態では、第2の相補性ドメインは、少なくとも部分的に、第1の相補性ドメインと相補的であり、一実施形態では、少なくともいくつかの生理学的条件下で二本鎖領域を形成するために第2の相補性ドメインに対して十分な相補性を有する。いくつかの実施形態では、第2の相補性ドメインは、第1の相補性ドメインとの相補性を欠く配

50

列、例えば、二本鎖領域からループを作る配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、第2の相補性ドメインは、長さが5～27個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、第2の相補性ドメインは、第1の相補性領域よりも長い。一実施形態では、相補ドメインは、長さが5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、第2の相補性ドメインは、5'から3'の方向に、5'サブドメイン、中央サブドメイン、および3'サブドメインである、3つのサブドメインを含む。いくつかの実施形態では、5'サブドメインは、長さが3～25個、例えば、4～22個、4～18個、または4～10個、または3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、中央サブドメインは、長さが1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ、例えば、3つのヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、3'サブドメインは、長さが4～9個、例えば、4、5、6、7、8または9個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、第1の相補性ドメインの5'サブドメインおよび3'サブドメインは、それぞれ、第2の相補性ドメインの3'サブドメインおよび5'サブドメインと相補的、例えば、完全に相補的である。

10

#### 【0070】

いくつかの実施形態では、近位ドメインは、長さが5～20個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、近位ドメインは、天然に存在する近位ドメインと同一性を共有するか、またはそれに由来し得る。一実施形態では、これは、*S. pyogenes*、*S. aureus*、または*S. thermophilus*と少なくとも50%の同一性を有する。

20

#### 【0071】

広範囲のテールドメインが、gRNAで使用するために好適である。いくつかの実施形態では、テールドメインは、長さが0（不在）、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、テールドメインヌクレオチドは、天然に存在するテールドメインの5'末端からの配列に由来するか、またはそれと同一性を共有する。いくつかの実施形態では、テールドメインは、互いに相補的であり、少なくともいくつかの生理学的条件下で二本鎖領域を形成する配列を含む。いくつかの実施形態では、テールドメインは、存在しないか、または長さが1～50個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、テールドメインは、天然に存在する近位テールドメインと同一性を共有するか、またはそれに由来し得る。いくつかの実施形態では、テールドメインは、*S. pyogenes*、*S. aureus*、または*S. thermophilus*由来のテールドメインと少なくとも50%の同一性/同一性を有する。いくつかの実施形態では、テールドメインは、3'末端に、インビトロまたはインビボ転写の方法に関連するヌクレオチドを含む。

30

#### 【0072】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるgRNAは、

例えば、5'から3'の方向に、

標的化ドメイン（CD38遺伝子内の標的ドメインに対応する）と、

第1の相補性ドメインと、を含む、第1の鎖と、

40

例えば、5'から3'の方向に、

任意選択的に、5'拡張ドメインと、

第2の相補性ドメインと、

近位ドメインと、

任意選択的に、テールドメインと、を含む、第2の鎖とを含む。

#### 【0073】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるgRNAのうちのいずれかは、化学的に修飾されている1つ以上のヌクレオチドを含む。gRNAの化学修飾は、以前に記載されており、好適な化学修飾には、gRNA機能のために有益であり、所与のgRNAの任

50

意の望ましくない特性、例えば、標的外効果を計測可能に増加させない、任意の修飾が含まれる。好適な化学修飾としては、例えば、gRNAがエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ触媒活性の影響をあまり受けなくするものが挙げられ、限定されるものではないが、ホスホロチオアート骨格修飾、2'-O-Me修飾（例えば、3'および5'末端の一方または両方における）、2'F修飾、二環式ヌクレオチド-cEtによるリボース糖の置き換え、3'チオPACE(MSP)修飾、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。追加の好適なgRNA修飾が、本開示に基づいて当業者に明らかとなり、かかる好適なgRNA修飾としては、限定されるものではないが、例えば、各々が参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、Rahdar et al. PNAS (2015) 112(51)E7110-E7117、およびHendel et al., Nat Biotechnol. (2015); 33(9):985-989に記載されているものが挙げられる。

10

## 【0074】

例えば、本明細書で提供されるgRNAは、1つ以上の2'-O修飾ヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、gRNAは、gRNAの5'末端に、2'-O修飾ヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、gRNAの3'末端に、2'-O修飾ヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、gRNAの5'および3'末端の両方に、2'-O修飾ヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾され、例えば、gRNAの5'末端におけるヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第2のヌクレオチド、およびgRNAの5'末端からの第3のヌクレオチドで、2'-O-メチル修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾され、例えば、gRNAの3'末端におけるヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、およびgRNAの3'末端からの第3のヌクレオチドで、2'-O-メチル修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾され、例えば、gRNAの5'末端におけるヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第2のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第3のヌクレオチド、gRNAの3'末端におけるヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、および3'末端からの第3のヌクレオチドで、2'-O-メチル修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾され、例えば、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第3のヌクレオチド、およびgRNAの3'末端からの第4のヌクレオチドで、2'-O-メチル修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAの3'末端におけるヌクレオチドは、化学的に修飾されていない。いくつかの実施形態では、gRNAの3'末端におけるヌクレオチドは、化学的に修飾された糖を有していない。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾され、例えば、gRNAの5'末端におけるヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第2のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第3のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第3のヌクレオチド、およびgRNAの3'末端からの第4のヌクレオチドで、2'-O-メチル修飾される。いくつかの実施形態では、2'-O-メチルヌクレオチドは、隣接するヌクレオチドへのリン酸塩結合を含む。いくつかの実施形態では、2'-O-メチルヌクレオチドは、隣接するヌクレオチドへのホスホロチオアート結合を含む。いくつかの実施形態では、2'-O-メチルヌクレオチドは、隣接するヌクレオチドへのチオPACE結合を含む。

20

30

40

## 【0075】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるgRNAは、1つ以上の2'-O修飾および3'リン修飾ヌクレオチド、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオアートヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、gRNAは、gRNAの5'末端に、2'-O修飾および3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオアートヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、gRNAの3'末端に、2'-O修飾および3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオアートヌクレオチドを含

50

む。いくつかの実施形態では、gRNAは、gRNAの5'および3'末端に、2'-O修飾および3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオアートヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、1つ以上の非架橋酸素原子が硫黄原子に置き換えられている、骨格を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾および3'リン修飾され、例えば、gRNAの5'末端におけるヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第2のヌクレオチド、およびgRNAの5'末端からの第3のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'ホスホロチオアート修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾および3'リン修飾され、例えば、gRNAの3'末端におけるヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、およびgRNAの3'末端からの第3のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'ホスホロチオアート修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾および3'リン修飾され、例えば、gRNAの5'末端におけるヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第2のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第3のヌクレオチド、gRNAの3'末端におけるヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、およびgRNAの3'末端からの第3のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'ホスホロチオアート修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾および3'リン修飾され、例えば、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第3のヌクレオチド、およびgRNAの3'末端からの第4のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'ホスホロチオアート修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAの3'末端におけるヌクレオチドは、化学的に修飾されていない。いくつかの実施形態では、gRNAの3'末端におけるヌクレオチドは、化学的に修飾された糖を有していない。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾および3'リン修飾され、例えば、gRNAの5'末端におけるヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第2のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第3のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第3のヌクレオチド、およびgRNAの3'末端からの第4のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'ホスホロチオアート修飾される。

【0076】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるgRNAは、1つ以上の2'-O修飾および3'-リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'チオPACENヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、gRNAは、gRNAの5'末端に、2'-O修飾および3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'チオPACENヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、gRNAの3'末端に、2'-O修飾および3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'チオPACENヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、gRNAの5'および3'末端に、2'-O修飾および3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'チオPACENヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、1つ以上の非架橋酸素原子が硫黄原子に置き換えられ、1つ以上の非架橋酸素原子が酢酸基に置き換えられている、骨格を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾および3'リン修飾され、例えば、gRNAの5'末端におけるヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第2のヌクレオチド、およびgRNAの5'末端からの第3のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'チオPACEN修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾および3'リン修飾され、例えば、gRNAの3'末端におけるヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、およびgRNAの3'末端からの第3のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'チオPACEN修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾および3'リン修飾され、例えば、gRNAの5'末端におけるヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第2のヌクレオチド、gRNAの5'末端からの第3のヌクレオチド、gRNAの3'末端におけるヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、およびgRNAの3'末端からの第3のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'チオPACEN修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾および3'リン修飾され、例えば、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、gRNAの3'末端からの第3のヌクレオチド、およびgRNAの3'末端から

の第4のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'チオP A C E修飾される。いくつかの実施形態では、g R N Aの3'末端におけるヌクレオチドは、化学的に修飾されていない。いくつかの実施形態では、g R N Aの3'末端におけるヌクレオチドは、化学的に修飾された糖を有していない。いくつかの実施形態では、g R N Aは、2'-O修飾および3'リン修飾され、例えば、g R N Aの5'末端におけるヌクレオチド、g R N Aの5'末端からの第2のヌクレオチド、g R N Aの5'末端からの第3のヌクレオチド、g R N Aの3'末端からの第2のヌクレオチド、g R N Aの3'末端からの第3のヌクレオチド、およびg R N Aの3'末端からの第4のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'チオP A C E修飾される。

【0077】

10

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるg R N Aは、化学的に修飾された骨格を含む。いくつかの実施形態では、g R N Aは、ホスホロチオアート結合を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の非架橋酸素原子は、硫黄原子に置き換えられている。いくつかの実施形態では、g R N Aの5'末端におけるヌクレオチド、g R N Aの5'末端からの第2のヌクレオチド、およびg R N Aの5'末端からの第3のヌクレオチドは各々、ホスホロチオアート結合を含む。いくつかの実施形態では、g R N Aの3'末端におけるヌクレオチド、g R N Aの3'末端からの第2のヌクレオチド、およびg R N Aの3'末端からの第3のヌクレオチドは各々、ホスホロチオアート結合を含む。いくつかの実施形態では、g R N Aの5'末端におけるヌクレオチド、g R N Aの5'末端からの第2のヌクレオチド、g R N Aの5'末端からの第3のヌクレオチド、g R N Aの3'末端におけるヌクレオチド、g R N Aの3'末端からの第2のヌクレオチド、およびg R N Aの3'末端からの第3のヌクレオチドは各々、ホスホロチオアート結合を含む。いくつかの実施形態では、g R N Aの5'末端におけるヌクレオチド、g R N Aの5'末端からの第2のヌクレオチド、5'末端からの第3のヌクレオチド、g R N Aの3'末端からの第2のヌクレオチド、g R N Aの3'末端からの第3のヌクレオチド、およびg R N Aの3'末端からの第4のヌクレオチドは各々、ホスホロチオアート結合を含む。

20

【0078】

30

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるg R N Aは、チオP A C E結合を含む。いくつかの実施形態では、g R N Aは、1つ以上の非架橋酸素原子が硫黄原子に置き換えられ、1つ以上の非架橋酸素原子が酢酸基に置き換えられている、骨格を含む。いくつかの実施形態では、g R N Aの5'末端におけるヌクレオチド、g R N Aの5'末端からの第2のヌクレオチド、およびg R N Aの5'末端からの第3のヌクレオチドは各々、チオP A C E結合を含む。いくつかの実施形態では、g R N Aの3'末端におけるヌクレオチド、g R N Aの3'末端からの第2のヌクレオチド、およびg R N Aの3'末端からの第3のヌクレオチドは各々、チオP A C E結合を含む。いくつかの実施形態では、g R N Aの5'末端におけるヌクレオチド、g R N Aの5'末端からの第2のヌクレオチド、g R N Aの5'末端からの第3のヌクレオチド、g R N Aの3'末端におけるヌクレオチド、g R N Aの3'末端からの第2のヌクレオチド、およびg R N Aの3'末端からの第3のヌクレオチドは各々、チオP A C E結合を含む。いくつかの実施形態では、g R N Aの3'末端からの第2のヌクレオチド、g R N Aの3'末端からの第3のヌクレオチド、およびg R N Aの3'末端からの第4のヌクレオチドは各々、チオP A C E結合を含む。いくつかの実施形態では、g R N Aの5'末端におけるヌクレオチド、g R N Aの5'末端からの第2のヌクレオチド、5'末端からの第3のヌクレオチド、g R N Aの3'末端からの第2のヌクレオチド、g R N Aの3'末端からの第3のヌクレオチド、およびg R N Aの3'末端からの第4のヌクレオチドは各々、チオP A C E結合を含む。

40

【0079】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるg R N Aは、1つ以上の2'-O-メ

50

チル - 3' - ホスホロチオアートヌクレオチド、例えば、少なくとも 1、2、3、4、5、または 6 個の 2' - O - メチル - 3' - ホスホロチオアートヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される gRNA は、3 つの末端位置および 5' 末端のうちの 1 つ以上に、ならびに / または 3 つの末端位置および 3' 末端のうちの 1 つ以上に、修飾ヌクレオチド（例えば、2' - O - メチル - 3' - ホスホロチオアートヌクレオチド）を含む。いくつかの実施形態では、gRNA は、例えば、参照によりそれらの全体で組み込まれる、PCT 公開第 WO 2017 / 214460 号、同 WO 2016 / 089433 号、および同 WO 2016 / 164356 号に記載されるように、1 つ以上の修飾ヌクレオチドを含み得る。

#### 【0080】

本明細書で提供される CD38 標的化 gRNA は、好適な任意の様式で細胞に送達され得る。例えば、RNA 誘導ヌクレアーゼに結合された gRNA を含む RNP を含む、CRISPR / Cas システムの送達のための様々な好適な方法が記載されており、例示的な好適な方法は、限定されるものではないが、細胞への RNP のエレクトロポレーション、細胞への Cas ヌクレアーゼおよび gRNA をコードする mRNA のエレクトロポレーション、様々なタンパク質または核酸トランスフェクション方法、および例えば、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）スペクターなどのウイルススペクターを介したコードする RNA または DNA の送達を含む。任意の好適な送達方法が、本開示によって包含され、本開示は、この点に関して限定されない。

#### 【0081】

本開示は、RNA 誘導ヌクレアーゼをヒト CD38 に標的化するために有用である、いくつかの CD38 標的的部位および対応する gRNA を提供する。以下の表 1 は、本明細書に記載される gRNA によって結合され得るヒト内因性 CD38 遺伝子内の好ましい標的ドメインを例証する。表 1 に示されるヒト CD38 の例示的な標的配列は、いくつかの実施形態では、Cas9 ヌクレアーゼ、例えば、SpCas9 とともに使用するためのものである。

表 1 . ヒト CD38 の例示的な Cas9 標的的部位配列が提供され、かかる部位を標的化するために有用である例示的な gRNA 標的化ドメイン配列も同様である。各標的的部位について、第 1 の配列は、DNA 標的ドメイン配列を表し、第 2 の配列は、その補体を表し、第 3 の配列は、その逆補体を表し、第 4 の配列は、それぞれの標的的部位を標的とするために使用され得る gRNA の例示的な標的化ドメイン配列を表す。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

gRNA 名	標的ドメイン配列
CD38-7	CTTGACGCATCGCGCCAGGA(配列番号 7) GAACTGCGTAGCGCGGTCCT(配列番号 50) TCCTGGCGCGATGCGTCAAG(配列番号 32) CUUGACGCAUCGCGCCAGGA(配列番号 64)
CD38-9	CCTCGTCGTGGTGCTCGCGG(配列番号 9) GGAGCAGCACCACGAGCGCC(配列番号 55) CCGCGAGCACCACGACGAGG(配列番号 34) CCUCGUCGUGGUGCUCGCGG(配列番号 66)
CD38-12	CCACCGCGAGCACCACGACG(配列番号 12) GGTTTCGCTCGTGGTGCTGC(配列番号 195) CGTCGTGGTGCTCGCGGTGG(配列番号 37) CCACCGCGAGCACCACGACG(配列番号 12)

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

CD38-23	CCTGGTCCTGATCCTCGTCG(配列番号 23) GGACCAGGACTAGGAGCAGC(配列番号 48) CGACGAGGATCAGGACCAGG(配列番号 196) CCUGGUCCUGAUCCUCGUCG(配列番号 79)	
CD38-24	CCACCGCGAGCACCACGACG(配列番号 12) GGTGGCGCACGTGGTGCTGC(配列番号 49) CGTCGTGGTGCTCGCGGTGG(配列番号 37) CCACCGCGAGCACCACGACG(配列番号 12)	10
CD38-25	CTTGACGCATCGCGCCAGGA(配列番号 7) GAACTGCGTAGCGCGGTCT(配列番号 50) TCCTGGCGCGATGCGTCAAG(配列番号 32) CUUGACGCAUCGCGCCAGGA(配列番号 64)	
CD38-26	TCGCGGTGGTTCGTCGAGG(配列番号 24) AGCGCCACCAGCAGGGCTCC(配列番号 51) CCTCGGGACGACCACGCGA(配列番号 197) UCGCGGUGGUCGUCCCGAGG(配列番号 80)	20
CD38-27	GTTGGGCTCTCCTAGAGAGC(配列番号 25) CAACCCGAGAGGATCTCTCG(配列番号 52) GCTCTTAGGAGAGCCCAAC(配列番号 198) GUUGGGCUCUCCUAGAGAGC(配列番号 81)	
CD38-28	GGTCTCGGAAAGCGCTTGG(配列番号 16) CCAGAGCCCTTTCGGAACC(配列番号 53) CCAAGCGCTTTCGAGACC(配列番号 41) GGUCUCGGGAAAGCGCUUGG(配列番号 72)	30
CD38-29	GATCCTCGTCGTGGTGCTCG(配列番号 26) CTAGGAGCAGCACCACGAGC(配列番号 54) CGAGCACCACGACGAGGATC(配列番号 199) GAUCCUCGUCGUGGUGCUCG(配列番号 82)	
CD38-30	CCTCGTCGTGGTGCTCGCGG(配列番号 9) GGAGCAGCACCACGAGCGCC(配列番号 55) CCGCGAGCACCACGACGAGG(配列番号 34) CCUCGUCGUGGUGCUCGCGG(配列番号 66)	40

【表 1 - 3】

CD38-31	TGCTCGCGGTGGTCGTCCCG(配列番号 6) ACGAGCGCCACCAGCAGGGC(配列番号 56) CGGGACGACCACCGCGAGCA(配列番号 31) UGCUCGCGGUGGUCGUCCCG(配列番号 63)
CD38-32	TGAAAGCATCCCATACTT(配列番号 27) ACTTTCGTAGGGTATGTGAA(配列番号 57) AAGTGTATGGGATGCTTTCA(配列番号 200) UGAAAGCAUCCCAUACACUU(配列番号 84)

10

表 2 . ヒト CD 3 8 の例示的な Cas 9 標的部配列が提供され、かかる部位を標的化するために有用である例示的な gRNA 標的化ドメイン配列も同様である。各標的部について、第 1 の配列は、DNA 標的ドメイン配列を表し、第 2 の配列は、その補体を表し、第 3 の配列は、その逆補体を表し、第 4 の配列は、それぞれの標的部を標的とするために使用され得る gRNA の例示的な標的化ドメイン配列を表す。

【表 2 - 1】

gRNA 名	標的ドメイン配列
CD38-1	GTGTACTTGACGCATCGCGC(配列番号 1) CACATGAACTGCGTAGCGCG(配列番号 201) GCGCGATGCGTCAAGTACAC(配列番号 28) GUGUACUUGACGCAUCGCGC(配列番号 58)
CD38-2	TGTACTTGACGCATCGCGCC(配列番号 2) ACATGAACTGCGTAGCGCGG(配列番号 202) GGCGCGATGCGTCAAGTACA(配列番号 29) UGUACUUGACGCAUCGCGCC(配列番号 59)
CD38-3	CGAGTTCAGCCCGGTGTCCG(配列番号 3) GCTCAAGTCGGGCCACAGGC(配列番号 203) CGGACACCGGGCTGAACTCG(配列番号 4) CGAGUUCAGCCCGGUGUCCG(配列番号 60)
CD38-4	CGGACACCGGGCTGAACTCG(配列番号 4) GCCTGTGGCCCGACTTGAGC(配列番号 204) CGAGTTCAGCCCGGTGTCCG(配列番号 3) CGGACACCGGGCUGAACUCG(配列番号 61)
CD38-5	CCGTCCTGGCGCGATGCGTC(配列番号 5) GGCAGGACCGCGCTACGCAG(配列番号 205) GACGCATCGCGCCAGGACGG(配列番号 30) CCGUCCUGGCGCGAUGCGUC(配列番号 62)

20

30

40

50

【表 2 - 2】

CD38-6	TGCTCGCGGTGGTCGTCCCG(配列番号 6) ACGAGCGCCACCAGCAGGGC(配列番号 56) CGGGACGACCACCGCGAGCA(配列番号 31) UGCUCGCGGUGGUCGUCCCG(配列番号 63)	
CD38-7	CTTGACGCATCGCGCCAGGA(配列番号 7) GAACTGCGTAGCGCGGTCCCT(配列番号 50) TCCTGGCGCGATGCGTCAAG(配列番号 32) CUUGACGCAUCGCGCCAGGA(配列番号 64)	10
CD38-8	GACGGTCTCGGGAAAGCGCT(配列番号 8) CTGCCAGAGCCCTTTCGCGA(配列番号 206) AGCGCTTCCCGAGACCGTC(配列番号 33) GACGGUCUCGGGAAAGCGCU(配列番号 65)	
CD38-9	CCTCGTCGTGGTGCTCGCGG(配列番号 9) GGAGCAGCACCACGAGCGCC(配列番号 55) CCGCGAGCACCACGACGAGG(配列番号 34) CCUCGUCGUGGUGCUCGCGG(配列番号 66)	20
CD38-10	TCGTCCCGAGGTGGCGCCAG(配列番号 10) AGCAGGGCTCCACCGCGGTC(配列番号 207) CTGGCGCCACCTCGGGACGA(配列番号 35) UCGUCCCGAGGUGGCGCCAG(配列番号 67)	
CD38-11	GCGCTTTCGAGACCGTCC(配列番号 11) CGCGAAAGGGCTCTGGCAGG(配列番号 208) GGACGGTCTCGGGAAAGCGC(配列番号 36) GCGCUUCCCGAGACCGUCC(配列番号 68)	30
CD38-12	CCACCGCGAGCACCACGACG(配列番号 12) GGTGGCGCTCGTGGTGCTGC(配列番号 209) CGTCGTGGTGCTCGCGGTGG(配列番号 37) CCACCGCGAGCACCACGACG(配列番号 12)	
CD38-13	GCATCGCGCCAGGACGGTCT(配列番号 13) CGTAGCGCGGTCCCTGCCAGA(配列番号 210) AGACCGTCCTGGCGCGATGC(配列番号 38) GCAUCGCGCCAGGACGGUCU(配列番号 69)	40

