

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-534387

(P2024-534387A)

(43)公表日 令和6年9月20日(2024.9.20)

(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 5/078(2010.01)	C 1 2 N 5/078	Z N A 4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/90 (2006.01)	C 1 2 N 15/90 Z	
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全232頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-516579(P2024-516579)
 (86)(22)出願日 令和4年9月14日(2022.9.14)
 (85)翻訳文提出日 令和6年5月14日(2024.5.14)
 (86)国際出願番号 PCT/US2022/043557
 (87)国際公開番号 WO2023/043858
 (87)国際公開日 令和5年3月23日(2023.3.23)
 (31)優先権主張番号 63/244,219
 (32)優先日 令和3年9月14日(2021.9.14)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)
 (31)優先権主張番号 63/278,375
 (32)優先日 令和3年11月11日(2021.11.11)
 (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)
 (31)優先権主張番号 63/343,408

最終頁に続く

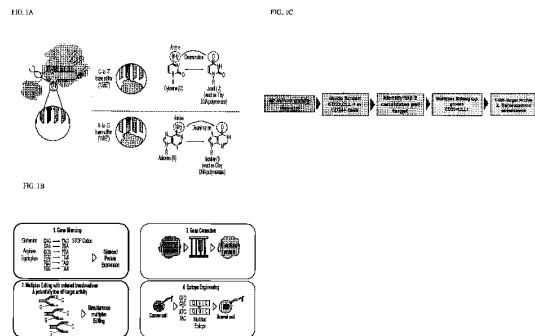
(71)出願人 519312511
 바이오オール バイオフーマ インコーポレーテッド
 V O R B I O P H A R M A I N C .
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02140、ケンブリッジ、ケンブリッジパークドライブ 100、スイート 400
 100 Cambridgepark Drive, Suite400, Cambridge, MA 02140, United States of America
 (74)代理人 110003971
 弁理士法人葛和国際特許事務所

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 造血細胞におけるマルチプレックス塩基編集のための組成物及び方法

(57)【要約】

がん患者が、例えば、免疫療法剤の形態で、系統特異的細胞表面抗原(例えば、CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2))を標的とする抗がん療法を投与される場合、療法は、系統特異的細胞表面抗原を発現するがん細胞だけでなく、「オンターゲット、オフ腫瘍」効果で系統特異的細胞表面抗原を発現する非がん細胞も枯渇させることができる。本開示は、例えば、内因性系統特異的細胞表面抗原(例えば、CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2))遺伝子において修飾(例えば、挿入又は欠失)を有する新規の細胞を提供する。本開示はまた、そのような修飾を行うために使用され得る組成物、例えば、gRNAも提供する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

表 1 ~ 19 の標的ドメインと結合する標的化ドメインを含む g R N A。

【請求項 2】

配列番号 1 ~ 2021 のうちのいずれか 1 つの核酸配列を含む標的ドメインと結合する、標的化ドメインを含む g R N A。

【請求項 3】

表 1 ~ 19 の標的ドメインの編集を指向することができる標的化ドメインを含む g R N A。

【請求項 4】

標的化ドメインを含む g R N A であって、前記標的化ドメインが、配列番号 1 ~ 2021 のうちのいずれか 1 つの核酸配列を含む、g R N A。

【請求項 5】

C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行請求項のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 6】

C L L - 1 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行請求項のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 7】

C D 1 23 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行請求項のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 8】

C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行請求項のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 9】

C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行請求項のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 10】

C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行請求項のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 11】

前記標的化ドメインは、前記 g R N A が遺伝子編集酵素と複合体を形成し、それによって g R N A : 酵素複合体を形成する、かつ前記 g R N A : 酵素複合体が標的核酸分子中の前記標的ドメインと結合するのに好適な条件下で、前記標的ドメイン内に編集事象を提供するように構成されている、先行請求項のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 12】

前記遺伝子編集酵素が、エンドヌクレアーゼを含む、請求項 11 に記載の g R N A。

【請求項 13】

前記エンドヌクレアーゼが、C a s エンドヌクレアーゼを含む、請求項 12 に記載の g R N A。

【請求項 14】

前記エンドヌクレアーゼが、触媒的に不活性な C a s 分子を含む、請求項 12 又は 13 に記載の g R N A。

【請求項 15】

前記エンドヌクレアーゼが、死滅 C a s (d C a s) を含む、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 16】

前記エンドヌクレアーゼが、死滅 C a s 9 (d C a s 9) を含む、請求項 15 に記載の g R N A。

【請求項 17】

前記エンドヌクレアーゼが、死滅 C a s 9 (d C a s 9) を含む、請求項 15 に記載の g R N A。

10

20

30

40

50

前記エンドヌクレアーゼが、ニッカ - ゼ (n C a s) を含む、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 1 8】

前記エンドヌクレアーゼが、n C a s 9 を含む、請求項 1 7 に記載の g R N A。

【請求項 1 9】

前記エンドヌクレアーゼが、1 つ以上のウラシルグリコシラーゼ阻害剤 (U G I) ドメインに融合された d C a s 又は n C a s を含む、請求項 1 2 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 2 0】

前記エンドヌクレアーゼが、塩基エディター (B E) に融合された d C a s 又は n C a s を含む、請求項 1 2 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の g R N A。 10

【請求項 2 1】

前記エンドヌクレアーゼが、アデニン塩基エディター (A B E) に融合された d C a s 又は n C a s を含む、請求項 1 2 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 2 2】

前記 A B E が、アデニンデアミナーゼ酵素を含む、請求項 2 1 に記載の g R N A。

【請求項 2 3】

前記エンドヌクレアーゼが、シトシン塩基エディター (C B E) に融合された d C a s 又は n C a s を含む、請求項 1 2 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 2 4】

前記 C B E が、シチジンデアミナーゼ酵素を含む、請求項 2 3 に記載の g R N A。 20

【請求項 2 5】

前記核酸分子が、細胞のゲノム D N A に含まれる、請求項 1 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 2 6】

前記細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 2 5 に記載の g R N A。

【請求項 2 7】

前記細胞が、ヒト細胞である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の g R N A。

【請求項 2 8】

前記細胞が、C D 3 4 + 細胞である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の g R N A。 30

【請求項 2 9】

前記細胞が、造血細胞である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の g R N A。

【請求項 3 0】

前記細胞が、造血幹細胞である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の g R N A。

【請求項 3 1】

前記細胞が、造血前駆細胞である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の g R N A。

【請求項 3 2】

前記細胞が、免疫エフェクター細胞である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の g R N A。

【請求項 3 3】

前記細胞が、リンパ球である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の g R N A。 40

【請求項 3 4】

前記細胞が、T リンパ球である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の g R N A。

【請求項 3 5】

前記細胞が、ナチュラルキラー (N K) 細胞である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の g R N A。

【請求項 3 6】

前記細胞が、幹細胞である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の g R N A。

【請求項 3 7】

前記幹細胞が、胚性幹細胞 (E S C)、人工多能性幹細胞 (i P S C)、間葉系幹細胞、又は組織特異的幹細胞である、請求項 3 6 に記載の g R N A。 50