【表 2 - 3】

CD38-14	TCTGGAAAACGGTTTCCCGC(配列番号 14) AGACCTTTTGCCAAAGGGCG(配列番号 211) GCGGGAAAACGGTTTCCAGA(配列番号 39) UCUGGAAAACGGUUUCCCGC(配列番号 70)	
CD38-15	GGAGCGGTCCGGGCACCACC(配列番号 15) CCTCGCCAGGCCCGTGGTGG(配列番号 212) GGTGGTGCCCGGACCGCTCC(配列番号 40) GGAGCGGUCCGGGCACCACC(配列番号 71)	10
CD38-16	GGTCTCGGGAAAGCGCTTGG(配列番号 16) CCAGAGCCCTTTCGCGAACC(配列番号 53) CCAAGCGCTTCCCGAGACC(配列番号 41) GGUCUCGGGAAAGCGCUUGG(配列番号 72)	
CD38-17	CTTGTTGCAAGGTACGGTCT(配列番号 17) GAACAACGTTCCATGCCAGA(配列番号 213) AGACCGTACCTTGCAACAAG(配列番号 42) CUUGUUGCAAGGUACGGUCU(配列番号 73)	20
CD38-18	CGCAGTTGGCCATAGGGCTC(配列番号 18) GCGTCAACCGGTATCCCGAG(配列番号 214) GAGCCCTATGGCCAACTGCG(配列番号 43) CGCAGUUGGCCAUAGGGCUC(配列番号 74)	
CD38-19	CCTATGGCCAACTGCGAGTT(配列番号 19) GGATACCGGTTGACGCTCAA(配列番号 215) AACTCGCAGTTGGCCATAGG(配列番号 44) CCUAUGGCCAACUGCGAGUU(配列番号 75)	30
CD38-20	GTCGCCAACCCACCTCATCT(配列番号 20) CAGCGGTTGGGTGGAGTAGA(配列番号 216) AGATGAGGTGGTTGGCGAC(配列番号 45) GUCGCCAACCCACCUCAUCU(配列番号 76)	
CD38-21	GCTGAACTCGCAGTTGGCCA(配列番号 21) CGACTTGAGCGTCAACCGGT(配列番号 217) TGGCCAACTGCGAGTTCAGC(配列番号 46) GCUGAACUCGCAGUUGGCCA(配列番号 77)	40

【表 2 - 4】

CD38-22	CACCGGGCTGAACTCGCAGT(配列番号 22) GTGGCCCGACTTGAGCGTCA(配列番号 218) ACTGCGAGTTCAGCCCGGTG(配列番号 47) CACCGGGCUGAACUCGCAGU(配列番号 78)	
CD38-23	CCTGGTCCTGATCCTCGTCG(配列番号 23) GGACCAGGACTAGGAGCAGC(配列番号 48) CGACGAGGATCAGGACCAGG(配列番号 196) CCUGGUCCUGAUCCUCGUCG(配列番号 79)	10
CD38-24	CCACCGCGAGCACCACGACG(配列番号 12) GGTGGCGCACGTGGTGCTGC(配列番号 49) CGTCGTGGTGCTCGCGGTGG(配列番号 37) CCACCGCGAGCACCACGACG(配列番号 12)	
CD38-25	CTTGACGCATCGCGCCAGGA(配列番号 7) GAACTGCGTAGCGCGGTCT(配列番号 50) TCCTGGCGGATGCGTCAAG(配列番号 32) CUUGACGCAUCGCGCCAGGA(配列番号 64)	20
CD38-26	TCGCGGTGGTCGTCCCGAGG(配列番号 24) AGCGCCACCAGCAGGGCTCC(配列番号 51) CCTCGGGACGACCACCGCGA(配列番号 197) UCGCGGUGGUCGUCCCGAGG(配列番号 80)	
CD38-27	GTTGGGCTCTCCTAGAGAGC(配列番号 25) CAACCCGAGAGGATCTCTCG(配列番号 52) GCTCTTAGGAGAGCCCAAC(配列番号 198) GUUGGGCUCUCCUAGAGAGC(配列番号 81)	30
CD38-28	GGTCTCGGAAAGCGCTTGG(配列番号 16) CCAGAGCCCTTTCGGAACC(配列番号 53) CCAAGCGCTTTCGAGACC(配列番号 41) GGUCUCGGGAAAGCGCUUGG(配列番号 72)	
CD38-29	GATCCTCGTCGTGGTGCTCG(配列番号 26) CTAGGAGCAGCACCACGAGC(配列番号 54) CGAGCACCACGACGAGGATC(配列番号 199) GAUCCUCGUCGUGGUGCUCG(配列番号 82)	40

【表 2 - 5】

CD38-30	CCTCGTCGTGGTGGCTCGCGG(配列番号 9) GGAGCAGCACCACGAGCGCC(配列番号 55) CCGCGAGCACCACGACGAGG(配列番号 34) CCUCGUCGUGGUGCUCGCGG(配列番号 66)	
CD38-31	TGCTCGCGGTGGTTCGCCG(配列番号 6) ACGAGCGCCACCAGCAGGGC(配列番号 56) CGGGACGACCACCGCGAGCA(配列番号 31) UGCUCGCGGUGGUCGUCCCG(配列番号 63)	10
CD38-32	TGAAAGCATCCCATACTT(配列番号 27) ACTTTCGTAGGGTATGTGAA(配列番号 57) AAGTGTATGGGATGCTTCA(配列番号 200) UGAAAGCAUCCAUACACUU(配列番号 84)	
CD38-33	CCCCAATTACCTTGTTGCA(配列番号 158) GGGGGTTAATGGAACAACGT(配列番号 169) TGCAACAAGGTAATTGGGGG(配列番号 219) CCCCAAUUACCUUGUUGCA(配列番号 180)	20
CD38-34	CCTTGCAACAAGGTAATTGG(配列番号 159) GGAACGTTGTTCCATTAACC(配列番号 170) CCAATTACCTTGTTGCAAGG(配列番号 220) CCUUGCAACAAGGUAAUUGG(配列番号 181)	
CD38-35	CCAACTTGATTAGTGGCTGA(配列番号 160) GGTTGAACTAATCACCGACT(配列番号 171) TCAGCCACTAATCAAGTTGG(配列番号 221) CCAACUUGAUUAGUGGCUGA(配列番号 182)	30
CD38-36	TGAGTTCCTCACTTGATTAG(配列番号 161) ACTCAAGGGTTGAACTAATC(配列番号 172) CTAATCAAGTTGGGAACTCA(配列番号 222) UGAGUCCCAACUUGAUUAG(配列番号 183)	
CD38-37	AAGACTATCAGCCACTAATG(配列番号 162) TTCTGATAGTCGGTGATTAC(配列番号 173) CATTAGTGGCTGATAGTCTT(配列番号 223) AAGACUAUCAGCCACUAAUG(配列番号 184)	40

【表 2 - 6】

CD38-38	TGTAGACTGCCAAAGTGTAT(配列番号 163) ACATCTGACGGTTTCACATA(配列番号 174) ATACACTTTGGCAGTCTACA(配列番号 224) UGUAGACUGCCAAAGUGUAAU(配列番号 185)	
CD38-39	TATCAGCCACTAATGAAGTT(配列番号 164) ATAGTCGGTGATTACTTCAA(配列番号 175) AACTTCATTAGTGGCTGATA(配列番号 225) UAUCAGCCACUAAUGAAGUU(配列番号 186)	10
CD38-40	TACCTTGCAACAAGGTAATT(配列番号 165) ATGGAACGTTGTTCCATTAA(配列番号 176) AATTACCTTGTTGCAAGGTA(配列番号 226) UACCUUGCAACAAGGUAAUU(配列番号 187)	
CD38-41	CTTTGGCAGTCTACATGTCT(配列番号 166) GAAACCGTCAGATGTACAGT(配列番号 177) AGACATGTAGACTGCCAAAG(配列番号 227) CUUUGGCAGUCUACAUGUCU(配列番号 188)	20
CD38-42	CTCAGACATGTAGACTGCCA(配列番号 167) GAGTCTGTACATCTGACGGT(配列番号 178) TGGCAGTCTACATGTCTGAG(配列番号 228) CUCAGACAUGUAGACUGCCA(配列番号 189)	
CD38-43	CACTAATGAAGTTGGGAACT(配列番号 168) GTGATTACTTCAACCCTTGA(配列番号 179) AGTTCCCAACTTCATTAGTG(配列番号 229) CACUAAUGAAGUUGGGAACU(配列番号 190)	30

## 【0082】

本開示は、RNA誘導ヌクレアーゼをヒトCD38に標的化するために有用である、例示的なCD38標的化gRNAを提供する。以下の表3は、Cas9ヌクレアーゼをヒト内因性CD38遺伝子に標的化するgRNAで使用するための好ましい標的化ドメインを例証する。表3に示されるヒトCD38の例示的な標的配列は、いくつかの実施形態では、Cas9ヌクレアーゼ、例えば、SpCas9とともに使用するためのものである。表3. ヒトCD38を標的とするgRNAの例示的な標的化ドメイン配列が提供される。

40

【表 3 - 1】

gRNA 名	標的化ドメイン配列	PAM
CD38-1	GUGUACUUGACGCAUCGCGC(配列番号 58)	
CD38-2	UGUACUUGACGCAUCGCGCC(配列番号 59)	
CD38-3	CGAGUUCAGCCCGGUGUCCG(配列番号 60)	
CD38-4	CGGACACCGGGCUGAACUCG(配列番号 61)	
CD38-5	CCGUCCUGGCGCGAUGCGUC(配列番号 62)	
CD38-6	UGCUCGCGGUGGUCGUCCCG(配列番号 63)	

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

CD38-7	CUUGACGCAUCGCGCCAGGA(配列番号 64)	
CD38-8	GACGGUCUCGGGAAAGCGCU(配列番号 65)	
CD38-9	CCUCGUCGUGGUGUCGCGG(配列番号 66)	
CD38-10	UCGUCCCGAGGUGGCGCCAG(配列番号 67)	
CD38-11	GCGCUUCCCGAGACCGUCC(配列番号 68)	
CD38-12	CCACCGCGAGCACCACGACG(配列番号 12)	
CD38-13	GCAUCGCGCCAGGACGGUCU(配列番号 69)	
CD38-14	UCUGGAAAACGGUUUCCCGC(配列番号 70)	
CD38-15	GGAGCGGUCCGGGCACCACC(配列番号 71)	
CD38-16	GGUCUCGGGAAAGCGCUUGG(配列番号 72)	
CD38-17	CUUGUUGCAAGGUACGGUCU(配列番号 73)	
CD38-18	CGCAGUUGGCCAUAGGGCUC(配列番号 74)	
CD38-19	CCUAUGGCCAACUCGAGUU(配列番号 75)	
CD38-20	GUCGCCAACCCACCUCAUCU(配列番号 76)	
CD38-21	GCUGAACUCGCAGUUGGCCA(配列番号 77)	
CD38-22	CACCGGCUGAACUCGAGU(配列番号 78)	
CD38-23	CCUGGUCCUGAUCCUCGUCG(配列番号 79)	TGG
CD38-24	CCACCGCGAGCACCACGACG(配列番号 12)	AGG
CD38-25	CUUGACGCAUCGCGCCAGGA(配列番号 64)	CGG
CD38-26	UCGCGGUGGUCGUCCGAGG(配列番号 80)	TGG
CD38-27	GUUGGGCUCUCCUAGAGAGC(配列番号 81)	
CD38-28	GGUCUCGGGAAAGCGCUUGG(配列番号 72)	TGG
CD38-29	GAUCCUCGUCGUGGUCUCG(配列番号 82)	CGG
CD38-30	CCTCGUCGUGGUCUCGCGG(配列番号 83)	TGG
CD38-31	UGCUCGCGGUGGUCGUCCG(配列番号 63)	AGG
CD38-32	UGAAAGCAUCCAUACACUU(配列番号 84)	TGG
CD38-33	CCCCAAUUACCUUGUUGCA(配列番号 180)	
CD38-34	CCUUGCAACAAGGUAAUUGG(配列番号 181)	
CD38-35	CCAACUUGAUUAGUGGCUGA(配列番号 182)	
CD38-36	UGAGUUCCCAACUUGAUUAG(配列番号 183)	
CD38-37	AAGACUAUCAGCCACUAAUG(配列番号 184)	
CD38-38	UGUAGACUGCCAAAGUGUAU(配列番号 185)	
CD38-39	UAUCAGCCACUAAUGAAGUU(配列番号 186)	
CD38-40	UACCUUGCAACAAGGUAAUU(配列番号 187)	

10

20

30

40

【表 3 - 3】

CD38-41	CUUUGGCAGUCUACAUGUCU(配列番号 188)	
CD38-42	CUCAGACAUGUAGACUGCCA(配列番号 189)	
CD38-43	CACUAAUGAAGUUGGGAACU(配列番号 190)	

【 0 0 8 3 】

本開示は、RNA誘導ヌクレアーゼをヒトCD38に標的化するために有用である、い 50

くつかのCD38標的部位および対応するgRNAを提供する。以下の表4は、本明細書に記載されるgRNAによって結合され得るヒト内因性CD38遺伝子内の好ましい標的ドメインを例証する。表4に示されるヒトCD38の例示的な標的配列は、いくつかの実施形態では、Cpf1ヌクレアーゼとともに使用するためのものである。

表4. ヒトCD38の例示的なCas12a/Cpf1標的部位配列が提供され、かかる部位を標的化するために有用である例示的なgRNA標的化ドメイン配列も同様である。各標的部位について、第1の配列は、DNA標的ドメイン配列を表し、第2の配列は、その補体を表し、第3の配列は、その逆補体を表し、第4の配列は、それぞれの標的部位を標的とするために使用され得るgRNAの例示的な標的化ドメイン配列を表す。

【表4 - 1】

gRNA名	標的ドメイン配列
CD38-44	CCGAGACCGTCCTGGCGCGAT(配列番号 302) GGCTCTGGCAGGACCGCGCTA(配列番号 303) ATCGCGCCAGGACGGTCTCGG(配列番号 230) CCGAGACCGUCCUGGCGCGAU(配列番号 85)
CD38-45	AGTGTACTTGACGCATCGCGC(配列番号 304) TCACATGAACTGCGTAGCGCG(配列番号 305) GCGCGATGCGTCAAGTAACT(配列番号 231) AGUGUACUUGACGCAUCGCGC(配列番号 86)
CD38-46	TCCCCGGACACCGGGCTGAAC(配列番号 306) AGGGGCCTGTGGCCCGACTTG(配列番号 307) GTTACAGCCCGGTGTCCGGGGA(配列番号 232) UCCCCGGACACCGGGCUGAAC(配列番号 87)
CD38-47	CCGCAGGGTAAGTACCAAGTA(配列番号 308) GGCGTCCCATTTCATGGTTCAT(配列番号 309) TACTTGGTACTTACCCTGCGG(配列番号 233) CCGCAGGGUAAGUACCAAGUA(配列番号 88)
CD38-48	ACTGCGGGATCCATTGAGCAT(配列番号 310) TGACGCCCTAGGTAAGTTCGTA(配列番号 311) ATGCTCAATGGATCCCGCAGT(配列番号 234) ACUGCGGGAUCCAUUGAGCAU(配列番号 89)
CD38-49	CTGCGGGATCCATTGAGCATC(配列番号 312) GACGCCCTAGGTAAGTTCGTA(配列番号 313) GATGCTCAATGGATCCCGCAG(配列番号 235) CUGCGGGAUCCAUUGAGCAUC(配列番号 90)

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

CD38-50	GCTTATAATCGATTCCAGCTC(配列番号 314) CGAATATTAGCTAAGGTCGAG(配列番号 315) GAGCTGGAATCGATTATAAGC(配列番号 236) GCUUAUAAUCGAUUCAGCUC(配列番号 91)	
CD38-51	GTCAAAGATTTTACTGCGGGA(配列番号 316) CAGTTTCTAAAATGACGCCCT(配列番号 317) TCCCGCAGTAAAATCTTTGAC(配列番号 237) GUCAAAGAUUUUACUGCGGGA(配列番号 92)	10
CD38-52	TCAAAGATTTTACTGCGGGAT(配列番号 318) AGTTTCTAAAATGACGCCCTA(配列番号 319) ATCCCGCAGTAAAATCTTTGA(配列番号 238) UCAAAAGAUUUUACUGCGGGAU(配列番号 93)	
CD38-53	ACTACTTGGTACTTACCCTGC(配列番号 320) TGATGAACCATGAATGGGACG(配列番号 321) GCAGGGTAAGTACCAAGTAGT(配列番号 239) ACUACUUGGUACUUACCCUGC(配列番号 94)	20
CD38-54	TGTCAAAGATTTTACTGCGGG(配列番号 322) ACAGTTTCTAAAATGACGCCC(配列番号 323) CCCGCAGTAAAATCTTTGACA(配列番号 240) UGUCAAAAGAUUUUACUGCGGG(配列番号 95)	
CD38-55	TGGTGGGATCCTGGCATAAGT(配列番号 324) ACCACCCTAGGACCGTATTCA(配列番号 325) ACTTATGCCAGGATCCCACCA(配列番号 241) UGGUGGGAUCCUGGCAUAAGU(配列番号 96)	30
CD38-56	CTTATAATCGATTCCAGCTCT(配列番号 326) GAATATTAGCTAAGGTCGAGA(配列番号 327) AGAGCTGGAATCGATTATAAG(配列番号 242) CUUAUAAUCGAUUCAGCUCU(配列番号 97)	
CD38-57	TCCAGTCTGGGCAAGATTGAT(配列番号 328) AGGTCAGACCCGTTCTAACTA(配列番号 329) ATCAATCTTGCCAGACTGGA(配列番号 243) UCCAGUCUGGGCAAGAUUGAU(配列番号 98)	40

【表 4 - 3】

CD38-58	CCAGAATACTGAAACAGGGTT(配列番号 330) GGTCTTATGACTTTGTCCCAA(配列番号 331) AACCTGTTTCAGTATTCTGG(配列番号 244) CCAGAAUACUGAAACAGGGUU(配列番号 99)
CD38-59	AGTATTCTGGAAAACGGTTTC(配列番号 332) TCATAAGACCTTTTGCCAAAG(配列番号 333) GAAACCGTTTTCCAGAATACT(配列番号 245) AGUAUUCUGGAAAACGGUUUC(配列番号 100)
CD38-60	GGGAGTGTGGAAGTCCATAAT(配列番号 334) CCCTCACACCTTCAGGTATTA(配列番号 335) ATTATGGACTTCCACACTCCC(配列番号 246) GGGAGUGUGGAAGUCCAUAU(配列番号 101)
CD38-61	CAGAATACTGAAACAGGGTTG(配列番号 336) GTCCTTATGACTTTGTCCCAAC(配列番号 337) CAACCCTGTTTCAGTATTCTG(配列番号 247) CAGAAUACUGAAACAGGGUUG(配列番号 102)
CD38-62	ATGGTGGGATCCTGGCATAAG(配列番号 338) TACCACCCTAGGACCGTATTC(配列番号 339) CTTATGCCAGGATCCCACCAT(配列番号 248) AUGGUGGGAUCCUGGCAUAAG(配列番号 103)
CD38-63	CAACCAGAGAAGG TTCAGACA(配列番号 340) GTTGGTCTCTTCCAAGTCTGT(配列番号 341) TGTCTGAACCTTCTCTGGTTG(配列番号 249) CAACCAGAGAAGGUUCAGACA(配列番号 104)
CD38-64	TTCCCAGAGACTTATGCCAG(配列番号 342) AAGGGGTCTCTGAATACGGTC(配列番号 343) CTGGCATAAGTCTCTGGGGAA(配列番号 250) UUCCCCAGAGACUUAUGCCAG(配列番号 105)
CD38-65	TTGTCATAGACCTGACAAGTT(配列番号 344) AACAGTATCTGGACTGTCAA(配列番号 345) AACTTGTCAGGTCTATGACAA(配列番号 251) UUGUCAUAGACCUGACAAGUU(配列番号 106)

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

CD38-66	GAGCAGAATAAAAAGATCTGGC(配列番号 346) CTCGTCTTATTTTCTAGACCG(配列番号 347) GCCAGATCTTTTATTCTGCTC(配列番号 252) GAGCAGAAUAAAAGAUCUGGC(配列番号 107)	
CD38-67	CCTGCAAGAATATCTACAGGT(配列番号 348) GGACGTTCTTATAGATGTCCA(配列番号 349) ACCTGTAGATATTCTTGCAGG(配列番号 253) CCUGCAAGAAUAUCUACAGGU(配列番号 108)	10
CD38-68	GCAGTCTACATGTCTGAGATA(配列番号 350) CGTCAGATGTACAGACTCTAT(配列番号 351) TATCTCAGACATGTAGACTGC(配列番号 254) GCAGUCUACAUGUCUGAGUA(配列番号 109)	
CD38-69	CACACACTGAAGAACTTGTC(配列番号 352) GTGTGTGACTTCTTTGAACAG(配列番号 353) GACAAGTTTCTTCAGTGTGTG(配列番号 255) CACACACAGAAGAAACUUGUC(配列番号 110)	20
CD38-70	ATCTCAGACATGTAGACTGCC(配列番号 354) TAGAGTCTGTACATCTGACGG(配列番号 355) GGCAGTCTACATGTCTGAGAT(配列番号 256) AUCUCAGACAUGUAGACUGCC(配列番号 111)	
CD38-71	GGAGTGTGGAAGTCCATAATT(配列番号 356) CCTCACACCTTCAGGTATTAA(配列番号 357) AATTATGGACTTCCACACTCC(配列番号 257) GGAGUGUGGAAGUCCAUAUUAU(配列番号 112)	30
CD38-72	TTTAAGTTTGCAGAAGCTGCC(配列番号 358) AAATTCAAACGTCTTCGACGG(配列番号 359) GGCAGCTTCTGCAAACTTAAA(配列番号 258) UUUAUAGUUGCAGAAGCUGCC(配列番号 113)	
CD38-73	CTGCAAGAATATCTACAGGTA(配列番号 360) GACGTTCTTATAGATGTCCAT(配列番号 361) TACCTGTAGATATTCTTGCAG(配列番号 259) CUGCAAGAAUAUCUACAGGUA(配列番号 114)	40