- 【請求項 38】
前記編集事象が、核酸塩基への化学的变化を含む、請求項 11 ~ 37 のいずれか一項に記載の gRNA。
- 【請求項 39】
前記編集事象が、シトシンの脱アミノ化を含む、請求項 38 に記載の gRNA。
- 【請求項 40】
前記編集事象が、アデニンの脱アミノ化を含む、請求項 38 に記載の gRNA。
- 【請求項 41】
前記編集事象が、核酸塩基転移を含む、請求項 38 に記載の gRNA。
- 【請求項 42】 10
前記編集事象が、核酸塩基転換を含む、請求項 38 に記載の gRNA。
- 【請求項 43】
前記編集事象が、シトシン - グアニン (C - G) 塩基対を、前記標的核酸分子内のチミン - アデニン (T - A) 塩基対に変換することを含む、請求項 38 に記載の gRNA。
- 【請求項 44】
前記編集事象が、チミン - アデニン (T - A) 塩基対を、前記標的核酸分子内のシトシン - グアニン (C - G) 塩基対に変換することを含む、請求項 38 に記載の gRNA。
- 【請求項 45】 20
前記編集事象が、前記標的核酸分子内に未成熟終止コドンを導入することを含む、請求項 38 に記載の gRNA。
- 【請求項 46】
前記編集事象が、前記標的核酸分子内にスプライス部位を導入することを含む、請求項 38 に記載の gRNA。
- 【請求項 47】
前記編集事象が、前記標的核酸分子内のスプライス部位を破壊することを含む、請求項 38 に記載の gRNA。
- 【請求項 48】
前記標的核酸分子が、染色体又はゲノム DNA 分子を含む、請求項 38 ~ 47 のいずれか一項に記載の gRNA。
- 【請求項 49】 30
前記標的核酸分子が、前記標的ドメインを含む、請求項 38 ~ 47 のいずれか一項に記載の gRNA。
- 【請求項 50】
前記 gRNA の前記標的化ドメインが、PAM 配列を含む鎖に相補的な鎖である、前記標的ドメインの配列に相補的な二本鎖標的核酸分子の配列と (完全又は部分的相補性で) 塩基対形成する、請求項 49 に記載の gRNA。
- 【請求項 51】
前記 gRNA の前記標的化ドメインが、前記 PAM 配列を含まない、請求項 50 に記載の gRNA。
- 【請求項 52】 40
前記 PAM の位置が、前記標的ドメインの配列の 5' 又は 3' であり得る、請求項 50 に記載の gRNA。
- 【請求項 53】
前記標的ドメイン中の前記標的核酸塩基の位置が、前記 PAM から約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は 20 個の核酸塩基である、請求項 51 に記載の gRNA。
- 【請求項 54】
前記編集事象が、細胞における CD33 (Siglec-3) の活性を低減する、請求項 11 ~ 53 のいずれか一項に記載の gRNA。
- 【請求項 55】 50

前記編集事象が、細胞におけるCD33 (Siglec-3) をコードする核酸の発現レベルを低減する、請求項11～54のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項56】

前記編集事象が、細胞におけるCD33 (Siglec-3) タンパク質の発現レベルを低減する、請求項11～55のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項57】

前記編集事象が、細胞における完全長CD33 (Siglec-3) RNA又はCD33 (Siglec-3) タンパク質の発現を低減又は無効化する、請求項11～56のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項58】

前記編集事象が、細胞におけるCLL-1の活性を低減する、請求項11～57のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項59】

前記編集事象が、細胞におけるCLL-1をコードする核酸の発現レベルを低減する、請求項11～58のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項60】

前記編集事象が、細胞におけるCLL-1タンパク質の発現レベルを低減する、請求項11～59のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項61】

前記編集事象が、細胞における完全長CLL-1 RNA又はCLL-1タンパク質の発現を低減又は無効化する、請求項11～60のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項62】

前記編集事象が、細胞におけるCD123の活性を低減する、請求項11～61のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項63】

前記編集事象が、細胞におけるCD123をコードする核酸の発現レベルを低減する、請求項11～62のいずれか一項に記載のgRNA

【請求項64】

前記編集事象が、細胞におけるCD123タンパク質の発現レベルを低減する、請求項11～63のいずれか一項に記載のgRNA

【請求項65】

前記編集事象が、細胞における完全長CD123 RNA又はCD123タンパク質の発現を低減又は無効化する、請求項11～64のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項66】

前記編集事象が、細胞におけるCD327 (Siglec-6) の活性を低減する、請求項11～65のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項67】

前記編集事象が、細胞におけるCD327 (Siglec-6) をコードする核酸の発現レベルを低減する、請求項11～66のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項68】

前記編集事象が、細胞におけるCD327 (Siglec-6) タンパク質の発現レベルを低減する、請求項11～67のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項69】

前記編集事象が、細胞における完全長CD327 (Siglec-6) RNA又はCD327 (Siglec-6) タンパク質の発現を低減又は無効化する、請求項11～68のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項70】

前記編集事象が、細胞におけるCD312 (EMR2) の活性を低減する、請求項11～69のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項71】

10

20

30

40

50

前記編集事象が、細胞におけるCD312 (EMR2) をコードする核酸の発現レベルを低減する、請求項11～70のいずれか一項に記載のgRNA

【請求項72】

前記編集事象が、細胞におけるCD312 (EMR2) タンパク質の発現レベルを低減する、請求項11～71のいずれか一項に記載のgRNA

【請求項73】

前記編集事象が、細胞における完全長CD312 (EMR2) RNA又はCD312 (EMR2) タンパク質の発現を低減又は無効化する、請求項11～72のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項74】

前記細胞が、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2) RNA又はタンパク質の切断型を発現する、請求項25～73のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項75】

前記CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2) RNA又はタンパク質の前記切断型が、非編集細胞における完全長CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2) RNA又はタンパク質のレベル以上のレベルで発現される、請求項74に記載のgRNA。

【請求項76】

前記CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2) RNA又はタンパク質の前記切断型の機能又は活性が、損なわれるか、又は無効化される、請求項75に記載のgRNA。

【請求項77】

前記機能又は活性が、抗体又はキメラ抗原受容体 (CAR) に結合することを含む、請求項76に記載のgRNA。

【請求項78】

前記標的化ドメインが、16ヌクレオチド以上の長さである、先行請求項のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項79】

前記標的化ドメインが、約16～約30ヌクレオチドの長さである、先行請求項のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項80】

前記標的化ドメインが、30ヌクレオチドの長さである、先行請求項のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項81】

前記標的化ドメインが、21ヌクレオチドの長さである、先行請求項のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項82】

前記標的化ドメインが、20ヌクレオチドの長さである、先行請求項のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項83】

前記標的化ドメインが、配列番号1～2021のうちのいずれか1つの配列若しくはその逆相補鎖、又は配列番号1～2021に対して少なくとも90%若しくは95%の同一性を有する配列、又は配列番号1～2021に対して1、2、若しくは3個以下の変異を有する配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載のgRNA。

【請求項84】

前記標的化ドメインが、配列番号1～2021のうちのいずれか1つの少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含み、かつ/又は配列番号1～2021のうちのいずれか1つの前記標的ドメインの少なくとも10個のヌクレオチドを塩基対形成するか、若しくはそれ

10

20

30

40

50

と相補的である、先行請求項のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 85】

単一ガイドRNA (sgRNA) である、先行請求項のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 86】