【表 4 - 5】

CD38-74	CTTTCTTGTCATAGACCTGAC(配列番号 362) GAAAGAACATTATCTGGACTG(配列番号 363) GTCAGGTCTATGACAAGAAAG(配列番号 260) CUUUCUUGUCAUAGACCUGAC(配列番号 115)	
CD38-75	GCTTTCTTGTCATAGACCTGA(配列番号 364) CGAAAGAACATTATCTGGACT(配列番号 365) TCAGGTCTATGACAAGAAAGC(配列番号 261) GCUUUCUUGUCAUAGACCUGA(配列番号 116)	10
CD38-76	GCACTTTTGGGAGTGTGGAAG(配列番号 366) CGTGAAAACCCTCACACCTTC(配列番号 367) CTTCCACACTCCCAAAGTGC(配列番号 262) GCACUUUUGGGAGUGUGGAAG(配列番号 117)	
CD38-77	TTAAGTTTGCAGAAGCTGCCT(配列番号 368) AATCAAACGTCTTCGACGGA(配列番号 369) AGGCAGCTTCTGCAAACCTAA(配列番号 263) UUAAGUUUGCAGAAGCUGCCU(配列番号 118)	20
CD38-78	TCTCAGACATGTAGACTGCCA(配列番号 370) AGAGTCTGTACATCTGACGGT(配列番号 371) TGGCAGTCTACATGTCTGAGA(配列番号 264) UCUCAGACAUGUAGACUGCCA(配列番号 119)	
CD38-79	AAAACATCCTTGCAACATTAC(配列番号 372) TTTTGTAGGAACGTTGTAATG(配列番号 373) GTAATGTTGCAAGGATGTTTT(配列番号 265) AAAACAUCUUGCAACAUCUAC(配列番号 120)	30
CD38-80	GAAATAAACTATCAATCTTGC(配列番号 374) CTTTATTTGATAGTTAGAACG(配列番号 375) CAAGATTGATAGTTTATTTTC(配列番号 266) GAAAAAACAUCAUCUUGC(配列番号 121)	
CD38-81	ATTCTGCTCAAAGAAGAATC(配列番号 376) TAAGACGAGGTTTCTTCTTAG(配列番号 377) GATTCTTCTTTGGAGCAGAAT(配列番号 267) AUUCUGCUCCAAAGAAGAAUC(配列番号 122)	40

【表 4 - 6】

CD38-82	TCACACACTGAAGAAACTTGT(配列番号 378) AGTGTGTGACTTCTTTGAACA(配列番号 379) ACAAGTTTCTTCAGTGTGTGA(配列番号 268) UCACACACUGAAGAAACUUGU(配列番号 123)	
CD38-83	GAAATAAATGCACCCTTGAAA(配列番号 380) CTTTATTTACGTGGGAACCTT(配列番号 381) TTTCAAGGGTGCATTTATTT(配列番号 269) GAAAUAAAUGCACCCUUGAAA(配列番号 124)	10
CD38-84	TGCTTTCTTGTCATAGACCTG(配列番号 382) ACGAAAGAACAGTATCTGGAC(配列番号 383) CAGGTCTATGACAAGAAAGCA(配列番号 270) UGC UUUCUUGUCAUAGACCUG(配列番号 125)	
CD38-85	AAATAAATGCACCCTTGAAAG(配列番号 384) TTTATTTACGTGGGAACCTT(配列番号 385) CTTTC AAGGGTGCATTTATTT(配列番号 271) AAAUAAAUGCACCCUUGAAAG(配列番号 126)	20
CD38-86	ACACACTGAAGAAACTTGTCA(配列番号 386) TGTGTGACTTCTTTGAACAGT(配列番号 387) TGACAAGTTTCTTCAGTGTGT(配列番号 272) ACACACUGAAGAAACUUGUCA(配列番号 127)	
CD38-87	AAGTTTGCAGAAGCTGCCTGT(配列番号 388) TTCAAACGTCTTCGACGGACA(配列番号 389) ACAGGCAGCTTCTGCAAACCT(配列番号 273) AAGUUUGCAGAAGCUGCCUGU(配列番号 128)	30
CD38-88	TTCTGCTCCAAAGAAGAATCT(配列番号 390) AAGACGAGGTTTCTTTAGTA(配列番号 391) AGATTCTTCTTTGGAGCAGAA(配列番号 274) UUCUGCUCCAAAGAAGAAUCU(配列番号 129)	
CD38-89	TTCAGTGTGTGAAAAATCCTG(配列番号 392) AAGTCACACACTTTTTAGGAC(配列番号 393) CAGGATTTTTACACACTGAA(配列番号 275) UUCAGUGUGUGAAAAAUCCUG(配列番号 130)	40

【表 4 - 7】

CD38-90	TTTTAAGTTTGCAGAAGCTGC(配列番号 394) AAAATTCAAACGTCTTCGACG(配列番号 395) GCAGCTTCTGCAAACCTTAAAA(配列番号 276) UUUUAGUUUGCAGAAGCUGC(配列番号 131)	
CD38-91	CTGTGTTTTATCTCAGACATG(配列番号 396) GACACAAAATAGAGTCTGTAC(配列番号 397) CATGTCTGAGATAAAACACAG(配列番号 277) CUGUGUUUUUUCUCAGACAUG(配列番号 132)	10
CD38-92	TTGCTTTCTTGTCATAGACCT(配列番号 398) AACGAAAGAACAGTATCTGGA(配列番号 399) AGGTCTATGACAAGAAAGCAA(配列番号 278) UUGCUUUUCUUGUCAUAGACCU(配列番号 133)	
CD38-93	TTTCAAAACATCCTTGCAACA(配列番号 400) AAAGTTTTGTAGGAACGTTGT(配列番号 401) TGTTGCAAGGATGTTTTGAAA(配列番号 279) UUUCAAAACAUCUUGCAACA(配列番号 134)	20
CD38-94	CTACAAACTATGTCTTTTAGA(配列番号 402) GATGTTTGATACAGAAAATCT(配列番号 403) TCTAAAAGACATAGTTTGTAG(配列番号 280) CUACAAACUAUGUCUUUUAGA(配列番号 135)	
CD38-95	AAGGGTGCATTTATTTCAAAA(配列番号 404) TTCCCACGTAAATAAAGTTTT(配列番号 405) TTTTGAAATAAATGCACCCTT(配列番号 281) AAGGGUGCAUUUAUUUCAAAA(配列番号 136)	30
CD38-96	TTCTATTTTAGCACTTTTGGG(配列番号 406) AAGATAAAATCGTGAAAACCC(配列番号 407) CCCAAAAGTGCTAAAATAGAA(配列番号 282) UUCUAUUUUAGCACUUUUGGG(配列番号 137)	
CD38-97	AGTTTGCAGAAGCTGCCTGTG(配列番号 408) TCAAACGTCTTCGACGGACAC(配列番号 409) CACAGGCAGCTTCTGCAAAC(配列番号 283) AGUUUGCAGAAGCUGCCUGUG(配列番号 138)	40

【表 4 - 8】

CD38-98	ACAAAAACAGGTACACATTTA(配列番号 410) TGTTTTGTCCATGTGTAAAT(配列番号 411) TAAATGTGTACCTGTTTTTGT(配列番号 284) ACAAAAACAGGUACACAUUUA(配列番号 139)	
CD38-99	TAAGTTTGCAGAAGCTGCCTG(配列番号 412) ATTCAAACGTCTTCGACGGAC(配列番号 413) CAGGCAGCTTCTGCAAACCTTA(配列番号 285) UAAGUUUGCAGAAGCUGCCUG(配列番号 140)	10
CD38-100	TTCAAGAAGAAATTAATTACC(配列番号 414) AAGTTCTTCTTTAATTAATGG(配列番号 415) GGTAATTAATTTCTTCTTGAA(配列番号 286) UUCAAGAAGAAUUAUUUACC(配列番号 141)	
CD38-101	AGAAATAAACTATCAATCTTG(配列番号 416) TCTTTATTTGATAGTTAGAAC(配列番号 417) CAAGATTGATAGTTTATTTCT(配列番号 287) AGAAAUAAACUAUCAUCUUG(配列番号 142)	20
CD38-102	TGTGTTTTATCTCAGACATGT(配列番号 418) ACACAAAATAGAGTCTGTACA(配列番号 419) ACATGTCTGAGATAAAACACA(配列番号 288) UGUGUUUUAUCUCAGACAUGU(配列番号 143)	
CD38-103	TTTTTAAGTTTGCAGAAGCTG(配列番号 420) AAAATTCAAACGTCTTCGAC(配列番号 421) CAGCTTCTGCAAACCTAAAAA(配列番号 289) UUUUUAAGUUUGCAGAAGCUG(配列番号 144)	30
CD38-104	TACAAACTATGTCTTTTAGAA(配列番号 422) ATGTTTGATACAGAAAATCTT(配列番号 423) TTCTAAAAGACATAGTTTGTA(配列番号 290) UACAAACUAUGUCUUUUAGAA(配列番号 145)	
CD38-105	TTCTTTCTCCCCAGAGACTT(配列番号 424) AAGAAAGAAGGGGTCTCTGAA(配列番号 425) AAGTCTCTGGGGAAGAAAGAA(配列番号 291) UUCUUUCUCCCCAGAGACUU(配列番号 146)	40

【表 4 - 9】

CD38-106	AGCACTTTTGGGAGTGTGGAA(配列番号 426) TCGTGAAAACCCTCACACCTT(配列番号 427) TTCCACACTCCCAAAAAGTGCT(配列番号 292) AGCACUUUUGGGAGUGUGGAA(配列番号 147)	
CD38-107	TAAAAGACATAGTTTGTAGAA(配列番号 428) ATTTTCTGTATCAAACATCTT(配列番号 429) TTCTACAAACTATGTCCTTTA(配列番号 293) UAAAAGACAUAGUUUGUAGAA(配列番号 148)	10
CD38-108	TTTCTAAAAGACATAGTTTGT(配列番号 430) AAAGATTTTCTGTATCAAACA(配列番号 431) ACAAACTATGTCCTTTAGAAA(配列番号 294) UUUCUAAAAGACAUAGUUUGU(配列番号 149)	
CD38-109	TTTTTTAAGTTTGCAGAAGCT(配列番号 432) AAAAAATTCAAACGTCTTCGA(配列番号 433) AGCTTCTGCAAACTTAAAAAA(配列番号 295) UUUUUUAAGUUUGCAGAAGCU(配列番号 150)	20
CD38-110	TTTTTTAAGTTTGCAGAAGC(配列番号 434) AAAAAAATTCAAACGTCTTCG(配列番号 435) GCTTCTGCAAACTTAAAAAAA(配列番号 296) UUUUUUUAAGUUUGCAGAAGC(配列番号 151)	
CD38-111	TTTTCTGTGTTTATCTCAGA(配列番号 436) AAAAGACACAAAATAGAGTCT(配列番号 437) TCTGAGATAAAACACAGAAAA(配列番号 297) UUUUCUGUGUUUAUCUCAGA(配列番号 152)	30
CD38-112	TTCTTCCTTAGATTCTTCTTT(配列番号 438) AAGAAGGAATCTAAGAAGAAA(配列番号 439) AAAGAAGAATCTAAGGAAGAA(配列番号 298) UUCUCCUUAGAUUCUUCUUU(配列番号 153)	
CD38-113	TTTCTTCTATTTTAGCACTTT(配列番号 440) AAAGAAGATAAAATCGTGAAA(配列番号 441) AAAGTGCTAAAATAGAAGAAA(配列番号 299) UUUCUUCUAUUUUAGCACUUU(配列番号 154)	40

【表 4 - 10】

CD38-114	CAGAAGCTGCCTGTGATGTGG(配列番号 442) GTCTTCGACGGACACTACACC(配列番号 443) CCACATCACAGGCAGCTTCTG(配列番号 300) CAGAAGCUGCCUGUGAUGUGG(配列番号 155)
----------	--

本開示は、RNA誘導ヌクレアーゼをヒトCD38に標的化するために有用である、例示的なCD38標的化gRNAを提供する。以下の表5は、Cas9ヌクレアーゼをヒト内因性CD38遺伝子に標的化するgRNAで使用するための好ましい標的化ドメインを例証する。表5に示されるヒトCD38の例示的な標的配列は、いくつかの実施形態では、Cpf1ヌクレアーゼとともに使用するためのものである。

表5．ヒトCD38に標的化されたgRNAの例示的なCas12a/Cpf1標的化ドメイン配列が提供される。

【表5 - 1】

gRNA名	標的化ドメイン配列
CD38-44	CCGAGACCGUCCUGGCGCGAU(配列番号 85)
CD38-45	AGUGUACUUGACGCAUCGCGC(配列番号 86)
CD38-46	UCCCCGGACACCGGGCUGAAC(配列番号 87)
CD38-47	CCGCAGGGUAAGUACCAAGUA(配列番号 88)
CD38-48	ACUGCGGGAUCCAUUGAGCAU(配列番号 89)
CD38-49	CUGCGGGAUCCAUUGAGCAUC(配列番号 90)
CD38-50	GCUUAUAAUCGAUCCAGCUC(配列番号 91)
CD38-51	GUCAAAGAUUUUACUGCGGGA(配列番号 92)
CD38-52	UCAAAAGAUUUUACUGCGGGAU(配列番号 93)
CD38-53	ACUACUUGGUACUACCCUGC(配列番号 94)
CD38-54	UGUCAAAAGAUUUUACUGCGGG(配列番号 95)
CD38-55	UGGUGGGAUCCUGGCAUAAGU(配列番号 96)
CD38-56	CUUAUAAUCGAUCCAGCUCU(配列番号 97)
CD38-57	UCCAGUCUGGGCAAGAUUGAU(配列番号 98)
CD38-58	CCAGAAUACUGAAACAGGGUU(配列番号 99)
CD38-59	AGUAUUCUGGAAAACGGUUUC(配列番号 100)
CD38-60	GGGAGUGUGGAAGUCCAUAUU(配列番号 101)
CD38-61	CAGAAUACUGAAACAGGGUUG(配列番号 102)
CD38-62	AUGGUGGGAUCCUGGCAUAAG(配列番号 103)
CD38-63	CAACCAGAGAAGGUUCAGACA(配列番号 104)
CD38-64	UCCCCAGAGACUUAUGCCAG(配列番号 105)
CD38-65	UUGUCAUAGACCUGACAAGUU(配列番号 106)
CD38-66	GAGCAGAAUAAAAGAUCUGGC(配列番号 107)
CD38-67	CCUGCAAGAAUAUCUACAGGU(配列番号 108)

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

CD38-68	GCAGUCUACAUGUCUGAGAU(配列番号 109)	
CD38-69	CACACACUGAAGAAACUUGUC(配列番号 110)	
CD38-70	AUCUCAGACAUGUAGACUGCC(配列番号 111)	
CD38-71	GGAGUGUGGAAGUCCAUAUU(配列番号 112)	
CD38-72	UUUAAGUUUGCAGAAGCUGCC(配列番号 113)	
CD38-73	CUGCAAGAAUAUCUACAGGUA(配列番号 114)	
CD38-74	CUUUCUUGUCAUAGACCUGAC(配列番号 115)	10
CD38-75	GCUUUCUUGUCAUAGACCUGA(配列番号 116)	
CD38-76	GCACUUUUGGGAGUGUGGAAG(配列番号 117)	
CD38-77	UUAAGUUUGCAGAAGCUGCCU(配列番号 118)	
CD38-78	UCUCAGACAUGUAGACUGCCA(配列番号 119)	
CD38-79	AAAACAUCUUGCAACAUUAC(配列番号 120)	
CD38-80	GAAAUAAACUAUCAUUCUUGC(配列番号 121)	
CD38-81	AUUCUGCUCCAAGAAGAAUC(配列番号 122)	
CD38-82	UCACACACUGAAGAAACUUGU(配列番号 123)	
CD38-83	GAAAUAAUUGCACCCUUGAAA(配列番号 124)	20
CD38-84	UGC UUUCUUGUCAUAGACCUG(配列番号 125)	
CD38-85	AAAUAAAUGCACCCUUGAAAG(配列番号 126)	
CD38-86	ACACACUGAAGAAACUUGUCA(配列番号 127)	
CD38-87	AAGUUUGCAGAAGCUGCCUGU(配列番号 128)	
CD38-88	UUCUGCUCCAAGAAGAAUCU(配列番号 129)	
CD38-89	UUCAGUGUGUGAAAAUCCUG(配列番号 130)	
CD38-90	UUUUAAGUUUGCAGAAGCUGC(配列番号 131)	
CD38-91	CUGUGUUUAUCUCAGACAUG(配列番号 132)	
CD38-92	UUGC UUUCUUGUCAUAGACCU(配列番号 133)	30
CD38-93	UUUCAAAACAUCCUUGCAACA(配列番号 134)	
CD38-94	CUACAAACUAUGUCUUUAGA(配列番号 135)	
CD38-95	AAGGGUGCAUUUAUUUAAAA(配列番号 136)	
CD38-96	UUCUAUUUAGCACUUUUGGG(配列番号 137)	
CD38-97	AGUUUGCAGAAGCUGCCUGUG(配列番号 138)	
CD38-98	ACAAAAACAGGUACACAUUUA(配列番号 139)	
CD38-99	UAAGUUUGCAGAAGCUGCCUG(配列番号 140)	
CD38-100	UUCAAGAAGAAUUAUUUACC(配列番号 141)	40

【表 5 - 3】

CD38-101	AGAAAUAAACUAUCAAUUCUUG(配列番号 142)	
CD38-102	UGUGUUUUAUCUCAGACAUGU(配列番号 143)	
CD38-103	UUUUUAAGUUUGCAGAAGCUG(配列番号 144)	
CD38-104	UACAAACUAUGUCUUUUAGAA(配列番号 145)	
CD38-105	UUCUUUCUCCCCAGAGACUU(配列番号 146)	
CD38-106	AGCACUUUUGGGAGUGUGGAA(配列番号 147)	10
CD38-107	UAAAAGACAUAGUUUGUAGAA(配列番号 148)	
CD38-108	UUUCUAAAAGACAUAGUUUGU(配列番号 149)	
CD38-109	UUUUUUAAGUUUGCAGAAGCU(配列番号 150)	
CD38-110	UUUUUUUAAGUUUGCAGAAGC(配列番号 151)	
CD38-111	UUUCUGUGUUUUAUCUCAGA(配列番号 152)	
CD38-112	UUCUCCUAGAUUCUUCUUU(配列番号 153)	
CD38-113	UUUCUUCUAUUUAGCACUUU(配列番号 154)	20
CD38-114	CAGAAGCUGCCUGUGAUGUGG(配列番号 155)	

## 【0085】

CD38の代表的なアミノ酸配列が、以下に示されるUniProtKB/Swiss-Protアクセッション番号P28907によって提供される。

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSI LVL I L V V V L A  
 V V V P R W R Q Q W S G P G T T K R F P  
 E T V L A R C V K Y T E I H P E M R H V D C Q S V W D A F K G A F I S K H P C N  
 I T E E D Y Q P L M K L G T Q T V P C N  
 K I L L W S R I K D L A H Q F T Q V Q R D M F T L E D T L L G Y L A D D L T W C  
 G E F N T S K I N Y Q S C P D W R K D C  
 S N N P V S V F W K T V S R R F A E A A C D V V H V M L N G S R S K I F D K N S  
 T F G S V E V H N L Q P E K V Q T L E A  
 W V I H G G R E D S R D L C Q D P T I K E L E S I I S K R N I Q F S C K N I Y R  
 P D K F L Q C V K N P E D S S C T S E I

(配列番号156)

## 【0086】

CD38の代表的なcDNA配列が、以下に示されるNCBI参照配列番号NM\_001775.4によって提供される。

10

20

30

40

50

【化 3 - 1】

GCAGTTTCAGAACCAGCCAGCCCTCTCTCTTGTGCTAGCCTCCTGCCGGCCTCATCTTCGCCAGCCA  
 ACCCCGCTGGAGCCCTATGGCCAACCTGCGAGTTTCCGCCCGTGTCCGGGGACAAACCCTGCTGCCGGCT  
 CTCTAGGAGAGCCCAACTCTGTCTTGGCGTCAAGTATCCTGGTCTGATCCTCGTTCGTGGTGCCTCGCGGTG  
 GTCGTCCCGAGGTGGCGCCAGCAGTGGAGCGGTCCGGGCACCACCAAGCGCTTCCCGAGACCGTCTGG  
 CGCGATGCGTCAAGTACACTGAAATTCATCCTGAGATGAGACATGTAGACTGCCAAAGTGTATGGGATGC  
 TTTCAAGGGTGCATTTATTTCAAAAACATCCTTGCAACATTTACTGAAGAAGACTATCAGCCACTAATGAAG  
 TTGGGAACCTCAGACCGTACCTTGAACAAGATCTTCTTTGGAGCAGAATAAAAGATCTGGCCCATCAGT  
 TCACACAGGTCCAGCGGGACATGTTACCCCTGGAGGACACGCTGCTAGGCTACCTTGTGATGACCTCAC  
 ATGGTGTGGTGAATTC AACACTTCCAAAATAAACTATCAATCTTGCCAGACTGGAGAAAGGACTGCAGC  
 AACACCCTGTTTCAGTATTTCTGGAAAACGGTTTCCCGCAGGTTTGCAGAAGCTGCCTGTGATGTGGTCC  
 ATGTGATGCTCAATGGATCCCGCAGTAAAATCTTTGACAAAAACAGCACTTTGGGAGTGTGGAAGTCCA  
 TAATTTGCAACCAGAGAAGGTTTCAGACACTAGAGGCCTGGGTGATACATGGTGGAAAGAGAAGATTCCAGA  
 GACTTATGCCAGGATCCCACCATAAAAGAGCTGGAATCGATTATAAGCAAAAAGGAATATTTCAATTTTCTC  
 GCAAGAATATCTACAGACCTGACAAGTTTCTCAGTGTGTGAAAAATCCTGAGGATTCATCTGCACATC  
 TGAGATCTGAGCCAGTCGCTGTGGTTGTTTTAGCTCCTTGACTCCTTGTGGTTTATGTCATCATACATGA  
 CTCAGCATACTGCTGGTGCAGAGCTGAAGATTTTGGAGGGTCTCCACAATAAGGTCAATGCCAGAGAC  
 GGAAGCCTTTTCCCAAAGCTTAAAATAACTTATATCATCAGCATACTTTATTGTGATCTATCAATA  
 GTC AAGAAAAATTATTGTATAAGATTAGAATGAAAAATTGTATGTTAAGTTACTTCACTTTAATTCTCATG  
 TGATCCTTTTATGTTATTTATATATGGTAAACATCCTTTCTATTGAAAAATCACCCACACCAAACCTCTCT  
 TATTAGAACAGGCAAGTGAAGAAAAGTGAATGCTCAAGTTTTTCAGAAAAGCATTACATTTCCAAATGAAT  
 GACCTTGTTCATGATGATGATTTTTGTACCCTTCTACAGATAGTCAAACCAATAAACCCTCATGGTCAAGG  
 TCATGTTGGTGAAAAATTATCTGTAGGATATAAGCTACCCACGTAAGTGGTCTTTACCCCAACCCCTTCC  
 AACAGTGTGTGAGGTTGGTATATTTTCAATTTTTTAGATGAGAAAATGGGAGCTCAGAGAGGTTATATAT  
 TTAAGTTGGTGCAAAAAGTAAATGCAAGTTTTGCCACCGAAAAGGAATGGCAAAACCACAATATTTTTGAA  
 CCAACCTAATAATTTACCGTAAAGTCTACATTTAGTATCAAGCTAGAGACTGAATTTGAACTCAACTCTG  
 TCCAACCTCAAAAATTCATGTGCTTTTTCTTCTAGGCCTTTCATACCAAACATAAGTAGTATTTATATTCT  
 CTTCCAACAAAATGCATATGGATTAATGACTAGAATGGAATCTGGAATATAGTTCTTCTGGATGGCTC  
 CAAAACACATGTTTTTTCTTCCCGCTTCTCCTCCTCTCATGCTCAGTGTTTTATATATGTAGTATA  
 CAGTAAAAATATACTTGTGCTGGTACTGGCAGCTTATATTTCTCTCTTTTTTTCATGGATTAACCTTGC  
 TTGAGGGCTTTAACAATGTATTACTTTTTCAAAGAACAAGCTTTAGCTTCATTGATTTTTTTCTATTT  
 AATTGGGTTTTGCTCTTCTCTTAGCATTGGAACATAGAAATGCTTTCTGATTTCTTTGGGTAGATTTA  
 CGTATTCAGCTTCTTGAGATGGAAGTTTAGATCACTGATCCTTCAGCTTGTTTTTCTTTTTTGTATACATA  
 GATTTTAGGACGATATATTTCCCTTGAGTCTGCTTTAGCTGCAGCTCTTATGTTTTGTATATGCCTCTC  
 TTTATTATCCTTCAGTTAAAAATATCTTTCAATTCATTGTTATATAAAAAATATGTGCCTAGTTTTTAACA  
 TCTGGAGATTTTCTAGTTTTGAAAAAAACATAAGCCAGGCATGGTGGCTCACACCTGTATCCCCAGCACT  
 TTGGGAGGCCGAGACGGGAGGATCGCCTGAGCTCAGGAGTTTTTACACCAGCTGGGAATAACAGTGAGA  
 CATTATCTCCAAAAAAATTAACCTGGGTATGGTGTGTGCACCTGTAGTCCAGCTACTCTGGAGACTGAG  
 GTGGGAGGATGTTTTGAGCTTGGGAGGTTGAGGCTGCAGGGAGCTGTGATCACACCCTGCCTCTGGCC  
 TGAGTGACAGATTGAGACCTGTCTCAATAAAAAGCAAAAAATAAGAAAAATAAACCATATGTGTGAACAA  
 AGGATTAATAAATTAATTTGAGACTCCTTCAGGGAATGACCACAATTTATTGAAAATAGCCTAAATGTTG  
 GAGTCAGGCATTTCTGGATTCATATTTTGACATCATGCTGTCACTTTGAACAAAATGCCTAACCTTTCTG  
 AACTTCAACTTCTTGGCACTCAAATAAGGATTAACAAAACATAAATGTGGTAAGTACTAAAGACGACAG  
 CAAAAATTGAGTCCAGCACAGAGCTTCTTAAATAAGCAAGCACTCAACAGAGTTGGTTCTTCTTCTCCTC  
 CCCTGCTTGACAATCCAGTTTCCACAGGAGCCTTTGTAGCTGTAGCCACCATGGTCACTCCAGGGATTC  
 TTCCTAGCCCTTCTCCCTGGCAGACATCCTTGTGGGAGTTTAGTCTTGGCTCGACATGAGGATGGGG  
 GTTTGGGACCAGTTCTGAGTGAGAATCAGACTTGCCCCAAGTGCCTTAGCTCCCCCTGCAGAATGTCT  
 TCAGAATCGGGGCCCGGTGAGTCTCCTGGGTGACCTGCTGTTTTCTCTTAAGATCCTTTCCACTTTGGT  
 TGCTGCTTTCCGGGACTCATCGAGTCTTGTCAACAGGATACCCCTTGAAGTGGCTGCCTGGGCCACATC  
 CCCTTCCAAACAAGAAATCAAAATATTAGAAATCAATTTTTGAAATTTCCCTAGGAAGACTCATTGAG  
 TGTTCAAGTTCAGAGCCAGTGGAGACCTTAGGGGAGGGTGGTCAACAAGGATTTTGCACAGTCTTTAGAG  
 GGTCCCAGGGAGCCACAGAGGTGGTGAAGGGGCTGGGTGCTTTTTCTCCGTGCATGACCTTGTGTGCTA  
 TCTTCATTACCACAATGCCCTCATCTACCTCCTTTCCCTGTAGTTCCAACGTGGGTATCTTTGCCAT  
 CTCTGGCCGAAGGACTTTCTGACCTACATGTATAAATACCCCTCACAATATATATTACTTTTCTTATA  
 AGTGAATCTCTACTGGATTTACTGGTTGCTCATAACCTCATATTTTACTCGTAAATCTACTACTCCCTG  
 TCTGCTACTCCATTCTCATTTGCTGTAGAAAATCTCTTACCATCCCAACTTTCACCCACCATCATGCT

10

20

30

40

50

【化 3 - 2】

TACCCAAAGGCTGTGGGAATGACCTGGGCCCCTAATGCCCTTTTCTAAATTCCTAAGGCTCACCATTTTC  
CTATTGTAATGGTTCTTGACCTTATAATGTTTGAGGCACCTTTTCAAATATAGTCCTTTGATTTTCAGACT  
GAATACTTGAAAGGACACACACACACATACGTAAGTGCATATGACTGCATACACCCACACACACACACGT  
GCCTGTATACAGTCATATGATACATACACAAACACACGCACACAAGCCTGCATACATCATATGCCAACAG  
TGGGGATATGTTCTGAGAAATGCATCATTAGATGATTTTGTGTCATTGTGTGAACATCATAGAGTGTACTTA  
CACTAACCTAGATGGTCTAACCTACTACACACCCAGGCTACATGGTATCACCTATTCCTCCTAGGCTACA  
AGCCTGTACAGCGTGTGTCTGTACTAAATGCTGTGGGCAATTTAACCTGATGGTAAATGTTTGTGTATC  
TAAACATATCTAAACATAGAAAAGGTACAGTAAACATGCAGTATTATAATCTTATGAGACCGTCATCATA  
TATGTGGTCCACTGTTTGGGCCATCATGGCTGAAAAGTGGTTATGCGACACATGACTGTATATATACTT  
TCCTGTTACAACAACAGTGTCTCTCAATCCACAGTAATTGCAGCATCCAGTAGGTCTTACTTTAGCCCTG  
AGTCACCATTTGTGTCAACGTGTTTAGTGCCATGTCCACGTCTCTCATGTAAGTGGCAGAGCTATCAAAT  
ATTTTGGCAAAACACATTGTTTCTTTGGCTTTGCCTTGGTAACTTTCTGTGCCTTTGTAGCTCTTGT  
GGAAGAAGCTCAACCCATGTCTGCACACTGTGATACAAGGGGGACAGCATCGACATCGACTTACTTCTTG  
GTGCCTTATTCCTCCTTAGAACAATTCCTAAATCTGTAAGTAAAGTTTCTCAGGAAGATTCCATACTGCA  
CAGAAAAGTGTCTTTGTGGGTTTTTAAAAGGCAAGTTGTTATATGTGCTGGATAGTTTTTAAGTATGACA  
TAAAAATTGTATAAAGTAAAATATTAATAACACCTAGAATACTGTATAACTTTAAGTCATTTTATCAAC  
ACATTGCTAATCCAGATATTTTCCCGCAGTTTTTCTTTGAATAACAGAGCAATTAATTTACTTTTACTAT  
GAAGAGTCATCATTTTAGTATGTATTTAAGCAATCCACCAAGAACTCAGTAGGCAGCTGAGAGGTGCTG  
CCCAGAGAAGTGGTGATTAGCTTGGCCTTAGCTCACCCACACAAAGCACAACAGGCTTTGAACTATTCCC  
TAACGGGGCATTTATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGAGACGGAGTCTCGCTGTCGCCCAGGCTAGAGT  
GCAGTGGCGGATCTCGGCTCACTGCAGGCTCCACCCCTGGGGTTCACGCCATTCTCCTGCCTCAGCCT  
CCCAAGTAGCTGGGACTGCAGGCGCCCGCCATCTCGCCCGGCTAATTTTTTGTATTTTGTAGTAGAGACGG  
GGTTTACCGTGTTAGCCAGGATAGGGCATTATTCTTGAACTTGATTGAGAGAGGCACACATTACCATT  
CTCTAATCAGAATGCAAGTAGCGCAAGGCGGTGAAACTATGGAATTCGGAGGCAGGTGATGCATTGGGC  
GAGTTTATTAACATCTGTGACTCTCTAGTTTGAATTTATTTGTAACAGACAAAAATGAATTAACAAAC  
AATAAAAGTATAATAAAGAA (配列番号157)

10

20

【0087】

本開示のいくつかの態様は、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のパリアント型の発現をもたらす、そのゲノムにおける修飾を含む、遺伝子操作された細胞を提供する。いくつかの実施形態では、細胞のゲノムにおける修飾は、CD38をコードするゲノム配列における変異である。いくつかの実施形態では、修飾は、例えば、Casヌクレアーゼおよび本明細書で提供されるCD38標的部

30

【0088】

本明細書で提供される組成物、方法、方略、および治療法は、任意の細胞または細胞型に適用され得るが、本発明の態様によるCD38遺伝子におけるゲノム修飾に特に好適であるいくつかの例示的な細胞および細胞型が、本明細書により詳細に記載される。しかしながら、当業者は、かかる実施例の提供が、いくつかの具体的な実施形態を例証する目的のためのものであることを理解し、追加の好適な細胞および細胞型が、この点に関して限定されない、本開示に基づいて当業者に明らかであろう。

【0089】

本開示のいくつかの態様は、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のパリアント型の発現をもたらす、そのゲノムにおける修飾を含む、遺伝子操作された造血細胞を提供する。いくつかの実施形態では、そのゲノムにおける修飾を含む遺伝子操作された細胞は、例えば、同じ細胞型であるがゲノム修飾を含まない造血細胞と比較して、CD38の細胞表面発現の低減、および/またはCD38を標的とする免疫療法剤による結合の低減をもたらす。いくつかの実施形態では、造血細胞は、造血幹細胞(HSC)である。いくつかの実施形態では、造血細胞は、造血前駆細胞(HPC)である。いくつかの実施形態では、造血細胞は、造血幹細胞または前駆細胞である。

40

【0090】

50

いくつかの実施形態では、細胞は、CD34+である。いくつかの実施形態では、細胞は、造血細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、造血幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、造血前駆細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、免疫エフェクター細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、リンパ球である。いくつかの実施形態では、細胞は、Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、細胞は、NK細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、幹細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、胚性幹細胞(ESC)、人工多能性幹細胞(iPSC)、間葉系幹細胞、または組織特異的幹細胞からなる群から選択される。

#### 【0091】

いくつかの実施形態では、細胞は、レシピエントの骨髄にCD38編集幹細胞を生着し、かつレシピエントにおける全ての血液系細胞型の分化した子孫を生成する能力によって特徴付けられる細胞の集団に含まれる。いくつかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも50%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集造血幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも60%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集造血幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも70%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集造血幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも80%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集造血幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞集団は、少なくとも90%の効率でレシピエントの骨髄にCD38編集造血幹細胞を生着する能力によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、細胞集団は、未編集造血幹細胞の分化能力と同等である分化能によって特徴付けられるCD38編集造血幹細胞を含む。

#### 【0092】

いくつかの実施形態では、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらす、そのゲノムにおける修飾を含む造血細胞(例えば、HSCまたはHPC)が、ヌクレアーゼおよび/または本明細書に記載されるヒトCD38を標的とするgRNAを使用して作成される。かかる細胞は、細胞をヌクレアーゼおよび/もしくはgRNAと接触させることによって作成され得るか、または細胞は、ヌクレアーゼおよび/もしくはgRNAと接触された細胞の娘細胞であり得ることが理解されるであろう。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細胞(例えば、遺伝子操作されたHSCまたはHPC)は、HSCもしくはHPCニッチに集合すること、および/または対象の造血系を再構成することが可能である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細胞(例えば、HSCまたはHPC)は、ヒト対象に生着すること、骨髄系細胞を産生すること、およびリンパ系細胞を産生することのうちの一つ以上(例えば、全て)が可能である。いくつかの好ましい実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された造血細胞またはその子孫は、同じ細胞型であるが、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらすゲノム修飾を含まない造血細胞と比較して、好ましくは、いかなる分化バイアスも伴わずに、全ての血液細胞系統に分化することができる。

#### 【0093】

ドナー細胞をレシピエント宿主生物内に生着させると、例えば、所与のニッチ(例えば、骨髄)内の生着したドナー細胞(およびその子孫)ならびに宿主細胞の相対レベルは、宿主生物の生理学および/または治療的転帰にとって重要であることが理解されるであろう。所与の組織またはニッチ内の宿主細胞に対する生着したドナー細胞またはその子孫のレベルは、本明細書ではキメラ現象と称される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細胞(例えば、HSCまたはHPC)は、ヒト対象に生着することが可能であり、同じ細胞型であるが、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらすゲノム修飾を含まない造血細胞と比較して、キメラ現象にいかなる差異も示さない。いくつかの実施形態では、

本明細書に記載される細胞（例えば、HSCまたはHPC）は、同じ細胞型であるが、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらすゲノム修飾を含まない造血細胞と比較して、キメラ現象に1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50%以下の差異を示す。

【0094】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された細胞は、1つだけのゲノム修飾、例えば、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらすゲノム修飾を含む。本明細書で提供される遺伝子編集方法は、標的遺伝子の一方または両方の対立遺伝子におけるゲノム修飾をもたらすことが理解されるであろう。いくつかの実施形態では、所与の遺伝子座の両方の対立遺伝子におけるゲノム修飾を含む、遺伝子操作された細胞が好ましい。

10

【0095】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された細胞は、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらすゲノム修飾に加えて、2つ以上のゲノム修飾、例えば、1つ以上のゲノム修飾を含む。

【0096】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された細胞は、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらすゲノム修飾を含み、更に、例えば、細胞のゲノムに統合されたCARをコードする発現構築物の形態で、キメラ抗原受容体をコードする発現構築物を含む。いくつかの実施形態では、CARは、CD38に結合する、結合ドメイン、例えば、抗体断片を含む。

20

【0097】

本開示のいくつかの態様は、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらす、そのゲノムにおける修飾を含む、遺伝子操作された免疫エフェクター細胞を提供する。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、リンパ球である。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、Tリンパ球は、アルファ/ベータTリンパ球である。いくつかの実施形態では、Tリンパ球は、ガンマ/デルタTリンパ球である。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、ナチュラルキラーT（NK）細胞である。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞である。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、内因性導入遺伝子、例えば、トランスジェニックタンパク質を発現しない。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、CD38を標的とするCARを発現する。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、CD38を標的とするCARを発現しない。

30

40

【0098】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された細胞は、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらすゲノム修飾を含み、外因性タンパク質をコードする発現構築物を含まず、例えば、CARをコードする発現構築物を含まない。

【0099】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された細胞は、実質的にCD38タンパク質を発現せず、例えば、免疫染色法などの好適な方法によって測定されるCD38タンパク質を発現しない。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された細胞は、実質的に野生型CD38タンパク質を発現しないが、変異CD3

50

8 タンパク質バリエーション、例えば、CD38を標的とする免疫療法剤、例えば、CAR-T細胞治療剤、または抗CD38抗体、抗体断片、もしくは抗体薬物コンジュゲート（ADC）によって認識されないバリエーションを発現する。

【0100】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された細胞は、造血細胞、例えば、造血幹細胞、造血前駆細胞（HPC）、造血幹または前駆細胞である。造血幹細胞（HSC）は、多能性、自己再生性、ならびに/またはそれぞれ、骨髄細胞（例えば、単球、マクロファージ、好中球、好塩基球、樹状細胞、赤血球、血小板など）およびリンパ系細胞（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞）を更に生じさせる骨髄およびリンパ系前駆細胞の両方を含む、造血系の全てのシステムを生成および/もしくは再構成する能力によって特徴付けられる細胞である。HSCは、HSCの同定および/または単離に使用される、1つ以上の細胞表面マーカー、例えば、CD34（例えば、CD34+）の発現、ならびに細胞システムへの関与に関連する細胞表面マーカーの不在によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞（例えば、遺伝子操作されたHSC）は、典型的にはHSC同定もしくは単離に関連する1つ以上の細胞表面マーカーを発現しないか、低減した量の細胞表面マーカーを発現するか、または細胞表面マーカーを標的とする免疫療法剤によって認識されないバリエーション細胞表面マーカーを発現するが、それでもなお、自己再生が可能であり、造血系の全てのシステムを生成および/または再構成することができる。

10

【0101】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞の集団は、複数の遺伝子操作された造血幹細胞を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞の集団は、複数の遺伝子操作された造血前駆細胞を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子操作された細胞の集団は、複数の遺伝子操作された造血幹細胞および複数の遺伝子操作された造血前駆細胞を含む。

20

【0102】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたHSCは、ヒト対象などの対象から取得される。HSCを取得する方法は、例えば、参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、PCT出願第US2016/057339号に記載されている。いくつかの実施形態では、HSCは、末梢血HSCである。いくつかの実施形態では、哺乳類対象は、非ヒト霊長類、齧歯類（例えば、マウスもしくはラット）、ウシ、ブタ、ウマ、または家畜である。いくつかの実施形態では、HSCは、造血器悪性腫瘍を有するヒト対象などのヒト対象から取得される。いくつかの実施形態では、HSCは、健康なドナーから取得される。いくつかの実施形態では、HSCは、キメラ受容体を発現する免疫細胞が後に投与されるであろう対象から取得される。細胞が取得された同じ対象に投与されるHSCは、自己細胞と称される一方で、細胞が投与される対象ではない対象から取得されるHSCは、同種異系細胞と称される。

30

【0103】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の集団は、細胞の異種集団、例えば、異なるCD38変異を含む遺伝子操作された細胞の異種集団である。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の集団内のCD38をコードする遺伝子のコピーの少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%は、本明細書に記載されるゲノム編集アプローチによって、例えば、本明細書で提供されるgRNAを使用するCRISPR/Casシステムによって生じさせられる変異を含む。一例として、遺伝子操作された細胞の集団は、複数の異なるCD38変異を含むことができ、複数の各変異は、変異を有する細胞の集団内のCD38のコピーの割合に寄与し得る。

40

【0104】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された造血細胞上のCD38の発現は、天然に存

50

在する造血細胞（例えば、野生型対応物）上のCD38の発現と比較される。いくつかの実施形態では、遺伝子操作は、天然に存在する造血細胞（例えば、野生型対応物）上のCD38の発現と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%のCD38の発現レベルの低減をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、遺伝子操作された造血細胞は、天然に存在する造血細胞（例えば、野生型対応物）と比較して、CD38の20%未満、19%未満、18%未満、17%未満、16%未満、15%未満、14%未満、13%未満、12%未満、11%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、6%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、または1%未満を発現する。

10

#### 【0105】

いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載されるCD38を標的とするgRNAを使用する、本明細書に記載される遺伝子操作は、天然に存在する造血細胞（例えば、野生型対応物）上の野生型CD38の発現のレベルと比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の野生型CD38の発現レベルの低減をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、遺伝子操作された造血細胞は、天然に存在する造血細胞（例えば、野生型対応物）と比較して、CD38の20%未満、19%未満、18%未満、17%未満、16%未満、15%未満、14%未満、13%未満、12%未満、11%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、6%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、または1%未満を発現する。

20

#### 【0106】

いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載されるCD38を標的とするgRNAを使用する、本明細書に記載される遺伝子操作は、好適な対照（例えば、1つの細胞または複数の細胞）と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の野生型系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD38）の発現レベルの低減をもたらす。いくつかの実施形態では、好適な対照は、同じ対象からの複数の操作されていない細胞において測定または予期される野生型系統特異的細胞表面抗原のレベルを含む。いくつかの実施形態では、好適な対照は、健康な対象からの複数の細胞において測定または予期される野生型系統特異的細胞表面抗原のレベルを含む。いくつかの実施形態では、好適な対照は、健康な個人（例えば、10、20、50、または100人の個人）のプールからの細胞の集団において測定または予期される野生型系統特異的細胞表面抗原のレベルを含む。いくつかの実施形態では、好適な対照は、本明細書に記載される治療、例えば、抗CD38療法を必要とする対象、例えば、対象ががんを有し、がんの細胞がCD38を発現する、対象において測定または予期される野生型系統特異的細胞表面抗原のレベルを含む。