1つ以上の化学的修飾を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 87】

塩基エディターと結合する、先行請求項のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 88】

前記塩基エディターが、シトシン塩基エディター (CBE) である、請求項 87 に記載の gRNA。 10

【請求項 89】

前記 CBE が、CBE1、CBE2、CBE3、又は CBE4 である、請求項 88 に記載の gRNA。

【請求項 90】

前記 CBE が、nCas9-2xUGI、BE4-rAPOBEC1、BE4-rAPOBEC1 K34A H122A、BE4-PpAPOBEC1、BE4-PpAPOBEC1 R33A、BE4-PpAPOBEC1 H122A、BE4-RrA3F、BE4-AmAPOBEC1、及び BE4-SsAPOBEC3B からなる群から選択される、請求項 88 又は 89 に記載の gRNA。 20

【請求項 91】

前記 CBE が、CBE-PpAPOBEC1 WT である、請求項 88 ~ 90 のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 92】

前記塩基エディターが、アデニン塩基エディター (ABE) である、請求項 87 に記載の gRNA。

【請求項 93】

前記 ABE が、ABE1、ABE2、ABE3、ABE4、ABE5、ABE6、ABE7、又は ABE8 である、請求項 92 に記載の gRNA。 30

【請求項 94】

前記 ABE が、ABE7.10-m、ABE7.10-d、ABE8.8-m、ABE8.8-d、ABE8.13-m、ABE8.13-d、ABE8.17-m、ABE8.17-d、ABE8.20-m、及び ABE8.20-d からなる群から選択される、請求項 92 又は 93 に記載の gRNA。

【請求項 95】

前記 ABE が、ABE8 である、請求項 92 ~ 94 のいずれか一項に記載の gRNA。

【請求項 96】

前記塩基エディターが、野生型塩基エディターである、請求項 87 に記載の gRNA。

【請求項 97】

請求項 1 ~ 96 のいずれか一項に記載の gRNA と、塩基エディターと、を含む、リボ核タンパク質 (RNP) 複合体。 40

【請求項 98】

前記塩基エディターが、シトシン塩基エディター (CBE) である、請求項 97 に記載の gRNA。

【請求項 99】

前記 CBE が、CBE1、CBE2、CBE3、又は CBE4 である、請求項 98 に記載の gRNA。

【請求項 100】

前記 CBE が、nCas9-2xUGI、BE4-rAPOBEC1、BE4-rAP 50

O B E C 1 K 3 4 A H 1 2 2 A、B E 4 - P p A P O B E C 1、B E 4 - P p A P O B E C 1 R 3 3 A、B E 4 - P p A P O B E C 1 H 1 2 2 A、B E 4 - R r A 3 F、B E 4 - A m A P O B E C 1、及び B E 4 - S s A P O B E C 3 B からなる群から選択される、請求項 98 又は 99 に記載の g R N A。

【請求項 101】

前記 C B E が、C B E - P p A P O B E C 1 W T である、請求項 98 に記載の g R N A。

【請求項 102】

前記塩基エディターが、アデニン塩基エディター (A B E) である、請求項 97 に記載の g R N A。

【請求項 103】

前記 A B E が、A B E 1、A B E 2、A B E 3、A B E 4、A B E 5、A B E 6、A B E 7、又は A B E 8 である、請求項 102 に記載の g R N A。

【請求項 104】

前記 A B E が、A B E 7 . 1 0 - m、A B E 7 . 1 0 - d、A B E 8 . 8 - m、A B E 8 . 8 - d、A B E 8 . 1 3 - m、A B E 8 . 1 3 - d、A B E 8 . 1 7 - m、A B E 8 . 1 7 - d、A B E 8 . 2 0 - m、及び A B E 8 . 2 0 - d からなる群から選択される、請求項 102 又は 103 に記載の g R N A。

【請求項 105】

前記 A B E が、A B E 8 である、請求項 102 に記載の g R N A。

【請求項 106】

前記塩基エディターが、野生型塩基エディターである、請求項 97 に記載の g R N A。

【請求項 107】

塩基エディターと、請求項 1 ~ 96 のいずれか一項に記載の g R N A と、を含む、予め形成された複合体を含む、組成物。

【請求項 108】

塩基エディターをコードする m R N A と、請求項 1 ~ 96 のいずれか一項に記載の g R N A と、を含む、混合物。

【請求項 109】

塩基編集のための方法であって、

二本鎖 D N A 分子中の標的ドメインを、塩基エディターと、請求項 1 ~ 96 のいずれか一項に記載のガイド R N A (g R N A) とを含む複合体と接触させることを含み、

前記塩基エディターが、バリエーション塩基エディターと比較して、より高いオンターゲット編集効率を有する C B E 又は A B E である、方法。

【請求項 110】

前記塩基エディターが、野生型塩基エディターである、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 111】

前記野生型塩基エディターが、B E 4 - P p A P O B E C を含む、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 112】

前記バリエーション塩基エディターが、B E 4 - P p A P O B E C 1 R 3 3 A を含む、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 113】

前記二本鎖 D N A 分子が、細胞内にある、請求項 109 ~ 112 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 114】

前記細胞を、前記 g R N A、及び前記塩基エディターをコードする m R N A と接触させることを含む、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

前記塩基エディターをコードする前記 m R N A が、前記コードされた塩基エディターの

10

20

30

40

50

発現を改善するように化学的に修飾される、請求項 1 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

前記化学的に修飾された mRNA が、5 - メトキシウリジン修飾を含む、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記化学的に修飾された mRNA が、N 1 - メチルシュードウリジン修飾を含む、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記細胞を、前記 g RNA 及び前記塩基エディターを含むリボ核タンパク質 (RNP) 複合体と接触させることを含む、請求項 1 1 4 ~ 1 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 1 9】

マルチプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(i i) 前記細胞に、

(a) CD 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする 1 つ以上のガイド RNA (g RNA)、CLL - 1 を標的とする 1 つ以上の g RNA、CD 1 2 3 を標的とする 1 つ以上の g RNA、CD 3 2 7 (S i g l e c - 6) を標的とする 1 つ以上の g RNA、及び / 又は CD 3 1 2 (E M R 2) を標的とする 1 つ以上の g RNA、並びに

(b) 前記 1 つ以上の g RNA と結合する塩基エディターを導入することと、を含み

20

、前記 1 つ以上の g RNA が、同じ又は異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

【請求項 1 2 0】

遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(i i) 前記細胞に、

(a) CD 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする 1 つ以上のガイド RNA (g RNA)、CLL - 1 を標的とする 1 つ以上の g RNA、CD 1 2 3 を標的とする 1 つ以上の g RNA、CD 3 2 7 (S i g l e c - 6) を標的とする 1 つ以上の g RNA、及び / 又は CD 3 1 2 (E M R 2) を標的とする 1 つ以上の g RNA、並びに

(b) 前記 1 つ以上の g RNA と結合する塩基エディターを導入することと、を含み

30

、前記 1 つ以上の g RNA が、同じ又は異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

【請求項 1 2 1】

マルチプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(i i) 前記細胞に、

(a) CD 3 3 を標的とする 1 つ以上のガイド RNA (g RNA)、

(b) CLL - 1 を標的とする 1 つ以上の g RNA 及び / 又は CD 1 2 3 を標的とする 1 つ以上の g RNA、並びに

40

(c) 前記 1 つ以上の g RNA と結合する塩基エディターを導入することと、を含み

、前記 1 つ以上の g RNA が、異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

【請求項 1 2 2】

遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(i i) 前記細胞に、

(a) CD 3 3 を標的とする 1 つ以上のガイド RNA (g RNA)、

50

(b) CLL-1を標的とする1つ以上のgRNA及び/又はCD123を標的とする1つ以上のgRNA、並びに

(c) 前記1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することと、を含み

、
前記1つ以上のgRNAが、異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

【請求項123】

マルチプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(ii) 前記細胞に、

(a) CD33 (Siglec-3)を標的とする1つ以上のガイドRNA (gRNA)、

(b) CLL-1を標的とする1つ以上のgRNA、CD123を標的とする1つ以上のgRNA、CD327 (Siglec-6)を標的とする1つ以上のgRNA、及び/又はCD312 (EMR2)を標的とする1つ以上のgRNA、並びに