30

40

#### 【0107】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細胞を遺伝子操作する方法は、野生型細胞、例えば、野生型造血幹または前駆細胞を提供するステップを含む。いくつかの実施形態では、野生型細胞は、CD38をコードする遺伝子の2つの機能的コピーを含む（例えば、発現する）未編集の細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号157によるCD38遺伝子配列を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号156でコードされるCD38タンパク質をコードするCD38遺伝子配列を含み、例えば、CD38遺伝子配列は、配列番号157に対して1つ以上のサイレント変異を含み得る。いくつかの実施形態では、本方法で使用される細胞は、天然に存在する細胞または操作され

50

ていない細胞である。いくつかの実施形態では、野生型細胞は、CD38を発現するか、またはDaudi、HDL M - 2、MOLT - 4、REH、Karpas - 707、RPMI - 8226、U - 266 / 70、U - 698、A549細胞などのCD38を発現する細胞株と同等の（またはその90% ~ 110%、80% ~ 120%、70% ~ 130%、60 ~ 140%、もしくは50% ~ 150%以内の）レベルでCD38を発現する更に分化した細胞を生じさせる。いくつかの実施形態では、野生型細胞は、CD38に結合する抗体（例えば、抗CD38抗体、例えば、ダラツムマブ、イソツキシマブ）に結合するか、またはCD38を発現する細胞株、Daudi、HDL M - 2、MOLT - 4、REH、Karpas - 707、RPMI - 8226、U - 266 / 70、U - 698、A549細胞への抗体の結合と同等の（またはその90% ~ 110%、80% ~ 120%、70% ~ 130%、60 ~ 140%、もしくは50% ~ 150%以内の）レベルでかかる抗体に結合する更に分化した細胞を生じさせる。抗体結合は、例えば、フローサイトメトリまたは免疫組織化学によって測定され得る。

10

#### 【0108】

二重gRNA組成物およびその使用

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるgRNA（例えば、表1 ~ 5のいずれかで提供されるgRNA）は、例えば、CRISPR/Casヌクレアーゼをゲノム内の2つの部位に標的化するために、第2のgRNAと組み合わせて使用することができる。例えば、いくつかの実施形態では、細胞が、2つの薬剤：抗CD38薬剤および第2の系統特異的細胞表面抗原を標的とする薬剤に耐性を示し得るように、CD38および第2の系統特異的細胞表面抗原、例えば、CD33、CD123、CLL - 1、CD19、CD30、CD5、CD6、CD7、またはBCMAが欠損している造血細胞を産生することが所望され得る。いくつかの実施形態では、例えば、2回の切断を行い、2つの切断部位の間に欠失または挿入を作成するために、細胞を、CD38の異なる部位を標的とする2つの異なるgRNAと接触させることが望ましい。したがって、本開示は、gRNAおよび関連するCRISPRシステムの様々な組み合わせ、ならびにgRNAおよび関連するCRISPRシステムのかかる組み合わせを使用したゲノム編集方法によって作成された細胞を提供する。いくつかの実施形態では、CD38 gRNAは、第2のgRNAとは異なるヌクレアーゼに結合する。例えば、いくつかの実施形態では、CD38 gRNAは、Cas9に結合し得、第2のgRNAは、Cas12aに結合し得るか、またはその逆も同様である。

20

30

#### 【0109】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書で提供されるCD38 gRNA（例えば、表1 ~ 5のいずれかで提供されるgRNAまたはそのバリエーション）であり、第2のgRNAは、以下から選択される系統特異的細胞表面抗原を標的とする：BCMA、CD19、CD20、CD30、ROR1、B7H6、B7H3、CD23、CD33、CD38、C型レクチン様分子 - 1、CS1、IL - 5、L1 - CAM、PSCA、PSMA、CD138、CD133、CD70、CD5、CD6、CD7、CD13、NKGD2、NKGD2リガンド、CLEC12A、CD11、CD123、CD386、CD30、CD34、CD14、CD66b、CD41、CD61、CD62、CD235a、CD146、CD326、LMP2、CD22、CD382、CD10、CD3/TCR、CD79/BICR、およびCD26。

40

#### 【0110】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書で提供されるCD38 gRNA（例えば、表1 ~ 5のいずれかで提供されるgRNAまたはそのバリエーション）であり、第2のgRNAは、腫瘍性もしくは悪性疾患または障害、例えば、具体的なタイプのがんに関連する系統特異的細胞表面抗原、例えば、限定されるものではないが、CD20、CD22（非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病（CLL））、CD382（B細胞性CLL）、CD33（急性骨髄性白血病（AML））、CD10（gp100）（一般的な（B前）急性リンパ性白血病および悪性黒色腫）、CD3/T細胞

50

胞受容体 (TCR) (T細胞リンパ腫および白血病)、CD79/B細胞受容体 (BCR) (B細胞リンパ腫および白血病)、CD26 (上皮およびリンパ性悪性腫瘍)、ヒト白血球抗原 (HLA) - DR、HLA - DP、HLA - DQ (リンパ性悪性腫瘍)、RCA S 1 (婦人科がん、胆管がん、および膵管腺がん)、ならびに前立腺特異的膜抗原を標的とする。

【0111】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書で提供されるCD38 gRNA (例えば、表1~5のいずれか1つで提供されるgRNAまたはそのバリエーション)であり、第2のgRNAは、以下から選択される系統特異的細胞表面抗原を標的とする：CD 1 a、CD 1 b、CD 1 c、CD 1 d、CD 1 e、CD 2、CD 3、CD 3 d、CD 3 e、CD 3 g、CD 4、CD 5、CD 6、CD 7、CD 8 a、CD 8 b、CD 9、CD 10、CD 11 a、CD 11 b、CD 11 c、CD 11 d、CD w 1 2、CD 1 3、CD 1 4、CD 1 5、CD 1 6、CD 1 6 b、CD 1 7、CD 1 8、CD 1 9、CD 2 0、CD 2 1、CD 2 2、CD 2 3、CD 2 4、CD 2 5、CD 2 6、CD 2 7、CD 2 8、CD 2 9、CD 3 0、CD 3 1、CD 3 2 a、CD 3 2 b、CD 3 2 c、CD 3 4、CD 3 5、CD 3 6、CD 3 7、CD 3 8、CD 3 9、CD 4 0、CD 4 1、CD 4 2 a、CD 4 2 b、CD 4 2 c、CD 4 2 d、CD 4 3、CD 4 4、CD 4 5、CD 4 5 RA、CD 4 5 RB、CD 4 5 RC、CD 4 5 RO、CD 4 6、CD 4 7、CD 4 8、CD 4 9 a、CD 4 9 b、CD 4 9 c、CD 4 9 d、CD 4 9 e、CD 4 9 f、CD 3 8 0、CD 3 8 1、CD 3 8 2、CD 3 8 3、CD 3 8 4、CD 3 8 5、CD 3 8 6、CD 3 8 7、CD 3 8 8、CD 3 8 9、CD 6 0 a、CD 6 1、CD 6 2 E、CD 6 2 L、CD 6 2 P、CD 6 3、CD 6 4 a、CD 6 5、CD 6 5 s、CD 6 6 a、CD 6 6 b、CD 6 6 c、CD 6 6 F、CD 6 8、CD 6 9、CD 7 0、CD 7 1、CD 7 2、CD 7 3、CD 7 4、CD 7 5、CD 7 5 S、CD 7 7、CD 7 9 a、CD 7 9 b、CD 8 0、CD 8 1、CD 8 2、CD 8 3、CD 8 4、CD 8 5 A、CD 8 5 C、CD 8 5 D、CD 8 5 E、CD 8 5 F、CD 8 5 G、CD 8 5 H、CD 8 5 I、CD 8 5 J、CD 8 5 K、CD 8 6、CD 8 7、CD 8 8、CD 8 9、CD 9 0、CD 9 1、CD 9 2、CD 9 3、CD 9 4、CD 9 5、CD 9 6、CD 9 7、CD 9 8、CD 9 9、CD 9 9 R、CD 1 0 0、CD 1 0 1、CD 1 0 2、CD 1 0 3、CD 1 0 4、CD 1 0 5、CD 1 0 6、CD 1 0 7 a、CD 1 0 7 b、CD 1 0 8、CD 1 0 9、CD 1 1 0、CD 1 1 1、CD 1 1 2、CD 1 1 3、CD 1 1 4、CD 1 1 5、CD 1 1 6、CD 1 1 7、CD 1 1 8、CD 1 1 9、CD 1 2 0 a、CD 1 2 0 b、CD 1 2 1 a、CD 1 2 1 b、CD 1 2 1 a、CD 1 2 1 b、CD 1 2 2、CD 1 2 3、CD 1 2 4、CD 1 2 5、CD 1 2 6、CD 1 2 7、CD 1 2 9、CD 1 3 0、CD 1 3 1、CD 1 3 2、CD 1 3 3、CD 1 3 4、CD 1 3 5、CD 1 3 6、CD 1 3 7、CD 1 3 8、CD 1 3 9、CD 1 4 0 a、CD 1 4 0 b、CD 1 4 1、CD 1 4 2、CD 1 4 3、CD 1 4、CD w 1 4 5、CD 1 4 6、CD 1 4 7、CD 1 4 8、CD 1 5 0、CD 1 5 2、CD 1 5 2、CD 1 5 3、CD 1 5 4、CD 1 5 5、CD 1 5 6 a、CD 1 5 6 b、CD 1 5 6 c、CD 1 5 7、CD 1 5 8 b 1、CD 1 5 8 b 2、CD 1 5 8 d、CD 1 5 8 e 1 / e 2、CD 1 5 8 f、CD 1 5 8 g、CD 1 5 8 h、CD 1 5 8 i、CD 1 5 8 j、CD 1 5 8 k、CD 1 5 9 a、CD 1 5 9 c、CD 1 6 0、CD 1 6 1、CD 1 6 3、CD 1 6 4、CD 1 6 5、CD 1 6 6、CD 1 6 7 a、CD 1 6 8、CD 1 6 9、CD 1 7 0、CD 1 7 1、CD 1 7 2 a、CD 1 7 2 b、CD 1 7 2 g、CD 1 7 3、CD 1 7 4、CD 1 7 5、CD 1 7 5 s、CD 1 7 6、CD 1 7 7、CD 1 7 8、CD 1 7 9 a、CD 1 7 9 b、CD 1 8 0、CD 1 8 1、CD 1 8 2、CD 1 8 3、CD 1 8 4、CD 1 8 5、CD 1 8 6、CD 1 9 1、CD 1 9 2、CD 1 9 3、CD 1 9 4、CD 1 9 5、CD 1 9 6、CD 1 9 7、CD w 1 9 8、CD w 1 9 9、CD 2 0 0、CD 2 0 1、CD 2 0 2 b、CD 2 0 3 c、CD 2 0 4、CD 2 0 5、CD 2 0 6、CD 2 0 7、CD 2 0 8、CD 2 0 9、CD 2 1 0 a、CD w 2 1 0 b、CD 2 1 2、CD 2 1 3 a 1、CD 2 1 3 a 2、CD 2 1 5、CD 2 1 7、CD 2 1 8 a、CD 2 1 8 b、CD 2 2 0、CD 2 2 1、CD 2 2 2、CD 2 2 3、CD 2 2 4、CD 2 2 5、CD

10

20

30

40

50

2 2 6、C D 2 2 7、C D 2 2 8、C D 2 2 9、C D 2 3 0、C D 2 3 1、C D 2 3 2、  
 C D 2 3 3、C D 2 3 4、C D 2 3 5 a、C D 2 3 5 b、C D 2 3 6、C D 2 3 6 R、C  
 D 2 3 8、C D 2 3 9、C D 2 4 0、C D 2 4 1、C D 2 4 2、C D 2 4 3、C D 2 4 4  
 、C D 2 4 5、C D 2 4 6、C D 2 4 7、C D 2 4 8、C D 2 4 9、C D 2 5 2、C D 2  
 5 3、C D 2 5 4、C D 2 5 6、C D 2 5 7、C D 2 5 8、C D 2 6 1、C D 2 6 2、C  
 D 2 6 3、C D 2 6 4、C D 2 6 5、C D 2 6 6、C D 2 6 7、C D 2 6 8、C D 2 6 9  
 、C D 2 7 0、C D 2 7 2、C D 2 7 2、C D 2 7 3、C D 2 7 4、C D 2 7 5、C D 2  
 7 6、C D 2 7 7、C D 2 7 8、C D 2 7 9、C D 2 8 0、C D 2 8 1、C D 2 8 2、C  
 D 2 8 3、C D 2 8 4、C D 2 8 6、C D 2 8 8、C D 2 8 9、C D 2 9 0、C D 2 9 2  
 、C D w 2 9 3、C D 2 9 4、C D 2 9 5、C D 2 9 6、C D 2 9 7、C D 2 9 8、C D 10  
 2 9 9、C D 3 0 0 a、C D 3 0 0 c、C D 3 0 0 e、C D 3 0 1、C D 3 0 2、C D 3  
 0 3、C D 3 0 4、C D 3 0 5、C D 3 0 6、C D 3 0 7 a、C D 3 0 7 b、C D 3 0 7  
 c、C D 3 0 7 d、C D 3 0 7 e、C D 3 0 9、C D 3 1 2、C D 3 1 4、C D 3 1 5、  
 C D 3 1 6、C D 3 1 7、C D 3 1 8、C D 3 1 9、C D 3 2 0、C D 3 2 1、C D 3 2  
 2、C D 3 2 4、C D 3 2 5、C D 3 2 6、C D 3 2 7、C D 3 2 8、C D 3 2 9、C D  
 3 3 1、C D 3 3 2、C D 3 3 3、C D 3 3 4、C D 3 3 5、C D 3 3 6、C D 3 3 7、  
 C D 3 3 8、C D 3 3 9、C D 3 4 0、C D 3 4 4、C D 3 4 9、C D 3 5 0、C D 3 5  
 1、C D 3 5 2、C D 3 5 3、C D 3 5 4、C D 3 5 5、C D 3 5 7、C D 3 5 8、C D  
 3 5 9、C D 3 6 0、C D 3 6 1、C D 3 6 2、またはC D 3 6 3。

【0 1 1 2】

いくつかの実施形態では、第2のgRNAは、各々が参照によりその全体で本明細書に  
 組み込まれる、WO2017/066760、WO2019/046285、WO/20  
 18/160768、またはBorot et al. PNAS (2019) 116 (2  
 4) 11978 - 11987のうちのいずれかに開示されているgRNAである。

【0 1 1 3】

投与を必要とする対象への投与の方法

本開示のいくつかの態様は、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫  
 療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらす、そのゲノムにお  
 ける修飾を含む、有効数の本明細書に記載される遺伝子操作された細胞を、それを必要と  
 する対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0 1 1 4】

投与を必要とする対象は、いくつかの実施形態では、CD38を標的とする免疫療法を  
 受けているか、または受けようとしている対象である。投与を必要とする対象は、いくつ  
 かの実施形態では、悪性細胞上のCD38の発現によって特徴付けられる悪性腫瘍を有す  
 るか、または悪性腫瘍と診断された対象である。いくつかの実施形態では、かかる悪性腫  
 瘍を有する対象は、CD38を標的とする免疫療法の候補であり得るが、有害な標的上・  
 疾患外効果のリスクが、対象にとって予期または観察される利益を上回り得る。いくつ  
 かのかかる実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された細胞が、CD38を標的  
 とする免疫療法剤によって効率的に標的化されないため、本明細書に記載される遺伝子操  
 作された細胞の投与は、有害な標的上・疾患外効果の改善をもたらす。

【0 1 1 5】

いくつかの実施形態では、悪性腫瘍は、血液悪性腫瘍、または血液のがんである。いく  
 つかの実施形態では、悪性腫瘍は、リンパ性悪性腫瘍である。一般に、リンパ性悪性腫瘍  
 は、T系統またはB系統のリンパ球などのリンパ系細胞の不適切な産生、発生、および/  
 または機能に関連する。いくつかの実施形態では、悪性腫瘍は、細胞表面上でCD38を  
 発現する細胞に特徴付けられるか、または関連する。

【0 1 1 6】

いくつかの実施形態では、悪性腫瘍は、T系統がん、例えば、T細胞白血病またはT細  
 胞リンパ腫などの異常Tリンパ球に関連する。

【0 1 1 7】

10

20

30

40

50

T細胞白血病およびT細胞リンパ腫の例としては、限定されるものではないが、T系統急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）、ホジキンリンパ腫、もしくは非ホジキンリンパ腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、大顆粒球性白血病、成人T細胞白血病/リンパ腫（ATLL）、T細胞前リンパ球性白血病（T-PLL）、T細胞性慢性リンパ性白血病、Tリンパ球性白血病、T細胞リンパ性白血病、B細胞性慢性リンパ性白血病、マントル細胞リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫（PTCL）、未分化大細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ腫、皮膚未分化大細胞リンパ腫、腸症型T細胞リンパ腫、肝脾ガンマ・デルタT細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、または有毛細胞白血病が挙げられる。いくつかの実施例では、悪性腫瘍は、急性T系統急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）である。

10

## 【0118】

いくつかの実施形態では、悪性腫瘍は、B系統がん、例えば、B細胞白血病またはB細胞リンパ腫などの異常Bリンパ球に関連する。いくつかの実施形態では、悪性腫瘍は、B系統急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）または慢性リンパ性白血病（B-CLL）である。

## 【0119】

いくつかの実施形態では、CD38の発現に関連するか、またはそれによって特徴付けられる造血器悪性腫瘍は、多発性骨髄腫、B細胞慢性リンパ性白血病、B細胞急性リンパ芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、ワルデンストレームマクログロブリン血症、原発性全身性アミロイドーシス、マントル細胞リンパ腫、球状白血病、慢性骨髄性白血病、濾胞性リンパ腫、意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症（MGUS）、くすぶり型骨髄腫（SMM）、NK細胞白血病、および形質細胞白血病である。

20

## 【0120】

また、本開示の範囲内には、再発性または難治性血液悪性腫瘍などの再発性および/または難治性とみなされる悪性腫瘍がある。投与を必要とする対象は、いくつかの実施形態では、CD38を標的とする免疫エフェクター細胞療法、例えば、CAR-T細胞療法を受けているか、または受けるであろう対象であり、免疫エフェクター細胞は、CARを標的とするCD38を発現し、免疫エフェクター細胞の少なくともサブセットもまた、その細胞表面上にCD38を発現する。本明細書で使用される場合、「フラトリサイド」という用語は、自己殺傷を指す。例えば、細胞の集団のうちの細胞が、同じ集団の細胞を殺傷するか、または殺傷を誘発する。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞療法の細胞が、免疫エフェクター細胞療法の他の細胞を殺傷するか、または殺傷を誘発する。かかる実施形態では、フラトリサイドは、所望の臨床転帰、例えば、対象内でCD38を発現する悪性細胞の除去が達成され得る前に、免疫エフェクター細胞の一部または集団全体を除去する。いくつかのかかる実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された免疫エフェクター細胞、例えば、CD38を発現しないか、またはCARによって認識されるCD38バリエーションを発現しない免疫エフェクター細胞を、免疫エフェクター細胞療法の基礎を形成する免疫エフェクター細胞として使用することが、かかるフラトリサイドおよび治療転帰に対する関連する悪影響を回避するであろう。かかる実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作された免疫エフェクター細胞、例えば、CD38を発現しないか、またはCARによって認識されるCD38バリエーションを発現しない免疫エフェクター細胞は、CD38標的化CARも発現するように更に修飾され得る。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、リンパ球、例えば、Tリンパ球、例えば、アルファ/ベータTリンパ球、ガンマ/デルタTリンパ球、またはナチュラルキラーT細胞などであり得る。いくつかの実施形態では、免疫エフェクター細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞であり得る。

30

40

## 【0121】

いくつかの実施形態では、CD38の発現の喪失、またはCD38を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD38のバリエーション型の発現をもたらす、そのゲノムにおける修飾を含む、本明細書に記載される有効数の遺伝子操作された細胞が、それを必要とす

50

る対象、例えば、CD38を標的とする免疫療法を受けているか、または受けるであろう対象に投与され、免疫療法は、例えば、CD38を発現する対象における健康な細胞に向けた細胞傷害性の形態で、有害な標的上・疾患外効果に関連するか、または関連する危険性がある。いくつかの実施形態では、有効数のかかる遺伝子操作された細胞は、抗CD38免疫療法剤と組み合わせて対象に投与され得る。

#### 【0122】

薬剤（例えば、CD38修飾細胞および抗CD38免疫療法剤）が組み合わせて投与されると、細胞および薬剤が、同時に、または異なる時間に、例えば、時間的に近接して、投与され得ることが理解される。更に、細胞および薬剤は、混合され得るか、または別個の体積もしくは剤形であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、組み合わせでの投与は、同じ治療過程における、例えば、抗CD38免疫療法を用いて対象を治療する過程における投与を含み、対象は、有効数の遺伝子操作されたCD38修飾細胞を、抗CD38免疫療法と同時に、または連続的に、例えば、治療の前、間、もしくは後に投与され得る。

10

#### 【0123】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCD38を標的とする免疫療法剤は、CD38に結合することが可能な抗原結合断片（例えば、一本鎖抗体）を含むキメラ抗原受容体を発現する免疫細胞である。免疫細胞は、例えば、T細胞（例えば、CD4+もしくはCD8+T細胞）またはNK細胞であり得る。

#### 【0124】

キメラ抗原受容体（CAR）は、少なくとも細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン、例えば、刺激分子に由来するものを含む、組換えポリペプチドを含むことができる。1つのいくつかの実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、4-1BB（すなわち、CD137）、CD27、および/またはCD28などの少なくとも1つの共刺激分子、またはそれらの分子の断片に由来する、1つ以上の機能的シグナル伝達ドメインを更に含む。CARの細胞外抗原結合ドメインは、CD38結合抗体断片を含み得る。抗体断片は、1つ以上のCDR、可変領域（もしくはその部分）、定常領域（もしくはその部分）、または前述のうちのいずれかの組み合わせを含むことができる。

20

#### 【0125】

抗ヒトCD38抗体の例示的な重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列および核酸配列が、例えば、Guo et al. Cell. & Mol. Immunol. (2020) 17: 430-432で提供されている。

30

#### 【0126】

キメラ抗原受容体（CAR）は、典型的には、（例えば、CD8またはCD28からの）ヒンジ領域、（例えば、CD8またはCD28からの）膜貫通ドメイン、1つ以上の共刺激ドメイン（例えば、CD28または4-1BB）、およびシグナル伝達ドメイン（例えば、CD3zeta）を含み得る、例えば、CARフレームワークに融合された抗体断片を含む、抗原結合ドメインを含む。CARドメインおよび成分の例示的な配列が、例えば、PCT公開第WO2019/178382号、および以下の表6で提供される。

40

表6：キメラ受容体の例示的な成分

【表 6 - 1】

キメラ受容体成分	アミノ酸配列	
抗原結合断片	軽鎖-リンカー-重鎖	
CD28 共刺激ドメイン	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTV AFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRS(配列番号 191)	10
CD8 $\alpha$ 膜貫通ドメイン	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (配列番号 301)	
CD28 膜貫通ドメイン	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFII FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRR PGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (配列番号 192)	
4-1BB 細胞内ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCEL(配列番号 194)	20

【表 6 - 2】

CD3 $\zeta$ 細胞質シグナル伝達ドメイン	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKQRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (配列番号 193)	
---------------------------	---	--

## 【0127】

いくつかの実施形態では、投与を必要とする対象に投与される本明細書で提供される遺伝子操作された細胞、例えば、HSC、HPC、または免疫エフェクター細胞の数は、 $10^6 \sim 10^{11}$  の範囲内である。しかしながら、この例示的な範囲を下回るか、または上回る量もまた、本開示の範囲内である。例えば、いくつかの実施形態では、投与を必要とする対象に投与される本明細書で提供される遺伝子操作された細胞、例えば、HSC、HPC、または免疫エフェクター細胞の数は、約  $10^6$ 、約  $10^7$ 、約  $10^8$ 、約  $10^9$ 、約  $10^{10}$ 、または約  $10^{11}$  である。いくつかの実施形態では、投与を必要とする対象に投与される本明細書で提供される遺伝子操作された細胞、例えば、HSC、HPC、または免疫エフェクター細胞の数は、 $10^6 \sim 10^9$  の範囲内、 $10^6 \sim 10^8$  の範囲内、 $10^7 \sim 10^9$  の範囲内、 $10^7 \sim 10^{10}$  の範囲内、 $10^8 \sim 10^{10}$  の範囲内、または  $10^9 \sim 10^{11}$  の範囲内である。

## 【0128】

いくつかの実施形態では、CD38を標的とする免疫療法剤は、抗体薬物コンジュゲート(ADC)である。ADCは、毒素または薬物分子にコンジュゲートされた抗体またはその抗原結合断片を含む分子であり得る。対応する抗原への抗体またはその断片の結合は、その細胞表面上に抗原を提示する細胞(例えば、標的細胞)への毒素または薬物分子の送達を可能にし、それによって、標的細胞の死をもたらす。

## 【0129】

CD38に結合する好適な抗体および抗体断片が、当業者に明らかとなり、例えば、P

10

20

30

40

50

CT公開第WO2011/154453号、同第WO2008/047242号、同第WO2016/089960号、および例えば、van de Donk et al. *Front. Immunol.* (2018) 9:2134、van de Donk et al. *Blood* (2018) 131(1):13-29、Raedler, L. J. *Hematol. Oncol. Pharm.* (2016) 6:36に記載されているものを含む。

【0130】

抗体薬物コンジュゲートでの使用に適合する毒素または薬物は、当技術分野で公知であり、当技術分野の当業者には明らかであろう。例えば、Peters et al. *Biosci. Rep.* (2015) 35(4):e00225、Beck et al. *Nature Reviews Drug Discovery* (2017) 16:315-337、Marin-Acevedo et al. *J. Hematol. Oncol.* (2018) 11:8、Elgundi et al. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2017) 122:2-19を参照されたい。

【0131】

いくつかの実施形態では、抗体薬物コンジュゲートは、抗体および薬物分子を付着させるリンカー（例えば、切断可能なリンカーなどのペプチドリナー）を更に含み得る。

【0132】

抗体薬物コンジュゲートのための好適な毒素または薬物の例としては、限定されるものではないが、ブレンツキシマブベドチン、グレンバツムマブベドチン/CDX-011、デパツキシズマブマホドチン/ABT-414、PSMA ADC、ポラツズマブベドチン/RG7596/DCDS4501A、デニンツズマブマホドチン/SGN-CD19A、AGS-16C3F、CDX-014、RG7841/DLYE5953A、RG7882/DMUC406A、RG7986/DCDS0780A、SGN-LIV1A、エンフォルトマブベドチン/ASG-22ME、AG-15ME、AGS67E、テリソツズマブベドチン/ABBV-399、ABBV-221、ABBV-085、GSK-2857916、チソツマブベドチン/HuMax-TF-ADC、HuMax-Ax1-ADC、ピナツズマブベドチン/RG7593/DCDT2980S、リファスツズマブベドチン/RG7599/DNIB0600A、インデュサツマブベドチン/MLN-0264/TAK-264、バンドルツズマブベドチン/RG7450/DSTP3086S、ソフィツズマブベドチン/RG7458/DMUC5754A、RG7600/DMOT4039A、RG7336/DEDN6526A、ME1547、PF-06263507/ADC5T4、トラスツズマブエムタンシン/T-DM1、ミルベツキシマブソラブタンシン/IMGN853、コルツキシマブラブタンシン/SAR3419、ナラツキシマブエムタンシン/IMGN529、インダツキシマブラブタンシン/BT-062、アネツマブラブタンシン/BAY94-9343、SAR408701、SAR428926、AMG224、PCA062、HKT288、LY3076226、SAR566658、ロルボツズマブメルタンシン/IMGN901、カンツズマブメルタンシン/SB-408075、カンツズマブラブタンシン/IMGN242、ラブリツキシマブエムタンシン/IMGN289、IMGN388、ピバツズマブメルタンシン、AVE9633、BIB015、MLN2704、AMG172、AMG595、LOP628、バダスツキシマブタリリン/SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-CD19B、SGN-CD123A、SGN-CD352A、ロバルピツズマブテシリン/SC16LD6.5、SC-002、SC-003、ADCT-301/HuMax-TAC-PBD、ADCT-402、MEDI3726/ADC-401、IMGN779、IMGN632、ゲムツズマブオゾガマイシン、イノツズマブオゾガマイシン/CMC-544、PF-06647263、CMD-193、CMB-401、トラスツズマブデュオカルマジン/SYD985、BMS-936561/MDX-1203、サシツズマブゴピテカン/IMMU-132、ラベツズマブゴピテカン/IMMU-130、DS-8201a、U3-1402、ミラツズマブドキシソルピシン/IMMU-110/hLL

10

20

30

40

50

1 - D O X、B M S - 9 8 6 1 4 8、R C 4 8 - A D C / ヘルツズマブ - v c - M M A E、P F - 0 6 6 4 7 0 2 0、P F - 0 6 6 5 0 8 0 8、P F - 0 6 6 6 4 1 7 8 / R N 9 2 7 C、ルバルツマブアマドチン / B A Y 1 1 2 9 9 8 0、アブルツマブイキサドチン / B A Y 1 1 8 7 9 8 2、A R X 7 8 8、A G S 6 2 P 1、X M T - 1 5 2 2、A b G n - 1 0 7、M E D I 4 2 7 6、D S T A 4 6 3 7 S / R G 7 8 6 1 に含まれる毒素および薬物が挙げられる。

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的タンパク質のエピトープへの抗体薬物コンジュゲートの結合は、抗体薬物コンジュゲートの内部化を誘発し、薬物（または毒素）は、細胞内に放出され得る。いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的タンパク質のエピトープへの抗体薬物コンジュゲートの結合は、毒素または薬物の内部化を誘発し、これは、毒素または薬物が系統特異的タンパク質を発現する細胞（標的細胞）を殺傷することを可能にする。いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的タンパク質のエピトープへの抗体薬物コンジュゲートの結合は、毒素または薬物の内部化を誘発し、これは、系統特異的タンパク質を発現する細胞（標的細胞）の活性を調節し得る。本明細書に記載される抗体薬物コンジュゲートで使用される毒素または薬物のタイプは、いかなる具体的なタイプにも限定されない。

10

【 0 1 3 4 】

本明細書に開示される技術の実施形態、利点、特徴、および使用のうちのいくつかは、以下の実施例からより完全に理解されるであろう。実施例は、本開示の利益のうちのいくつかを例証し、かつ特定の実施形態を説明することを意図しているが、本開示の全範囲を例示することを意図しておらず、したがって、本開示の範囲を限定しない。

20

【 実施例 】

【 0 1 3 5 】

実施例 1：ヒト細胞における C D 3 8 の遺伝子編集  
s g R N A 構築物の設計

表 1 ~ 5 に示される標的ドメインおよび g R N A は、例えば、標的領域に近接近した、適用可能なヌクレアーゼ、例えば、C a s 9、C p f 1 に対する P A M 配列の手動検査によって設計され、オンライン検索アルゴリズム（例えば、B e n c h l i n g アルゴリズム、D o e n c h e t a l 2 0 1 6、H s u e t a l 2 0 1 3）を用いてヒトゲノム内の潜在的な標的外部位を最小限化することによって、予測される特異性に従って優先順位を決定された。全ての設計された合成 s g R N A が、5' および 3' 末端の両方における 3 つの末端位置で、化学的に修飾されたヌクレオチドを用いて産生された。修飾ヌクレオチドは、2' - O - メチル - 3' - ホスホロチオアート（「m s」と省略される）を含み、m s - s g R N A は、H P L C 精製された。C a s 9 タンパク質が、S y n t h e g o から購入された。

30

【 0 1 3 6 】

初代ヒト C D 3 4 + H S C における編集

動員された末梢血（m P B）に由来する凍結された C D 3 4 + H S C が、H e m a c a r e または F r e d H u t c h i n s o n C a n c e r C e n t e r のいずれかから購入され、製造業者の指示に従って解凍された。H S C を編集するために、約  $1 \times 10^6$  個の H S C が解凍され、R N P を用いたエレクトロポレーションの前に、S t e m S p a n C C 1 1 0 カクテル（S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s）を補充した S t e m S p a n S F E M 培地中で 2 4 ~ 4 8 時間培養された。H S C をエレクトロポレーションするために、 $1.5 \times 10^5$  個の細胞がペレット化され、2 0  $\mu$  L の L o n z a P 3 溶液中に再懸濁され、1 0  $\mu$  L の C a s 9 R N P と混合された。C D 3 4 + H S C が、L o n z a N u c l e o f e c t o r 2 および H u m a n P 3 C e l l N u c l e o f e c t i o n K i t（V P A - 1 0 0 2、L o n z a）を使用して、エレクトロポレーションされた。

40

【 0 1 3 7 】

50

## ゲノムDNA分析

全てのゲノム分析について、DNAが細胞から採取され、標的領域に隣接するプライマーで増幅され、精製されて、対立遺伝子修飾頻度が、TIDE (Tracking of Indels by Decomposition) を使用して分析された。モックトランスフェクトサンプルからの参照配列を使用して、分析が実施された。パラメータが、10個のヌクレオチドのデフォルト最大Indelサイズに設定され、分解ウィンドウが、高品質のトレースを伴って可能な限り最大のウィンドウを網羅するように設定された。3.5%の検出感度を下回る全てのTIDE分析が、0%に設定された。

## 【0138】

ヒトCD34+細胞が、Cas9タンパク質でエレクトロポレーションされ、上記に記載されるように、CD38標的化gRNAを示した。 10

## 【0139】

編集の割合が、TIDEによって評価される%INDELによって決定され、例示的なCD38 gRNAの表7では短い。編集効率が、フローサイトメトリー分析から決定された。

表7. CD38 gRNAの遺伝子編集効率。

## 【表7】

	EP後24時間の平均生存率(%)	EP後48時間の平均生存率(%)	CD34+細胞における編集%(TIDE)
モック	94.1	94.6	該当なし
gRNA CD38-23	89.9	91.9	70
gRNA CD38-24	91.9	93.2	47
gRNA CD38-25	89.3	93.2	45
gRNA CD38-26	92.7	91.3	43
gRNA CD38-27	89.9	91.2	28
gRNA CD38-29	91.2	92.4	71
gRNA CD38-30	92.9	90.9	72

\* EP前のCD34+細胞の平均生存率(解凍後1日) : 92.25%

## 【0140】

## フローサイトメトリー分析

CD38 gRNA編集細胞はまた、例えば、フローサイトメトリー分析(FACS)によって、CD38タンパク質の表面発現について評価され得る。生CD34+HSCが、抗CD38抗体を使用してCD38について染色され、Attune NxTフローサイトメーター(Life Technologies)上でフローサイトメトリーによって分析される。CD38遺伝子が遺伝子組換えされている細胞は、FACSによって検出されるCD38発現の低減を示す。 40

## 【0141】

## 編集された細胞の生存率

エクスピボ編集後4、24、および48時間に、生存能力のある編集されたCD38KO細胞および対照細胞の割合が、フローサイトメトリーおよび7AAD生存率染料を使用して定量化される。本明細書に記載されるCD38 gRNAを使用して編集された高レベルのCD38KO細胞は、生存能力があり、エレクトロポレーションおよび遺伝子編集後に経時的に生存能力があるままである。これは、対照モック編集細胞で観察されるものに類似する。 50

## 【 0 1 4 2 】

## 実施例 2 : T リンパ球の遺伝子編集

CD38 gRNA が、実施例 1 に記載され、表 1 ~ 5 に示されるように設計された。T リンパ球 ( M o l t - 4 細胞など ) における編集効率を評価するために、細胞が、予備形成された gRNA ヌクレアーゼ ( 例えば、C a s 9、C p f 1 ) RNP 複合体でエレクトロポレーションされた。簡潔に述べると、近似  $2 \times 10^5$  M o l t - 4 細胞が、L o n z a 4 D - N u c l e o f e c t o r および P 3 P r i m a r y C e l l K i t を使用して、 $3 \mu\text{g}$  の C a s 9 :  $3 \mu\text{g}$  の gRNA で予備形成された RNP 複合体でエレクトロポレーションされた。

## 【 0 1 4 3 】

エレクトロポレーション後 48 時間に、サンガーシーケンス、続いて、T r a c k i n g o f I n d e l s b y D e c o m p o s i t i o n ( T I D E ) 分析によって評価された野生型配列と比較した I n d e l を有する対立遺伝子の割合に基づいて、編集頻度が決定された ( B r i n k m a n e t a l . 2 0 1 4、H s i a u e t a l . 2 0 1 8 を参照 )。

## 【 0 1 4 4 】

編集の割合が、T I D E によって評価される % I N D E L によって決定され、図 3 A ~ 3 F および 5 A ~ 5 G、ならびに例示的な CD38 gRNA の表 8 に示される。

表 8 . CD38 gRNA の遺伝子編集効率。

## 【 表 8 】

名称	Molt4 細胞における編集%(TIDE)	
	実験#1	実験#2
gRNA CD38-23	78.7	85.8
gRNA CD38-24	80.4	66.8
gRNA CD38-25	82.8	64.2
gRNA CD38-26	76.3	70.8
gRNA CD38-27		74.4
gRNA CD38-29	88.6	84
gRNA CD38-30	85.3	80.4

## 【 0 1 4 5 】

編集効率も、フローサイトメトリー分析による CD38 の発現に基づいて評価した。図 4 A および 4 B は、本明細書に記載されるいくつかの例示的な CD38 gRNA で編集された M o l t - 4 細胞上の CD38 発現のフローサイトメトリー分析を示す。これらの結果は、CD38 gRNA を使用して編集された細胞で検出された CD38 タンパク質の低減を実証する。

## 【 0 1 4 6 】

## 実施例 3 : C A R - T 細胞傷害性アッセイ

表 1 ~ 5 に示される gRNA を使用して産生された遺伝子組換え細胞が、CD38 - C A R T 細胞による殺傷について評価され得る。

## 【 0 1 4 7 】

## CAR 構築物およびレンチウイルス産生

第 2 世代の CAR が、CD38 を標的とするように構築される。例示的な CAR 構築物は、CD8 シグナルペプチドを使用する細胞外 s c F v 抗原結合ドメイン、CD8 ヒ

10

20

30

40

50

ンジおよび膜貫通領域、4-1BB共刺激ドメイン、およびCD3シグナル伝達ドメインからなる。抗CD38 scFv配列は、本明細書で参照されるものなどの当技術分野で公知である任意の抗CD38抗体から取得され得る。標的のCAR cDNA配列が、pCDH-EF1-MCS-T2A-GFP発現ベクターの多重クローニング部位にサブクローニングされ、レンチウイルスが、製造業者のプロトコル(System Biosciences)に従って生成される。リポフェクタミン3000(ThermoFisher)を使用した293TN細胞(System Biosciences)の一過性のトランスフェクションによって、レンチウイルスを生成することができる。例示的なCAR構築物は、CD8ヒンジドメイン、ICOS膜貫通ドメイン、ICOSシグナル伝達ドメイン、4-1BBシグナル伝達ドメイン、およびCD3シグナル伝達ドメインへの抗CD38抗体の軽鎖および重鎖を、レンチウイルスプラスミドpHI V-Zsgrreenにクローニングすることによって生成される。

10

## 【0148】

## CAR形質導入および増殖

ヒト初代T細胞が、製造業者のプロトコル(Stem Cell Technologies)に従って、抗CD4および抗CD8マイクロビーズを使用した磁気ビーズ分離によって、Leuko Pak(Stem Cell Technologies)から単離される。精製されたCD4+およびCD8+T細胞が、1:1で混合され、抗CD3/CD28結合Dynabeads(ThermoFisher)を使用して、1:1のビーズ対細胞比で活性化される。使用されるT細胞培養培地は、免疫細胞血清代替物、L-グルタミン、およびGlutaMAX(全てThermoFisherから購入される)、ならびに100IU/mLのIL-2(Peprrotech)を補充したCTS Optimizer T細胞増殖培地である。T細胞形質導入が、ポリプレックス(Sigma)の存在下でのスピノキュレーションによる活性化の24時間後に実施される。CAR-T細胞が、凍結保存前に9日間培養される。全ての実験の前に、T細胞が解凍され、37で4~6時間静置される。

20

## 【0149】

## フローサイトメトリーベースのCAR-T細胞傷害性アッセイ

標的細胞の細胞傷害性が、陰性対照細胞の生存に対して標的細胞の生存を比較することによって測定される。CD38細胞傷害性アッセイについては、MOLT-4などのCD38発現細胞株の野生型およびCRISPR/Cas9編集細胞が、標的細胞として使用される。野生型Raji細胞株(ATCC)が、両方の実験のための陰性対照として使用される。代替的に、CD34+細胞が、標的細胞として使用され得、CD38が欠損しているか、またはCD38の発現が低減したCD34+細胞が、実施例1に記載されるように生成され得る。

30

## 【0150】

標的細胞および陰性対照細胞が、製造業者の指示に従って、それぞれ、CellTrace Violet(CTV)およびCFSE(ThermoFisher)で染色される。染色後、標的細胞および陰性対照細胞が1:1で混合される。

## 【0151】

抗CD38 CAR-T細胞が、エフェクターT細胞として使用された。非形質導入T細胞(モックCAR-T)が、対照として使用される。エフェクターT細胞は、1:1のエフェクター対標的比で2通りに標的細胞/陰性対照細胞混合物と共培養される。エフェクターT細胞を含まない標的細胞/陰性対照細胞混合物のみの群が、対照として含まれる。細胞が、フローサイトメトリー分析の前に37で24時間インキュベートされる。ヨウ化プロピジウム(ThermoFisher)が、生存率染料として使用される。特異的細胞溶解の計算については、生標的細胞対生陰性対照細胞の分画(標的分画と称される)が使用される。特異的細胞溶解が、((エフェクター細胞を含まない標的分画-エフェクター細胞を含む標的分画)/(エフェクターを含まない標的分画))×100%として計算される。

40

50

## 【 0 1 5 2 】

実施例 4：操作された H S C に対する抗 C D 3 8 抗体薬物コンジュゲートの効果

表 1 および 2 に示される g R N A を使用して産生される遺伝子組換え細胞が、ベランタマブマホドチンなどの抗体薬物コンジュゲートによる殺傷について評価され得る。

## 【 0 1 5 3 】

動員された末梢血由来の凍結 C D 3 4 + H S P C が解凍され、C a s 9 および s g R N A を含むリボ核タンパク質を用いたエレクトロポレーションの前に 7 2 時間培養された。

サンプルが、以下の条件でエレクトロポレーションされる：

i . ) モック ( C a s 9 のみ )、

i i . K O s g R N A ( 表 1 ~ 5 に示される C D 3 8 g R N A のうちのいずれか 1 つなど ) 10

## 【 0 1 5 4 】

細胞が、7 2 時間回復させられ、ゲノム D N A が、収集および分析される。

## 【 0 1 5 5 】

C D 3 8 陽性細胞の割合が、フローサイトメトリーによって評価され、C D 3 8 g R N A を用いた編集が C D 3 8 のノックアウトに効果的であることを確認する。H S C における編集事象は、様々な I n d e l 配列をもたらす。

## 【 0 1 5 6 】

( i ) 抗体薬物コンジュゲートに対する C D 3 8 欠失を有する細胞の感受性

インビトロ毒性を決定するために、細胞が、培養培地中で抗体薬物コンジュゲートとともにインキュベートされ、生細胞の数が、経時的に定量化される。本明細書に記載される C D 3 8 g R N A を用いて生成された、C D 3 8 が欠損しているか、C D 3 8 発現が低減した操作された細胞は、全長 C D 3 8 を発現する細胞 ( モック ) よりも抗体薬物コンジュゲート治療に耐性がある。 20