(c) 前記1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することと、を含み

、
前記1つ以上のgRNAが、同じ又は異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

【請求項124】

遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(ii) 前記細胞に、

(a) CD33 (Siglec-3)を標的とする1つ以上のガイドRNA (gRNA)、

(b) CLL-1を標的とする1つ以上のgRNA、CD123を標的とする1つ以上のgRNA、CD327 (Siglec-6)を標的とする1つ以上のgRNA、及び/又はCD312 (EMR2)を標的とする1つ以上のgRNA、並びに

(c) 前記1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することと、を含み

、
前記1つ以上のgRNAが、同じ又は異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

【請求項125】

トリプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(ii) 前記細胞に、

(a) 少なくとも3つの異なるゲノム標的内に同時編集事象を提供するように構成された複数のgRNA、及び

(d) 前記複数のgRNAと結合し、それによって遺伝子操作された細胞を産生する、塩基エディターを導入することと、を含む、方法。

【請求項126】

トリプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(ii) 前記細胞に、

(a) CD33 (Siglec-3)を標的とする1つ以上のgRNA、

(b) CLL1を標的とする1つ以上のgRNA、

(c) CD123を標的とする1つ以上のgRNA、及び

(d) 前記1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することと、を含み

、
前記1つ以上のgRNAが、少なくとも3つの異なる標的ドメイン内に同時編集事象を

10

20

30

40

50

提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

【請求項 127】

遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(ii) 前記細胞に、

(a) 少なくとも3つの異なるゲノム標的内に同時編集事象を提供するように構成された複数の gRNA、及び

(d) 前記複数の gRNA と結合し、それによって遺伝子操作された細胞を産生する、塩基エディターを導入することと、を含む、方法。

【請求項 128】

遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(ii) 前記細胞に、

(a) CD33 (Siglec-3) を標的とする1つ以上の gRNA、

(b) CLL1 を標的とする1つ以上の gRNA、

(c) CD123 を標的とする1つ以上の gRNA、及び

(d) 前記1つ以上の gRNA と結合する塩基エディターを導入することと、を含み

、前記1つ以上の gRNA が、少なくとも3つの異なる標的ドメイン内に同時編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

【請求項 129】

クアドロプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(ii) 前記細胞に、

(a) 少なくとも4つの異なるゲノム標的内に同時編集事象を提供するように構成された複数の gRNA、及び

(d) 前記複数の gRNA と結合し、それによって遺伝子操作された細胞を産生する、塩基エディターを導入することと、を含む、方法。

【請求項 130】

クアドロプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(ii) 前記細胞に、

(a) CD33 (Siglec-3) を標的とする1つ以上の gRNA、

(b) CLL1 を標的とする1つ以上の gRNA、

(c) CD123 を標的とする1つ以上の gRNA、

(d) CD312 (EMR2) を標的とする1つ以上の gRNA、

(e) 前記1つ以上の gRNA と結合する塩基エディターを導入することと、を含み

、前記1つ以上の gRNA が、少なくとも4つの異なる標的ドメイン内に同時編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

【請求項 131】

遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

(ii) 前記細胞に、

(a) 少なくとも4つの異なるゲノム標的内に同時編集事象を提供するように構成された複数の gRNA、及び

(d) 前記複数の gRNA と結合し、それによって遺伝子操作された細胞を産生する、塩基エディターを導入することと、を含む、方法。

【請求項 132】

遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

10

20

30

40

50

(i) 細胞を提供することと、

(i i) 前記細胞に、

(a) C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする 1 つ以上の g R N A 、

(b) C L L 1 を標的とする 1 つ以上の g R N A 、

(c) C D 1 2 3 を標的とする 1 つ以上の g R N A 、

(d) C D 3 1 2 (E M R 2) を標的とする 1 つ以上の g R N A 、

(e) 前記 1 つ以上の g R N A と結合する塩基エディターを導入することと、を含み

、
前記 1 つ以上の g R N A が、少なくとも 4 つの異なる標的ドメイン内に同時編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

10

【請求項 1 3 3】

前記 1 つ以上のガイド R N A (g R N A) が、請求項 1 ~ 9 6 のいずれか一項に記載の g R N A を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

同じ遺伝子内及び / 又は異なる遺伝子内の 1 つ以上の標的ドメインの同時編集をもたらす、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

同じ遺伝子内及び / 又は異なる遺伝子内の 2 つ以上の標的ドメインの同時編集をもたらす、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

同じ遺伝子内及び / 又は異なる遺伝子内の 3 つ以上の標的ドメインの同時編集をもたらす、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 3 7】

同じ遺伝子内及び / 又は異なる遺伝子内の 4 つ以上の標的ドメインの同時編集をもたらす、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子、C L L - 1 遺伝子、C D 1 2 3 遺伝子、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子、及び / 又は C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子内の 1 つ以上の標的ドメインの同時編集をもたらす、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、シトシン塩基エディター (C B E) 及び / 又はアデニン塩基エディター (A B E) とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法

30

【請求項 1 4 0】

C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、C B E とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、A B E とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

C L L 1 を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、シトシン塩基エディター (C B E) 及び / 又はアデニン塩基エディター (A B E) とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 4 3】

C L L 1 を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、C B E とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

C L L 1 を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、A B E とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

50

C D 1 2 3 を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、C B E 及び / 又は A B E とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

C D 1 2 3 を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、C B E とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

C D 1 2 3 を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、A B E とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

E M R 2 を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、C B E 及び / 又は A B E とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 1 4 9】

E M R 2 を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、C B E とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

E M R 2 を標的とする前記 1 つ以上の g R N A が、A B E とともに使用するために設計されている、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記細胞を、前記 1 つ以上の g R N A 及び前記塩基エディターをコードする m R N A と接触させることを含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 1 5 2】

前記細胞を、前記 1 つ以上の g R N A 及び前記塩基エディターを含むリボ核タンパク質 (R N P) 複合体と接触させることを含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

前記細胞を、前記 g R N A 及び前記塩基エディターをコードする m R N A と接触させることを含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

前記塩基エディターをコードする前記 m R N A が、前記コードされた塩基エディターの発現を改善するように化学的に修飾される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

前記化学的に修飾された m R N A が、5 - メトキシウリジン修飾を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 1 5 6】

前記化学的に修飾された m R N A が、N 1 - メチルシュードウリジン修飾を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

前記 R N P が、エレクトロポレーションを介して前記細胞中に導入される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 8】

前記塩基エディターが、野生型塩基エディターである、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 1 5 9】

前記塩基エディターが、シトシン塩基エディター (C B E) 及び / 又はアデニン塩基エディター (A B E) である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

C B E のみが、前記細胞中に導入される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

A B E のみが、前記細胞中に導入される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

C B E 及び A B E の両方が、前記細胞中に導入される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。 50