## 【 0 1 5 7 】

( i i ) C D 3 8 修飾細胞の濃縮

C D 3 8 修飾細胞が抗体薬物コンジュゲートを用いた治療後に濃縮されるかどうかをアッセイするために、C D 3 4 + H S P C が、5 0 % の標準ヌクレアーゼ ( 例えば、C a s 9、C p f 1 ) 対 g R N A 比で編集される。細胞のバルク集団が、抗体薬物コンジュゲートを用いた治療の前および後に分析される。抗体薬物コンジュゲートを用いた治療後、C D 3 8 欠損細胞の割合が増加するように、C D 3 8 修飾細胞が濃縮される。 30

## 【 0 1 5 8 】

( i i i ) C D 3 4 + H S P C のインビトロ分化

細胞集団が、分化後の様々な日に、抗体薬物コンジュゲートを用いた治療の前および後のリンパ球分化について評価される。本明細書に記載される C D 3 8 g R N A を用いて生成された、操作された C D 3 8 ノックアウト細胞が、リンパ球分化マーカーの発現の増加を示す一方で、全長 C D 3 8 を発現する細胞 ( モック ) は、分化しない。

## 【 0 1 5 9 】

実施例 5：インビボでの C D 3 8 K O C D 3 4 + 細胞の持続性の評価

動員された末梢血 C D 3 4 + H S C ( m P B C D 3 4 + H S P C ) における編集 40

g R N A ( S y n t h e g o ) が、実施例 1 に記載されるように設計された。m P B C D 3 4 + H S P C が、F r e d H u t c h i n s o n C a n c e r C e n t e r から購入され、製造業者の指示に従って解凍される。次いで、これらの細胞は、本明細書に記載される C D 3 8 標的化 g R N A、ならびにヒトまたはマウスゲノム内の任意の領域を標的としないように設計されている非 C D 3 8 標的化対照 g R N A ( g C t r l ) を使用して、実施例 1 に記載されるように C R I S P R / C a s 9 を介して編集される。

## 【 0 1 6 0 】

エクスピボ編集後 4、2 4、および 4 8 時間に、生存能力のある編集された C D 3 8 K O 細胞および対照細胞の割合が、フローサイトメトリーおよび 7 A A D 生存率染料を使用して定量化される。本明細書に記載される C D 3 8 g R N A を使用して編集された高レ 50

ベルのCD38 KO細胞は、生存能力があり、エレクトロポレーションおよび遺伝子編集後に経時的に生存能力があるままである。これは、非CD38標的化対照gRNA、gCtrlで編集された対照細胞で観察されるものに類似する。

【0161】

加えて、エクスピボ編集後48時間に、ゲノムDNAが、実施例1に記載されるように、INDEL（挿入/欠失）によって評価される編集の割合を決定するために、細胞から採取され、標的領域に隣接するプライマーでPCR増幅され、精製され、TIDEによって分析される。

【0162】

TIDE分析後、本明細書に記載されるCD38 gRNAを用いた編集後の長期HSC (LT-HSC)の割合が、フローサイトメトリーによって定量化される。指定されたCD38 gRNAを用いた編集後のLT-HSCの割合が、評価される。このアッセイは、例えば、インピボでのCD38 KO細胞の持続性の調査のためにマウスに注射する前に、編集された細胞の凍結保存時に実施され得る。編集された細胞は、1バイアル当たり1 mL体積の培地において、 $5 \times 10^6$ 細胞/mLでCryosstor（登録商標）CS10培地（Stem Cell Technology）中で凍結保存される。

【0163】

インピボでのCD38 KO mPB CD34+HSPCの生着効率および持続性の調査6~8週齢のメスNSGマウス（JAX）が、2~7日間順応させられる。順応後、X線照射器による175cGy全身照射を使用して、マウスが照射される。これは、調査の0日目とみなされた。照射後の4~10時間に、マウスに、本明細書に記載されるCD38 gRNAのいずれかの間に生成されたCD38 KO細胞、またはgCtrlで編集された対照細胞が生着される。凍結保存細胞が解凍され、BioRad TC-20自動細胞カウンターを使用して計数される。生細胞の数が、解凍されたバイアス内で定量化され、これは、マウスにおける生着のための細胞の総数を調製するために使用される。マウスに、100  $\mu$ L体積において $1 \times 10^6$ 個の編集された細胞の単回静脈内注射が与えられる。体重および臨床観察が、4つの群内の各マウスについて週に1回記録される。

【0164】

生着後の8週目および12週目に、50  $\mu$ Lの血液が、フローサイトメトリーによる分析のために、眼窩後方出血によって各マウスから収集される。生着後の16週目に、マウスが殺処分され、血液、脾臓、および骨髄が、フローサイトメトリーによる分析のために収集される。骨髄が、大腿骨および脛骨から単離される。大腿骨由来の骨髄も、標的上編集分析に使用される。フローサイトメトリーが、FACSCanto（商標）10カラーおよびBDFACSDiva（商標）ソフトウェアを使用して実施される。細胞が、一般的に、最初に7AAD生存率染料を使用して生存率別に選別され（生/死分析）、次いで、生細胞が、マウスCD45（mCD45）ではなくヒトCD45（hCD45）の発現によってゲーティングされる。次いで、hCD45+である細胞が、ヒトCD19（hCD19）（リンパ系細胞、具体的にはB細胞）の発現について更にゲーティングされる。ヒトCD45（hCD45）を発現する細胞もゲーティングされ、骨髄系統の様々な細胞マーカーの存在について分析された。

【0165】

細胞が生着された、編集された細胞にかかわらず、全てのマウスにわたって同等である分析されたマーカーの各々を発現する細胞の数は、マウスの血液中の本明細書に記載されるgRNAのうちのいずれかで編集されたCD38 KO細胞の成功した生着を示す。

【0166】

生着後の8週目、12週目、および16週目に、hCD45+である有核血液細胞の割合が、対照gRNA（gCtrl）で編集された対照細胞、またはCD38 KO細胞を受容したマウスの群（n=15匹のマウス/群）で定量化される。これは、hCD45+絶対細胞数をマウスCD45+（mCD45）絶対細胞数で割ることによって定量化される。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 7 】

血液中の h C D 3 8 + 細胞の割合も、対照および C D 3 8 K O マウス群において生着後の 8 週目に定量された。C D 3 8 K O 細胞（本明細書に記載される C D 3 8 g R N A のうちのいずれかで編集された）を生着されたマウスは、8、12、および 16 週目に対照細胞を生着されたマウスと比較して、著しく低いレベルの h C D 3 8 + 細胞を有すると予期される。

## 【 0 1 6 8 】

次に、血液中の C D 1 9 + リンパ系細胞、h C D 1 4 + 単球、および h C D 1 1 b + 顆粒球 / 好中球などの分化した細胞の特定の集団の割合が、C D 3 8 K O 細胞または対照細胞を生着されたマウスにおける生着後の 8 週目、12 週目、および 16 週目に定量化される。血液中の h C D 1 9 + 細胞、h C D 1 4 + 細胞、および h C D 1 1 b + 細胞のレベルは、対照群と C D 3 8 K O 群との間で同等であり、これらの細胞のレベルは、生着後 8 週目から 16 週目まで同等のままであった。血液中の同等レベルの h C D 1 9 +、h C D 1 4 +、および h C D 1 1 b + 細胞は、類似レベルのヒト骨髄細胞およびリンパ系細胞集団が、C D 3 8 K O 細胞を受容したマウスおよび対照細胞を受容したマウスに存在したことを示す。

10

## 【 0 1 6 9 】

最後に、アンプリコンシーケンスが、生着後 16 週目に単離された骨髄サンプルに実施されて、編集された C D 3 8 K O 細胞を生着されているマウスにおける標的上 C D 3 8 標的化を分析し得る。

20

## 【 0 1 7 0 】

生着動物の脾臓から取得された細胞サンプルからの結果

生着後 16 週目に、h C D 4 5 + 細胞の割合および h C D 3 8 + 細胞の割合も、対照細胞または C D 3 8 K O 細胞を生着されているマウスの脾臓で定量化される。マウス（対照細胞または C D 3 8 K O 細胞を生着された）の群間の同等レベルの h C D 4 5 + 細胞および低減したレベルの h C D 3 8 + 細胞は、N S G マウスの脾臓における C D 3 8 K O H S C の長期持続性を示す。

## 【 0 1 7 1 】

加えて、生着後 16 週目に、脾臓における h C D 1 4 + 単球、h C D 1 1 b + 顆粒球 / 好中球、C D 1 9 + リンパ系細胞、および h C D 3 + T 細胞の割合が定量化される。対照群と C D 3 8 K O 群との間の脾臓における同等レベルの h C D 1 4 + 細胞、h C D 1 1 b + 細胞、h C D 1 9 + 細胞、および h C D 3 + は、編集された C D 3 8 K O 細胞が、N S G マウスの脾臓において多系列ヒト造血細胞再構成が可能であることを示す。

30

## 【 0 1 7 2 】

好中球を評価する血液および骨髄における結果

生着後 16 週目に、h C D 1 1 b + 細胞の割合が、対照細胞または C D 3 8 K O 細胞を生着されたマウスの血液および骨髄で定量化される。N S G マウスの血液および骨髄の両方における対照細胞および C D 3 8 K O 細胞を生着されたマウスで観察される同等レベルの C D 1 1 b + 好中球集団は、成功した生着および分化を示す。

## 【 0 1 7 3 】

骨髄およびリンパ系前駆細胞を評価する血液および骨髄における結果

また、16 週目に、血液中の h C D 1 2 3 + 細胞の割合および骨髄中の h C D 1 2 3 + 細胞の割合、ならびに骨髄中の h C D 1 0 + 細胞の割合が、対照細胞または C D 3 8 K O 細胞を生着されたマウスで定量化される。対照群と C D 3 8 K O 群との間の同等レベルの骨髄およびリンパ系前駆細胞は、成功した生着および発生を示した。

40

## 【 0 1 7 4 】

実施例 6 : 異なるドナー C D 3 4 + 細胞における C D 3 8 編集および細胞表面発現の評価  
C D 3 8 遺伝子の C R I S P R 誘発性遺伝子修飾を誘導し、それによって、標的細胞における C D 3 8 表面発現を低減する本開示の C D 3 8 特異的 g R N A の能力を評価するために、3 人の異なるヒトドナーからの C D 3 4 + 細胞 ( H S P C ) が収集され、C a s 9

50

および例示的なCD38 gRNA（例えば、gRNA CD38-8、gRNA CD38-11、またはgRNA CD38-7）を含むリボ核タンパク質複合体でエレクトロポレーションされた。

表9：選択されたgRNAの標的化ドメイン配列

【表9】

gRNA CD38-8	GACGGUCUCGGGAAAGCGCU(配列番号 65)
gRNA CD38-11	GCGCUUCCCCGAGACCGUCC(配列番号 68)
gRNA CD38-7	CUUGACGCAUCGCGCCAGGA(配列番号 64)

10

【0175】

エレクトロポレーション後2日および5日目に、陽性CD38+細胞の割合、CD38幾何平均蛍光強度(gMFI)、およびモックの割合が決定された(図7A~7C)。モックの割合が、CD38編集サンプルのgMFIをモックエレクトロポレーション対照gMFIで割ることによって計算された。結果は、エレクトロポレーション後5日目に、3人全てのドナーのCD34+細胞がCD38表面タンパク質発現の約80%の減少を示したことを示す。これらの結果は、例えば、複数の異なるヒトドナーからの細胞におけるエレクトロポレーション後5日目に、CD38発現を劇的に減少させることにおける本開示のCD38 gRNAの有効性を実証した。

20

【0176】

選択された3つのCD38標的化gRNAによって誘導された編集によって達成された編集効率およびINDELスペクトルが、3つの異なるCD34+ヒトドナー細胞サンプルで評価された(図8A-8B)。編集効率およびINDELスペクトルが、DNAシーケンシングおよびTIDE/ICEを使用して評価された。INDELスペクトルデータが、表10に更に表示される。

表10：ドナーHSPC上の選択されたgRNAを使用したCD38編集からのINDELスペクトルデータ

【表10】

ドナー	ドナー1		ドナー2		ドナー3	
時間	2日	5日	2日	5日	2日	5日
gRNA CD38-8	69.0% (-2, 1)	82.0% (-2, 1)	68.0% (-2, 1)	86.0% (-2, 1)	59.0% (-2, 1)	75.0% (-2, 1)
gRNA CD38-11	89.0% (-1)	89.0% (-1)	94.0% (-1)	98.0% (-1)	93.0% (-1)	95.0% (-1)
gRNA CD38-7	不明	不明	77.0% (+1)	86.0% (+1)	74.0% (+1)	92.0% (+1)

30

40

【0177】

結果は、エレクトロポレーション後2日目または5日目に、高レベルのCD38修飾が、3人全てのドナーにわたって一貫したCD38 gRNAを伴って達成されたことを示した(図8A)。結果は、達成されたINDELスペクトルが、CD38 gRNAの間および3人全てのドナーにわたって同等であったことを示した(図8Bおよび表10)。これらの結果は、複数の異なるヒトドナー細胞にわたって本開示のCD38 gRNAを使用して達成された一貫した遺伝子修飾を実証した。

【0178】

3つの選択されたCD38標的化gRNAによって誘導されたCRISPRによるCD

50

38 編集の持続性が、5つの異なるヒトドナー CD34 + 細胞サンプル：図 7A ~ 8B からの3つのドナーサンプルおよび2人の追加の異なるヒトドナーで評価された。HSPC における CD38 編集効率が、TIDE / ICE によって、エレクトロポレーション後2日目、5日目、および7日目に評価され (図 10A)、CD34 + 細胞サンプル中の CD38 + 細胞の割合が、エレクトロポレーション後2日目、5日目、7日目、および9日目に決定された (図 10B)。データは、5つ全てのドナーサンプルからのデータの平均を表す。結果は、CD38 編集効率が持続し、エレクトロポレーション後2日目、5日目、および7日目に一貫したままであることを示した。一致して、CD38 + 細胞の割合は、エレクトロポレーション後少なくとも9日間持続する、エレクトロポレーション後5日目の約80%の減少を示した。これらの結果は、CD38 gRNA を使用した CD38 編集が安定しており、エレクトロポレーション後少なくとも1週間持続し、表面発現が遺伝子編集に追いついた後に、表面 CD38 + タンパク質発現が同様に安定していることを実証した。

10

#### 【0179】

実施例 7：編集された THP-1 細胞の CD38 編集および成長 / 生存率の評価

実施例 6 の選択された CD38 gRNA を使用した CD38 編集の効果が、THP-1 細胞で調べられた。THP-1 細胞は、急性単球性白血病患者に由来するヒト単球性細胞である。かかる増殖細胞株における CD38 編集の効果を評価することは、編集された細胞の成長または生存率における任意の改変をより良好に検出し得、本開示の gRNA を使用した CRISPR 誘発性 CD38 遺伝子修飾の有効性の更なる試験を提供する。THP-1 細胞が、Cas9 および例示的な CD38 gRNA (gRNA CD38-8、gRNA CD38-11、または gRNA CD38-7) のうちの1つを含むリボ核タンパク質複合体で0日目にエレクトロポレーションされた。総細胞数および生細胞であった細胞の割合が、エレクトロポレーション後12日間、毎日決定された (図 11A ~ 11B)。編集されたサンプルが、「野生型」未編集 THP-1 細胞と比較された。結果は、CD38 編集 THP-1 細胞が12日間の試験期間にわたって増殖し、生細胞レベルの割合が上昇し、エレクトロポレーション後5日目までに野生型 THP-1 細胞と合致したことを示す。これらの結果は、THP-1 細胞における CD38 の編集が、細胞の成長または生存率に関して利点または不利点を伝えないことを示し、CD38 の編集が成長または生存率に影響を及ぼさなかったことを示唆する。

20

30

#### 【0180】

CD38 編集効率、CD38 RNA 発現レベル、および CD38 表面タンパク質について陽性であった THP-1 細胞の割合が、THP-1 細胞における CD38 gRNA を使用した編集を評価するために決定された (図 12A ~ 12C)。CD38 編集効率および転写物発現が、それぞれ、DNA シーケンシングおよび RNA 定量化によって決定された。CD38 + 細胞の割合が、FACS によって決定された。結果は、CD38 gRNA が CRISPR 誘発性 CD38 編集を高い効率で誘導し、CD38 をコードする RNA 転写物の約80%の減少、および CD38 + 細胞の割合の71 ~ 91%の減少を生じること示した。結果は、CD38 遺伝子の編集、転写物の減少、および表面タンパク質の減少が、エレクトロポレーション後少なくとも11日まで持続することを示した。これらの結果は、本開示の CD38 特異的 gRNA が、THP-1 細胞内の CD38 遺伝子を効果的かつ安定的に編集し、成長または生存率への影響が観察されなかった期間にわたってそのように編集することを実証した。

40

#### 【0181】

実施例 8：編集された HSPC の CD38 編集および成長 / 生存率の評価

HSC および HSPC を検出し、その成長および分裂の能力を、インビトロコロニー形成細胞アッセイによって評価することができる。CD34 + HSPC が、ヒトドナーから単離され、Cas9 および本明細書に記載される CD38 gRNA を含むリボ核タンパク質複合体でエレクトロポレーションされた。CD38 編集 HSPC のコロニー形成能力が、モックエレクトロポレーション HSPC を対照として用いて、製造業者のプロトコル

50

に従ってSTEMvision(商標)デバイスを使用して評価された。400個の細胞が、2通りに播種された。BFU-Eプロトコルが、赤血球分化細胞コロニーを測定し、G/M/GMプロトコルが、骨髄分化細胞コロニーを測定し、GEMMが、分化した細胞の混合物のコロニーを測定した(図13A~13C)。結果は、CD38編集ヒトドナーHSPCが、モックエレクトロポレーションヒトドナーHSPCと類似するコロニー形成能力を示すことを示した。これらの結果は、本開示のCD38特異的gRNAによって誘導されるヒトHSPCの遺伝子編集が、HSPCの成長、生存率、または分化に著しい影響を及ぼさないことを示唆した。

#### 【0182】

INDELスペクトルが、CD38編集細胞においてヒトドナーHSPCについて評価された。HSPCが、Cas9および本明細書に記載されるCD38gRNAを含むリボ核タンパク質複合体でエレクトロポレーションされた。INDEL分析が、エレクトロポレーションの2日後に培養中のバルクHSPCにTIDE/ICEを使用して実施され、エレクトロポレーションの14日後に評価されたコロニー形成HSPCのINDELと比較された(図14A~14C)。結果は、所与のCD38特異的gRNAを用いた編集のためのINDELパターンが、エレクトロポレーションの少なくとも14日後に持続し、コロニーを形成した編集されたHSPCのINDELパターンが、培養中のバルクHSPCのパターンと類似することを示した。これらの結果は、CD38編集HSPCに存在するINDELが、HSPC集団全体のINDELを代表することを実証した。結果はまた、選択されたCD38特異的gRNAを使用したCD38編集によって生じたINDELのいずれも、著しい成長/生存率の利点をもたらさないことも実証した。結果は、CD38編集がエレクトロポレーションの少なくとも14日後に持続し、本開示のCD38特異的gRNAによって誘導されたCRISPRによって生じた遺伝子修飾の安定性を反復することを更に実証した。

#### 【0183】

##### 参考文献

例えば、背景技術、発明の概要、発明を実施するための形態、実施例、および/または参考文献の節で、本明細書に述べられる全ての刊行物、特許、特許出願、公開、およびデータベース入力(例えば、配列データベース入力)は、各個々の刊行物、特許、特許出願、公開、およびデータベース入力、参照により具体的かつ個別に本明細書に組み込まれた場合のように、参照によりそれらの全体で本明細書に組み込まれる。矛盾がある場合、本明細書の任意の定義を含む本出願が優先されるであろう。

#### 【0184】

##### 均等物および範囲

当業者は、本明細書に記載される実施形態の多くの均等物を認識するか、または日常的な実験のみを使用して確認することができるであろう。本開示の範囲は、上記の説明に限定されることを意図しておらず、むしろ添付の特許請求の範囲に記載されるとおりである。

#### 【0185】

「a」、「an」、および「the」などの冠詞は、反対の指示がない限り、または文脈から明らかでない限り、1つまたは1つより多くを意味し得る。群の2つ以上のメンバーの間に「または」を含む、請求項または明細書は、反対の指示がない限り、または文脈から明らかでない限り、群のメンバーのうちの1つ、1つより多く、または全てが存在する場合に満たされるとみなされる。2つ以上の群のメンバーの間に「または」を含む群の開示は、群の正確に1つのメンバーが存在する実施形態、群の1つより多くのメンバーが存在する実施形態、および群のメンバーの全てが存在する実施形態を提供する。簡潔にするために、これらの実施形態は、本明細書では個別には詳述されていないが、これらの実施形態の各々は、本明細書で提供され、具体的に主張または否定され得ることが理解されるであろう。

#### 【0186】

10

20

30

40

50

本発明は、請求項のうちの1つ以上、または明細書の1つ以上の関連部分からの1つ以上の制限、要素、節、または説明用語が、別の請求項に導入される、全ての変形例、組み合わせ、および順序を包含することを理解されたい。例えば、別の請求項に従属する請求項は、同じ基本請求項に従属する任意の他の請求項で見出される制限のうちの1つ以上を含むように修正され得る。更に、請求項が組成物を列挙する場合、別段の指示がない限り、または矛盾もしくは不一致が生じることが当業者に明白ではない限り、本明細書に開示される作製もしくは使用方法のうちのいずれかによる、または存在する場合、当技術分野で公知の方法による、組成物を作製もしくは使用する方法が含まれることを理解されたい。

【0187】

10

要素が、例えば、マーカッシュ群形式でリストとして提示される場合、要素の全ての可能な部分群も開示されており、任意の要素または要素の部分群が群から削除され得ることを理解されたい。また、「含む」という用語は、開放的であることを意図し、追加の要素またはステップの包含を可能にすることにも留意されたい。一般的に、実施形態、製品、または方法が、特定の要素、特徴、またはステップを含むと言及される場合、かかる要素、特徴、もしくはステップからなる、またはそれらから本質的になる実施形態、製品、または方法も同様に提供されることが理解されるべきである。簡潔にするために、これらの実施形態は、本明細書では個別には詳述されていないが、これらの実施形態の各々は、本明細書で提供され、具体的に主張または否定され得ることが理解されるであろう。