載の方法。

【請求項 163】

野生型塩基エディターが、前記細胞中に導入され、任意選択的に、野生型塩基エディターが、バリエーション塩基エディターと比較して、より高いオンターゲット編集効率でシトシン-グアニン(C-G)塩基対又はチミン-アデニン(T-A)塩基対を標的とする、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 164】

バリエーション塩基エディターと比較してより低い転座リスクをもたらす、任意選択的に、前記方法が、内因性CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)遺伝子における修飾について、0%の転座、又は検出不可能なレベルの転座、及び少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%以上のオンターゲット編集効率をもたらす、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 167】

前記細胞が、造血幹細胞又は前駆細胞である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 168】

先行請求項のいずれか一項に記載の方法の方法によって産生される、遺伝子操作された造血幹細胞又は前駆細胞。

【請求項 169】

複数の請求項 168 に記載の遺伝子操作された造血幹細胞又は前駆細胞を含む、細胞集団。

【請求項 170】

複数の前記遺伝子操作された造血幹細胞又は前駆細胞を含む細胞集団であって、前記細胞の少なくとも一部分が、

(i) 編集されたCD33(Siglec-3)遺伝子、

(ii) 編集されたCLL-1遺伝子、

(iii) 編集されたCD123遺伝子、

(iv) 編集されたCD327(Siglec-6)遺伝子、

(v) 編集されたCD312(EMR2)遺伝子、

(vi) 編集されたCD33(Siglec-3)遺伝子及び編集されたCLL-1遺伝子、

(vii) 編集されたCD33(Siglec-3)遺伝子及び編集されたCD123遺伝子、

(viii) 編集されたCD33(Siglec-3)遺伝子及び編集されたCD327(Siglec-6)遺伝子、

(ix) 編集されたCD33(Siglec-3)遺伝子及び編集されたCD312(EMR2)遺伝子、

(x) 編集されたCD33(Siglec-3)遺伝子、編集されたCLL-1遺伝子、及び編集されたCD123遺伝子、

(xi) 編集されたCD33(Siglec-3)遺伝子、編集されたCLL-1遺伝子、編集されたCD123遺伝子、及び編集されたCD327(Siglec-6)遺伝子、

(xii) 編集されたCD33(Siglec-3)遺伝子、編集されたCLL-1遺伝子、編集されたCD123遺伝子、編集されたCD327(Siglec-6)遺伝子、及び編集されたCD312(EMR2)遺伝子、又は

(xiii) 編集されたCD33(Siglec-3)遺伝子、編集されたCLL-1

10

20

30

40

50

遺伝子、編集されたCD123遺伝子、編集されたCD327 (Siglec-6) 遺伝子、及び/若しくは編集されたCD312 (EMR2) 遺伝子を含む、細胞集団。

【請求項180】

CD33 (Siglec-3) 遺伝子が、終止コドン又は変異スプライス部位を含むが、典型的にはCRISPRヌクレアーゼ媒介性非相同末端結合 (NHEJ) によって導入されるフレームシフト変異を含まない、先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項181】

CLL-1 遺伝子が、終止コドン又は変異スプライス部位を含むが、典型的にはCRISPRヌクレアーゼ媒介性非相同末端結合 (NHEJ) によって導入されるフレームシフト変異を含まない、先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団。

10

【請求項182】

CD123 遺伝子が、終止コドン又は変異スプライス部位を含むが、典型的にはCRISPRヌクレアーゼ媒介性非相同末端結合 (NHEJ) によって導入されるフレームシフト変異を含まない、先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項183】

CD327 (Siglec-6) 遺伝子が、終止コドン又は変異スプライス部位を含むが、典型的にはCRISPRヌクレアーゼ媒介性非相同末端結合 (NHEJ) によって導入されるフレームシフト変異を含まない、先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項184】

CD312 (EMR2) 遺伝子が、終止コドン又は変異スプライス部位を含むが、典型的にはCRISPRヌクレアーゼ媒介性非相同末端結合 (NHEJ) によって導入されるフレームシフト変異を含まない、先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団。

20

【請求項185】

野生型対応物細胞集団によって発現される前記CD33 (Siglec-3) の30%未満を発現する、先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項186】

野生型対応物細胞集団によって発現される前記CLL-1の30%未満を発現する、先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項187】

野生型対応物細胞集団によって発現される前記CD123の30%未満を発現する、先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団。

30

【請求項188】

野生型対応物細胞集団によって発現される前記CD327 (Siglec-6) の30%未満を発現する、先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項189】

野生型対応物細胞集団によって発現される前記CD312 (EMR2) の30%未満を発現する、先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団。

【請求項190】

前記細胞の少なくとも一部分が、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、又はCD312 (EMR2) 以外の系統特異的細胞表面抗原をコードする遺伝子で遺伝子編集を有する、先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団。

40

【請求項191】

CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、又はCD312 (EMR2) 以外の系統特異的細胞表面抗原をコードする前記遺伝子が、CD19、CD30、CD5、CD6、CD7、CD34、CD38、又はBCMAである、請求項190に記載の細胞集団。

【請求項192】

先行請求項のいずれか一項に記載の細胞集団を投与することを必要とする対象にそれを

50

行う方法であって、
任意選択的に、前記対象が、造血器悪性腫瘍を有する、方法。

【請求項 193】

前記造血器悪性腫瘍が、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、白血病、又は多発性骨髄腫である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 194】

前記白血病が、急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病又は慢性リンパ芽球性白血病、及び慢性リンパ球性白血病である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 195】

前記造血器悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病（AML）を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 196】

前記対象に、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）を標的とする有効量の薬剤を投与することを更に含み、前記薬剤が、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）と結合する抗原結合断片を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 197】

CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）を標的とする前記薬剤が、抗体又はキメラ抗原受容体（CAR）である、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 198】

請求項 1～96 のいずれか一項に記載の gRNA をコードする核酸。

【請求項 199】

a) 請求項 1～96 のいずれか一項に記載の gRNA、又は前記 gRNA をコードする核酸、及び b) 第 2 の gRNA、又は前記第 2 の gRNA をコードする核酸を含む、キット又は組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2022年5月18日に出願された米国仮特許出願第63/343,408号、2021年11月11日に出願された米国仮特許出願第63/278,375号、及び2021年9月14日に出願された米国仮特許出願第63/244,219号に対する優先権を主張するものである。これらの出願の各々の内容全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

がん患者が、例えば、免疫療法剤の形態で、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2））を標的とする抗がん療法を投与される場合、療法は、系統特異的細胞表面抗原を発現するがん細胞だけでなく、「オンターゲット、オフ腫瘍」効果で系統特異的細胞表面抗原を発現する非がん細胞も枯渇させることができる。ある特定の非がん造血細胞は、典型的には、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）を発現するため、そのような抗がん治療薬によって標的化することができ、非がんCD33（Siglec-3）+、CLL-1+、CD123+、CD327（Siglec-6）+、及び/又はCD312（EMR2）+細胞の喪失は、患者の造血系を枯渇させ、損ない得る。この枯渇に対処するために、対象は、CD33（Siglec-3）、CLL-1

10

20

30

40

50

、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 遺伝子における修飾、例えば、それぞれの遺伝子の発現が低減若しくは排除されたレスキュー細胞をもたらす遺伝子編集、又はタンパク質への治療剤の結合を減少させるそれぞれの遺伝子によってコードされるタンパク質のエピトープの修飾を含む、レスキュー細胞 (例えば、造血幹細胞 (HSC) 及び/又は造血前駆細胞 (HPC)) を投与され得る。したがって、これらのCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 修飾細胞は、抗がん療法に抵抗性であり得、したがって、抗がん療法中又はその後に造血系を再配置させることができる。HSC及びHPCは、例えば、CRISPR/Cas技術を含む様々な遺伝子編集技術を使用して修飾することができる。しかしながら、従来のCRISPR/Cas技術は、ある特定の制限、例えば、オフターゲット編集効果 (OTE)、染色体再配置、及び複数の遺伝子座での同時二本鎖切断 (DSB) 誘導による遺伝毒性と関連している。本開示は、治療用途のための細胞のマルチプレックス編集を含む、遺伝子編集を達成するための安全かつ効果的な方法の必要性に対処する。

10

【発明の概要】

【0003】

内因性CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 遺伝子のマルチプレックス修飾を伴う治療モダリティ、並びにそれらを作製及び使用するための戦略、組成物、及び方法が本明細書に提供される。本開示の態様は、塩基エディター、例えば、特定の核酸塩基、例えば、細胞ミスマッチ修復機構を介して、DNA上の標的位置にCからTへのヌクレオチドの変化、又はAからGへのヌクレオチドの変化をもたらす、C又はAヌクレオチドのシトシン又はアデノシン核酸塩基を標的とし、脱アミノ化するデアミナーゼに融合されたヌクレアーゼ損傷酵素又は部分的ヌクレアーゼ損傷酵素 (例えば、RNAガイドCRISPR/Casタンパク質) を指向する1つ以上のガイドRNA (gRNA) を使用して細胞における、DNAのマルチプレックス修飾などのDNAの修飾を対象とし、塩基エディターは、編集事象を提供する。

20

【0004】

本開示の特定の態様は、マルチプレックス塩基編集の方法、例えば、本明細書に提供されるある特定のgRNA及び/又は遺伝子編集酵素 (例えば、RNAガイドCRISPR/Casタンパク質、塩基エディターなど) を使用する方法として、遺伝子操作された細胞、例えば、細胞表面抗原をコードする遺伝子において1つ、2つ、又は複数の修飾を有する細胞を作製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるマルチプレックス塩基編集の方法を使用して、細胞表面抗原をコードする複数の遺伝子において修飾を有する遺伝子操作された細胞を作製することができる。したがって、本明細書に提供される方法の使用は、免疫療法などの治療用途のための細胞からの1つ、2つ、又は複数の細胞表面抗原の効率的な除去を可能にすることができる。

30

【0005】

理論によって拘束されることを望むものではないが、同種移植における造血幹細胞及び前駆細胞 (HSPC) のゲノムをマルチプレックス塩基編集することによって、細胞表面抗原を除去することは、急性骨髄性白血病 (AML) などの疾患における移植後の標的化療法を可能にするための新規かつ有利なアプローチである。いくつかの実施形態では、本開示は、標的抗原ヌル同種ドナートを保護しながら、白血病細胞を特異的に標的とする適合する治療モダリティを可能にする方法を提供する。しかしながら、AMLの治療における既知の障害の1つが腫瘍抗原の不均一性であることを考慮すると、例えば、1つの表面標的を修飾すること、例えば、除去することは、AMLにおける有効性を達成し、潜在的な抗原逃避を回避するのに十分ではない場合がある。そのような例では、複数の抗原、例えば、複数の細胞表面抗原を標的とする併用療法は、AML治療においてより大きな有効性を提供し、潜在的な抗原逃避を回避するのに役立つ。したがって、本開示の態様は、シトシン塩基エディター (CBE) を使用して、健康なドナーからのCD34+ HS

40

50

PCにおいて臨床的に関連のあるAML表面抗原の遺伝子ノックアウト(KO)を同時に誘導するためのマルチプレックス塩基編集アプローチを提供する。そのような方法は、AML患者のオンターゲット、オフ腫瘍毒性が低減された組み合わせ標的治療薬の投与を可能にすることができる。更に、本明細書に提供される方法による塩基編集ガイドの同時送達は、HSPCの健康、増殖、及び幹細胞性を保持することができ、これは、治療用途のための組み合わせ標的化細胞のプロセス及び製造を容易にし得る。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される方法は、高い塩基編集効率、堅牢な表面タンパク質ノックアウト(KO)、及びマルチプレックス編集細胞のバランスの取れた転座の検出を達成することができる。いくつかの実施形態では、本開示は、1つ、2つ、又は複数の細胞表面標的(例えば、細胞表面抗原)のCD34+ HSPCにおけるマルチプレックス塩基編集の

10

ための方法を提供し、それによって、AML患者を治療するために次世代の細胞移植を操作するための有益、安全、かつ有効な代替物を提供する。したがって、本開示の態様は、急性骨髄性白血病(AML)免疫療法における1つ、2つ、又は複数の細胞表面抗原の効率的な除去を可能にする、ヒト造血幹細胞及び前駆細胞(HSPC)におけるマルチプレックス塩基編集のための方法を提供する。

【0006】

いくつかの実施形態では、本開示は、1つ、2つ、又は複数の細胞表面抗原を修飾、例えば、除去する、マルチプレックス塩基編集の方法を提供する。例示的な細胞表面抗原としては、これらに限定されないが、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8a、CD8b、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD13、CD14、CD15、CD16a、CD16b、CD17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD45、CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RO、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60a、CD60b、CD60c、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64、CD65s、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD67、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD75s、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85a、CD85b、CD85c、CD85d、CD85e、CD85f、CD85g、CD85h、CD85i、CD85j、CD85k、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107a、CD107b、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120a、CD120b、CD121a、CD121b、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD128a、CD128b、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CD146、CD147、CD148、CD150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156a、CD156b、CD156c、CD157、CD158a、CD158b1、CD158b2、CD158c、CD158d、CD158e1、CD158e2、CD158f、CD158g、CD158h、CD158i、CD158j、CD158k、CD159a、CD159c、CD160、CD161、CD162、C

20

30

40

50

D 1 6 3、C D 1 6 4、C D 1 6 5、C D 1 6 6、C D 1 6 7 a、C D 1 6 7 b、C D 1 6 8、C D 1 6 9、C D 1 7 0、C D 1 7 1、C D 1 7 2 a、C D 1 7 2 b、C D 1 7 2 g、C D 1 7 3、C D 1 7 4、C D 1 7 5、C D 1 7 5 s、C D 1 7 6、C D 1 7 7、C D 1 7 8、C D 1 7 9 a、C D 1 7 9 b、C D 1 8 0、C D 1 8 1、C D 1 8 2、C D 1 8 3、C D 1 8 4、C D 1 8 5、C D 1 8 6、C D 1 9 1、C D 1 9 2、C D 1 9 3、C D 1 9 4、C D 1 9 5、C D 1 9 6、C D 1 9 7、C D 1 9 8、C D 1 9 9、C D 2 0 0、C D 2 0 1、C D 2 0 2 b、C D 2 0 3 c、C D 2 0 4、C D 2 0 5、C D 2 0 6、C D 2 0 7、C D 2 0 8、C D 2 0 9、C D 2 1 0 a、C D 2 1 0 b、C D 2 1 2、C D 2 1 3 a 1、C D 2 1 3 a 2、C D 2 1 5、C D 2 1 7、C D 2 1 8 a、C D 2 1 8 b、C D 2 2 0、C D 2 2 1、C D 2 2 2、C D 2 2 3、C D 2 2 4、C D 2 2 5、C D 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 8、C D 2 3 9、C D 2 4 0 C E、C D 2 4 0 D、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 1、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 2 9 9、C D 3 0 0 a、C D 3 0 0 c、C D 3 0 0 d、C D 3 0 0 e、C D 3 0 0 f、C D 3 0 0 g、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 6 0、C D 3 6 1、C D 3 6 2、C D 3 6 3、C D 3 6 4、C D 3 6 5、C D 3 6 6、C D 3 6 7、C D 3 6 8、C D 3 6 9、C D 3 7 0、及びC D 3 7 1、又はそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【 0 0 0 7 】