【0188】

20

範囲が与えられる場合、終点が含まれる。更に、別段の指示がない限り、または文脈および/もしくは当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表される値は、文脈が明確に別段に指示しない限り、いくつかの実施形態では、範囲の下限の単位の1/10まで、記載された範囲内の任意の特定の値を想定し得ることを理解されたい。簡潔にするために、各範囲内の値は、本明細書には個別に詳述されていないが、これらの値の各々は、本明細書に提供され、具体的に主張または否認され得ることが理解されるであろう。また、別段の指示がない限り、または文脈および/もしくは当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表される値は、所与の範囲内の任意の部分範囲を想定することができ、部分範囲の終点は、範囲の下限の単位の1/10と同程度の精度で表されることも理解されたい。

30

【0189】

加えて、本発明の任意の特定の実施形態は、請求項のうちのいずれか1つ以上から明示的に除外され得ることを理解されたい。範囲が与えられる場合、その範囲内の任意の値は、請求項のうちのいずれか1つ以上から明示的に除外され得る。本明細書に記載される組成物および/または方法の任意の実施形態、要素、特徴、用途、または態様を、いずれか1つ以上の請求項から除外することができる。簡潔にするために、1つ以上の要素、特徴、目的、または態様が除外される実施形態の全ては、本明細書に明示的に記載されていない。

40

50



【 図 3 A - 3 B 】

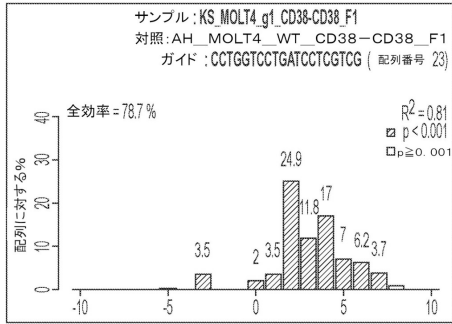


図 3A

【 図 3 C - 3 D 】

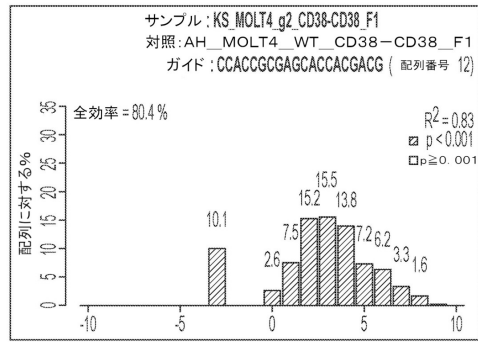


図 3C

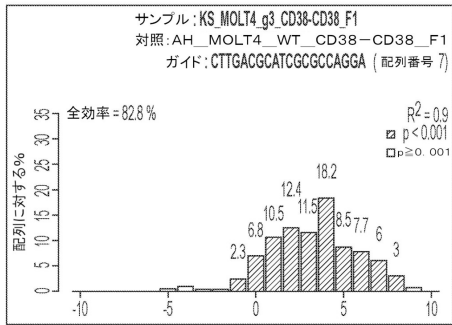


図 3B

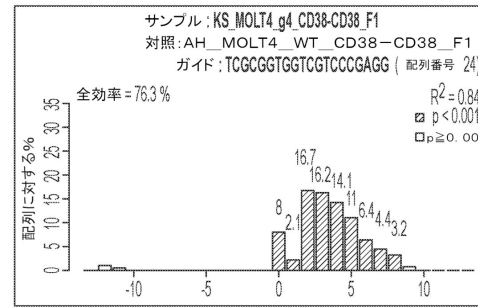


図 3D

【 図 3 E - 3 F 】

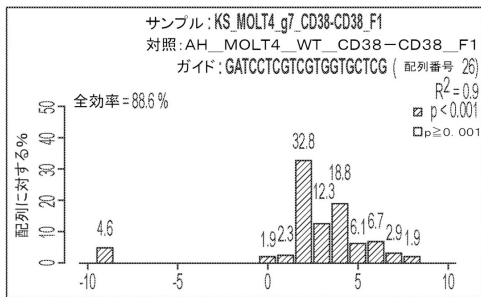


図 3E

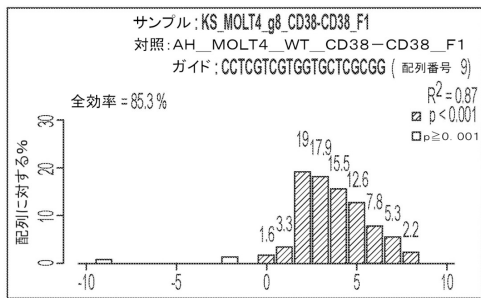


図 3F

【 図 4 A - 4 B 】

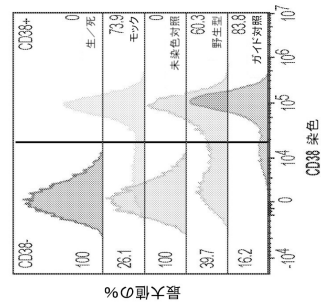


図 4B

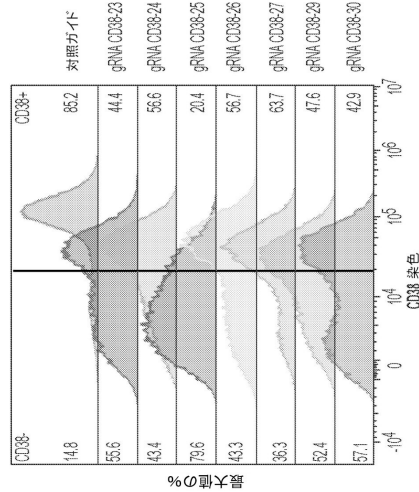


図 4A

10

20

30

40

50

【 図 5 A - 5 B 】

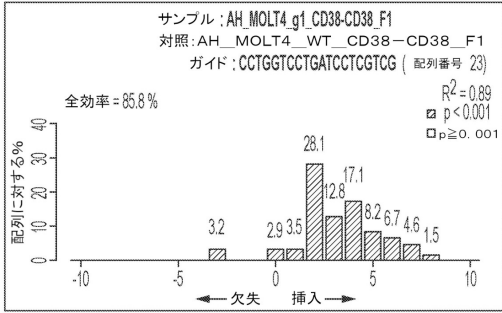


図 5A

【 図 5 C - 5 D 】

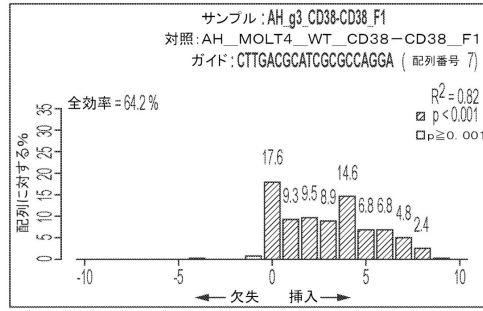


図 5C

10

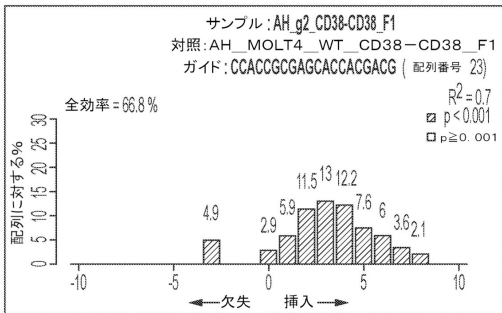


図 5B

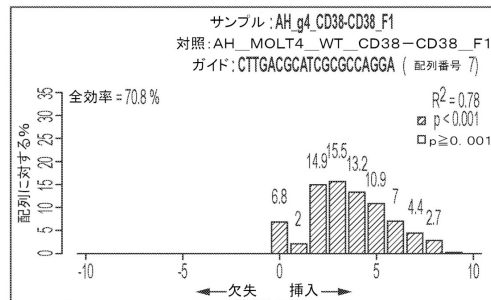


図 5D

20

【 図 5 E - 5 F 】

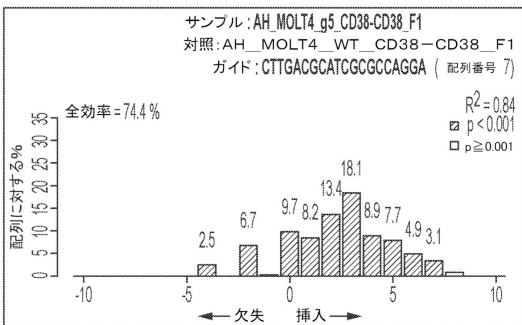


図 5E

【 図 5 G 】

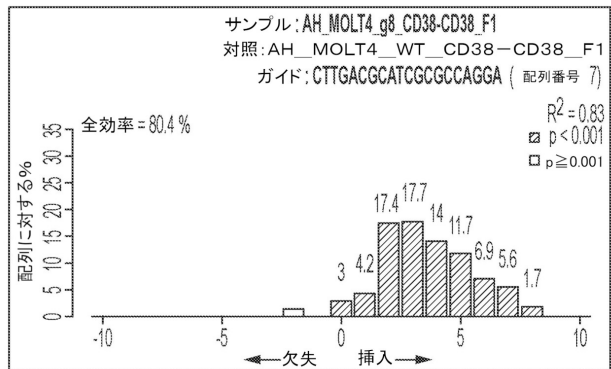


図 5G

30

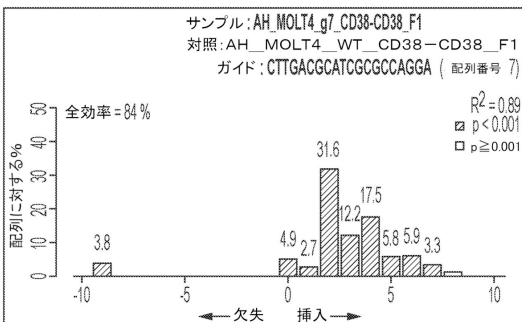


図 5F

40

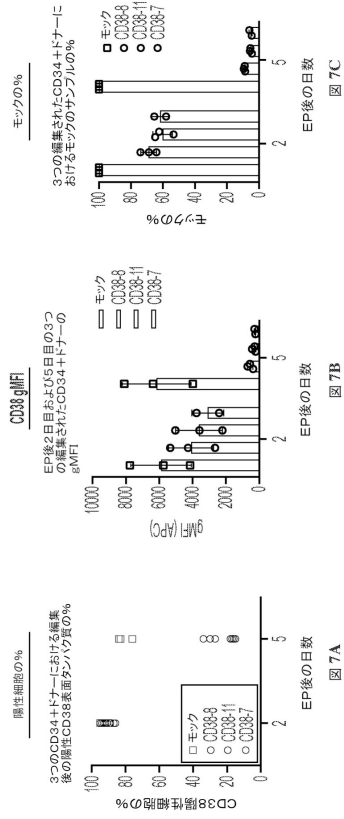
50

【 図 6 】



図 6

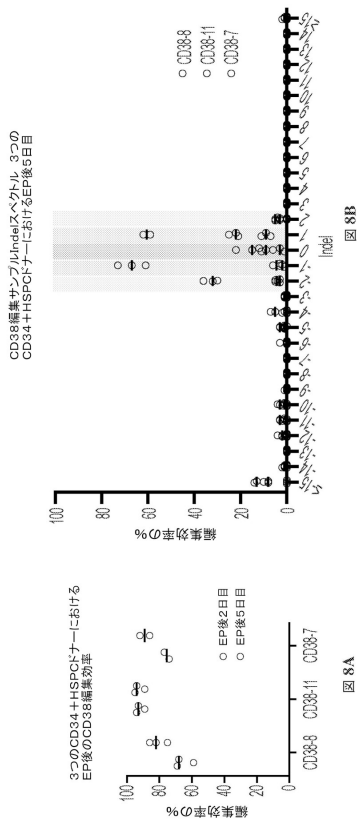
【 図 7 A - 7 C 】



10

20

【 図 8 A - 8 B 】



【 図 9 】

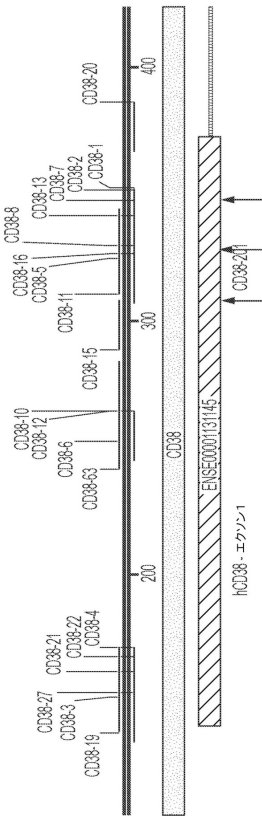


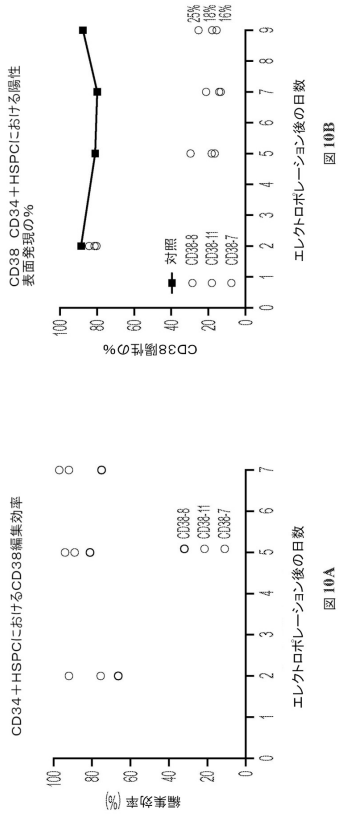
図 9

30

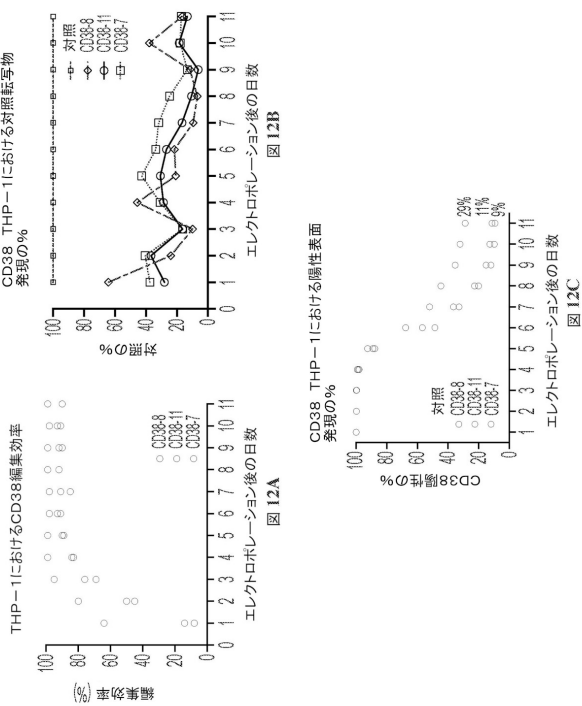
40

50

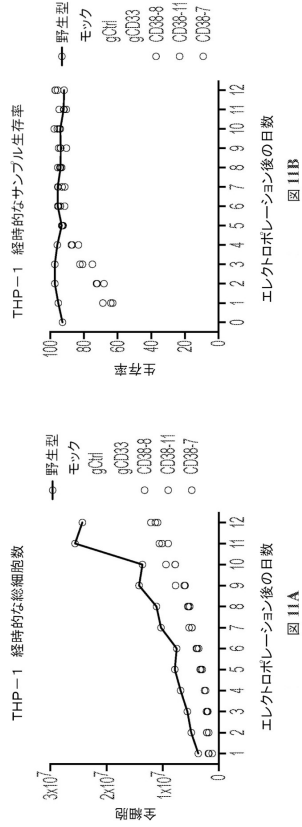
【 図 10 A - 10 B 】



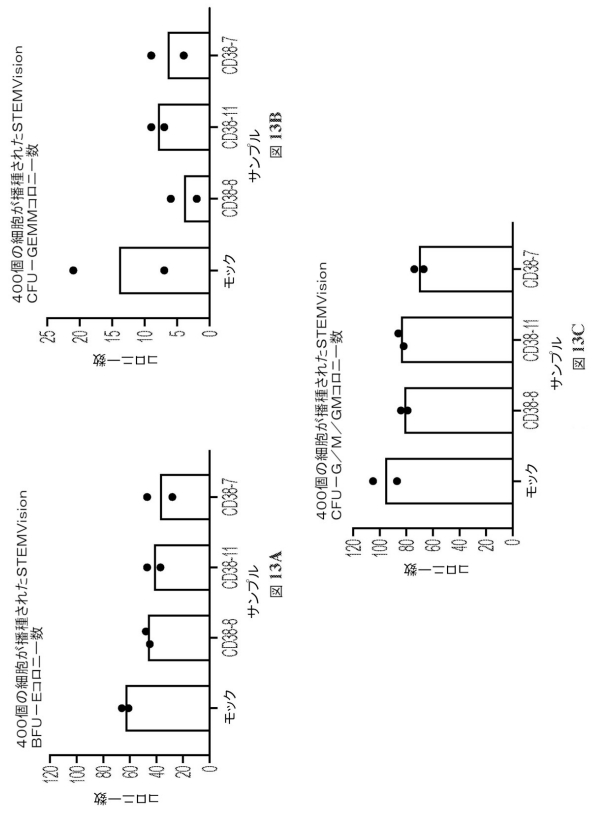
【 図 12 A - 12 C 】



【 図 11 A - 11 B 】



【 図 13 A - 13 C 】



10

20

30

40

50



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/050328

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N15/113 C12N5/078 A61K35/14 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K		
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, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	O. SHALEM ET AL: "Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells", SCIENCE, vol. 343, no. 6166, 12 December 2013 (2013-12-12), pages 84-87, XP055115506, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1247005 figure 2; table S1 the whole document	1-34
X	----- WO 2019/191495 A1 (FATE THERAPEUTICS INC [US]) 3 October 2019 (2019-10-03) claims 18-21; examples 2, 5; table 3; sequences 1-6 the whole document ----- -/--	1-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 2 December 2021		Date of mailing of the international search report 08/12/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Spindler, Mark-Peter

10

20

30

40

2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/050328

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/025323 A1 (CELLECTIS [FR]) 16 February 2017 (2017-02-16) page 87; claims 18-21, 31, 32, 51-58, 60-67; figures 1, 4-7; examples 1, 3, 5 the whole document	1-46
X	----- NAGAI YUYA ET AL: "CD38 Knockout Primary NK Cells to Prevent "Fratricide" and Boost Daratumumab Activity", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 134, 13 November 2019 (2019-11-13), page 870, XP086671884, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2019-129456 figure 1 the whole document	1-46
X	----- WO 2020/047164 A1 (VOR BIOPHARMA INC [US]; PURETECH MAN INC [US]) 5 March 2020 (2020-03-05) claims 4, 13, 15, 16; table 1A the whole document	1-46
X,P	----- WO 2020/257504 A1 (FUNCTION ONCOLOGY INC [US]) 24 December 2020 (2020-12-24) page 148; claims 4, 12-22, 46, 49; table 6; sequences 2428, 2429 the whole document	1-18, 25-31

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US2021/050328

**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:

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/050328

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019191495 A1	03-10-2019	AU 2019243315 A1	24-09-2020
		BR 112020019205 A2	05-01-2021
		CA 3093020 A1	03-10-2019
		CN 111954715 A	17-11-2020
		EP 3775228 A1	17-02-2021
		JP 2021519061 A	10-08-2021
		KR 20200127250 A	10-11-2020
		SG 11202008977U A	29-10-2020
		US 2021024959 A1	28-01-2021
		WO 2019191495 A1	03-10-2019
WO 2017025323 A1	16-02-2017	AU 2016307050 A1	15-02-2018
		BR 112018002600 A2	23-10-2018
		CA 2994746 A1	16-02-2017
		CN 108495641 A	04-09-2018
		EP 3334442 A1	20-06-2018
		JP 2018522907 A	16-08-2018
		KR 20180041152 A	23-04-2018
		RU 2018107754 A	12-09-2019
		US 2018236053 A1	23-08-2018
		WO 2017025323 A1	16-02-2017
WO 2020047164 A1	05-03-2020	AU 2019333104 A1	25-03-2021
		BR 112021003670 A2	18-05-2021
		CA 3110837 A1	05-03-2020
		CN 113423725 A	21-09-2021
		EP 3844187 A1	07-07-2021
		SG 11202101994X A	30-03-2021
		US 2020093865 A1	26-03-2020
		US 2020138869 A1	07-05-2020
		US 2020318071 A1	08-10-2020
		US 2021220407 A1	22-07-2021
		US 2021228641 A1	29-07-2021
		US 2021236559 A1	05-08-2021
		US 2021315936 A1	14-10-2021
WO 2020047164 A1	05-03-2020		
WO 2020257504 A1	24-12-2020	NONE	

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 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 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 N 5/078(2010.01)	A 6 1 K 39/395	D
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/078	Z N A
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
	C 0 7 K 14/725	

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

(72)発明者 ライダード, ジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0、ケンブリッジ、ケンブリッジパーク ドライブ  
1 0 0、スイート 4 0 0

(72)発明者 ジョーンズ, マーク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0、ケンブリッジ、ケンブリッジパーク ドライブ  
1 0 0、スイート 4 0 0

(72)発明者 ペティーリオ, マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0、ケンブリッジ、ケンブリッジパーク ドライブ  
1 0 0、スイート 4 0 0

(72)発明者 チャクラボーティ, ティルタ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0、ケンブリッジ、ケンブリッジパーク ドライブ  
1 0 0、スイート 4 0 0

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 AC14 AC20 BA03 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA13 NA14 ZB26

4C085 AA13 BB31 CC22 DD61 EE01

4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 NA14 ZB26

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA72 CA40 DA50 DA76

EA28 FA74