いくつかの実施形態では、本開示は、例えば、C D 3 3 (S i g l e c - 3)、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)、C D 3 1 2 (E M R 2)、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1つ、2つ、3つ、4つ、又はそれ以上の細胞表面抗原を修飾するためのマルチプレックス塩基編集の方法を提供する。

【 0 0 0 8 】

いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、C D 3 3 (S i g l e c - 3)である。

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、C L L - 1である。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、C D 1 2 3である。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)である。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、C D 3 1 2 (E M R 2)である。

【 0 0 1 3 】

本開示の特定の態様は、マルチプレックス塩基編集の方法、例えば、遺伝子操作された細胞、例えば、内因性C D 3 3 (S i g l e c - 3)、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び/又はC D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子において複数の修

飾を有する細胞を作製するために本明細書に提供されるある特定の g R N A 及び / 又は遺伝子編集酵素を使用する方法を提供する。

【 0 0 1 4 】

理論によって拘束されることを望むものではないが、C R I S P R / C a s 技術は、オフターゲット編集効果 (O T E)、染色体再配置、及び複数の遺伝子座での同時二本鎖切断 (D S B) 誘導による遺伝毒性を含む、様々な制限と関連し得る。O T E には、標的配列で、又はその近傍での意図しない点変異、欠失、挿入、反転、及び転座が含まれ得る。染色体転座は、2つの異種染色体上の二本鎖切断 (D S B) からの D N A 末端が不適切に結合されるときに生じ得る。

【 0 0 1 5 】

本明細書に提供されるマルチプレックス塩基編集の方法は、少なくとも、塩基編集が従来の C R I S P R / C a s 技術と比較して D S B 形成の頻度を実質的に低減し、その結果、本明細書に記載の方法が転座の著しいリスクなしに使用され得るため、従来の C R I S P R / C a s 技術よりも利点を有する。

【 0 0 1 6 】

本明細書に提供されるマルチプレックス塩基編集の方法を使用して、従来の C R I S P R / C a s 技術の使用と比較して、より低い全体的な転座率を有する遺伝子操作された細胞を産生することができる。そのような細胞は、例えば、R h a m p S e q アッセイなどの転座分析アッセイによって評価されるように、0%の転座を有し得る。ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるマルチプレックス塩基編集方法によって産生される細胞は、例えば、内因性 C D 3 3 (S i g l e c - 3)、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び / 又は C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子における修飾について、0%の転座、又は検出不可能なレベルの転座、及び少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、又は少なくとも約 9 9 % 以上のオンターゲット編集効率を有し得る。

【 0 0 1 7 】

ある特定の実施形態では、オンターゲット編集効率は、例えば、内因性 C D 3 3 (S i g l e c - 3)、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び / 又は C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子の修飾について、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、又は少なくとも約 9 9 % 以上である。ある特定の実施形態では、オンターゲット編集効率は、内因性 C D 3 3 (S i g l e c - 3)、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び / 又は C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子のノックアウトのためのものである。

【 0 0 1 8 】

ある特定の実施形態では、マルチプレックス塩基編集は、転座のいかなるリスクもなしに、塩基エディター及び C R I S P R ヌクレアーゼ、例えば、C a s 9 又は C a s 1 2 a ヌクレアーゼを含む C R I S P R ヌクレアーゼを利用することによって、複合化 (c o m b o p l e x i n g) すること含み得る。ある特定の実施形態では、マルチプレックス塩基編集は、シトシン塩基エディター (C B E) 及び C p f 1 ヌクレアーゼの同時送達を含み得る。ある特定の実施形態では、マルチプレックス塩基編集は、シトシン塩基エディター (C B E) 及び / 又はアデニン塩基エディター (A B E) の同時送達を含み得る。ある特定の実施形態では、マルチプレックス塩基編集は、細胞生存率及び / 又は細胞増殖に著しい影響を与えない。

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、内因性 C D 3 3 (S i g l e c - 3)、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び / 又は C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子のマルチプレックス修飾が同時に生じる。

10

20

30

40

50

【0020】

特に、マルチプレックス塩基編集のための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)CD33(Siglec-3)を標的とする1つ以上のガイドRNA(gRNA)、CLL-1を標的とする1つ以上のgRNA、CD123を標的とする1つ以上のgRNA、CD327(Siglec-6)を標的とする1つ以上のgRNA、及び/又はCD312(EMR2)を標的とする1つ以上のgRNA、並びに(b)1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することとを含み、1つ以上のgRNAは、同じ又は異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている。

【0021】

特に、遺伝子操作された細胞を産生するための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)CD33(Siglec-3)を標的とする1つ以上のガイドRNA(gRNA)、CLL-1を標的とする1つ以上のgRNA、CD123を標的とする1つ以上のgRNA、CD327(Siglec-6)を標的とする1つ以上のgRNA、及び/又はCD312(EMR2)を標的とする1つ以上のgRNA、並びに(b)1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することとを含み、1つ以上のgRNAは、同じ又は異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている。

【0022】

特に、マルチプレックス塩基編集のための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)CD33(Siglec-3)を標的とする1つ以上のガイドRNA(gRNA)、CLL-1を標的とする1つ以上のgRNA、CD123を標的とする1つ以上のgRNA、CD327(Siglec-6)を標的とする1つ以上のgRNA、及び/又はCD312(EMR2)を標的とする1つ以上のgRNA、並びに(b)1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することとを含み、1つ以上のgRNAは、異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている。

【0023】

特に、マルチプレックス塩基編集のための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)CD33を標的とする1つ以上のガイドRNA(gRNA)、(b)CLL-1を標的とする1つ以上のgRNA及び/又はCD123を標的とする1つ以上のgRNA、並びに(c)1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することとを含み、1つ以上のgRNAは、異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている。

【0024】

特に、遺伝子操作された細胞を産生するための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)CD33を標的とする1つ以上のガイドRNA(gRNA)、(b)CLL-1を標的とする1つ以上のgRNA及び/又はCD123を標的とする1つ以上のgRNA、並びに(c)1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することとを含み、1つ以上のgRNAは、異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている。

【0025】

特に、マルチプレックス塩基編集のための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)CD33(Siglec-3)を標的とする1つ以上のガイドRNA(gRNA)、(b)CLL-1を標的とする1つ以上のgRNA、CD123を標的とする1つ以上のgRNA、CD327(Siglec-6)を標的とする1つ以上のgRNA、及び/又はCD312(EMR2)を標的とする1つ以上のgRNA、並びに(c)1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導

10

20

30

40

50

入することを含み、1つ以上のgRNAは、異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている。

【0026】

特に、遺伝子操作された細胞を産生するための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)CD33(Siglec-3)を標的とする1つ以上のガイドRNA(gRNA)、(b)CLL-1を標的とする1つ以上のgRNA、CD123を標的とする1つ以上のgRNA、CD327(Siglec-6)を標的とする1つ以上のgRNA、及び/又はCD312(EMR2)を標的とする1つ以上のgRNA、並びに(c)1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することを含み、1つ以上のgRNAは、同じ又は異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている。

10

【0027】

特に、トリプレックス塩基編集のための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)少なくとも3つの異なるゲノム標的内に同時編集事象を提供するように構成されている複数のgRNA、及び(d)複数のgRNAと結合する塩基エディターを導入し、それによって遺伝子操作された細胞を産生することを含む。

【0028】

特に、トリプレックス塩基編集のための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)CD33(Siglec-3)を標的とする1つ以上のgRNA、(b)CLL1を標的とする1つ以上のgRNA、(c)CD123を標的とする1つ以上のgRNA、及び(d)1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することを含み、1つ以上のgRNAは、少なくとも3つの異なる標的ドメイン内に同時編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている。

20

【0029】

特に、遺伝子操作された細胞を産生するための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)少なくとも3つの異なるゲノム標的内に同時編集事象を提供するように構成されている複数のgRNA、及び(d)複数のgRNAと結合する塩基エディターを導入し、それによって遺伝子操作された細胞を産生することを含む。

30

【0030】

特に、遺伝子操作された細胞を産生するための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)CD33(Siglec-3)を標的とする1つ以上のgRNA、(b)CLL1を標的とする1つ以上のgRNA、(c)CD123を標的とする1つ以上のgRNA、及び(d)1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することを含み、1つ以上のgRNAは、少なくとも3つの異なる標的ドメイン内に同時編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている。

【0031】

特に、クアドロプレックス塩基編集のための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)少なくとも4つの異なるゲノム標的内に同時編集事象を提供するように構成されている複数のgRNA、及び(d)複数のgRNAと結合する塩基エディターを導入し、それによって遺伝子操作された細胞を産生することを含む。

40

【0032】

特に、クアドロプレックス塩基編集のための方法が本明細書に提供されており、方法は、(i)細胞を提供することと、(ii)細胞に、(a)CD33(Siglec-3)を標的とする1つ以上のgRNA、(b)CLL1を標的とする1つ以上のgRNA、(c)CD123を標的とする1つ以上のgRNA、(d)CD312(EMR2)を標的

50

e c - 3) 遺伝子及び編集された C D 1 2 3 遺伝子、 (v i i i) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子及び編集された C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子、 (i x) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子及び編集された C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子、 (x) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子、編集された C L L - 1 遺伝子、及び編集された C D 1 2 3 遺伝子、 (x i) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子、編集された C L L - 1 遺伝子、編集された C D 1 2 3 遺伝子、及び編集された C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子、 (x i i) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子、編集された C L L - 1 遺伝子、編集された C D 1 2 3 遺伝子、編集された C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子、及び編集された C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子、又は (x i i i) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子、編集された C L L - 1 遺伝子、編集された C D 1 2 3 遺伝子、編集された C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子、及び/若しくは編集された C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子を含む。

10

【 0 0 3 9 】

そのような新規の細胞は、例えば、 R h a m p S e q アッセイなどの転座分析アッセイによって評価されるように、 0 % の転座を有し得る。ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるマルチプレックス塩基編集方法によって産生される新規の細胞 (例えば、 H S C 又は H P C) は、例えば、内因性 C D 3 3 (S i g l e c - 3)、 C L L - 1、 C D 1 2 3、 C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び/又は C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子における修飾 (例えば、複数の修飾) について、 0 % の転座、又は検出不可能なレベルの転座、及び少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、又は少なくとも約 9 9 % 以上のオンターゲット編集効率を有し得る。ある特定の実施形態では、オンターゲット編集効率は、例えば、内因性 C D 3 3 (S i g l e c - 3)、 C L L - 1、 C D 1 2 3、 C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び/又は C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子の修飾 (例えば、複数の修飾) について、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、又は少なくとも約 9 9 % 以上である。

20

【 0 0 4 0 】

本開示のいくつかの態様はまた、そのような修飾を行うために使用され得る組成物、例えば、遺伝子編集酵素、 g R N A、及びそれらの組み合わせを提供する。本開示のいくつかの態様は、本明細書に提供される組成物を使用する方法、例えば、遺伝子操作された細胞、例えば、内因性 C D 3 3 (S i g l e c - 3)、 C L L - 1、 C D 1 2 3、 C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び/又は C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子において修飾を有する細胞を作製するために提供されるある特定の g R N A を使用する方法を提供する。

30

【 0 0 4 1 】

本開示のいくつかの態様は、内因性細胞表面抗原遺伝子において修飾を有する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、遺伝子操作された細胞は、これらに限定されないが、 C D 1 a、 C D 1 b、 C D 1 c、 C D 1 d、 C D 1 e、 C D 2、 C D 3 d、 C D 3 e、 C D 3 g、 C D 4、 C D 5、 C D 6、 C D 7、 C D 8 a、 C D 8 b、 C D 9、 C D 1 0、 C D 1 1 a、 C D 1 1 b、 C D 1 1 c、 C D 1 1 d、 C D 1 3、 C D 1 4、 C D 1 5、 C D 1 6 a、 C D 1 6 b、 C D 1 7、 C D 1 8、 C D 1 9、 C D 2 0、 C D 2 1、 C D 2 2、 C D 2 3、 C D 2 4、 C D 2 5、 C D 2 6、 C D 2 7、 C D 2 8、 C D 2 9、 C D 3 0、 C D 3 1、 C D 3 2、 C D 3 3、 C D 3 4、 C D 3 5、 C D 3 6、 C D 3 7、 C D 3 8、 C D 3 9、 C D 4 0、 C D 4 1、 C D 4 2 a、 C D 4 2 b、 C D 4 2 c、 C D 4 2 d、 C D 4 3、 C D 4 4、 C D 4 5、 C D 4 5 R A、 C D 4 5 R B、 C D 4 5 R C、 C D 4 5 R O、 C D 4 6、 C D 4 7、 C D 4 8、 C D 4 9 a、 C D 4 9 b、 C D 4 9 c、 C D 4 9 d、 C D 4 9 e、 C D 4 9 f、 C D 5 0、 C D 5 1、 C D 5 2、 C D 5 3、 C D 5 4、 C D 5 5、 C D 5 6、 C D 5 7、 C D 5 8、 C D 5 9、 C D 6 0 a、 C D 6 0 b、 C D 6 0 c、 C D 6 1、 C D 6 2 E、 C D 6 2 L、 C D 6 2 P、 C D 6 3、 C D 6

40

50

4、CD 6 5 s、CD 6 6 a、CD 6 6 b、CD 6 6 c、CD 6 6 d、CD 6 6 e、CD
6 6 f、CD 6 7、CD 6 8、CD 6 9、CD 7 0、CD 7 1、CD 7 2、CD 7 3、C
D 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 b、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 1 0 0、C
D 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、C
D 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 10
、CD 1 2 0 a、CD 1 2 0 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 8 a、CD 1 2 8 b、C
D 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、C
D 1 4 1、CD 1 4 2、CD 1 4 3、CD 1 4 4、CD 1 4 6、CD 1 4 7、CD 1 4 8
、CD 1 5 0、CD 1 5 1、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 a、CD 1 5 8 b 1、C
D 1 5 8 b 2、CD 1 5 8 c、CD 1 5 8 d、CD 1 5 8 e 1、CD 1 5 8 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、C
D 1 5 9 a、CD 1 5 9 c、CD 1 6 0、CD 1 6 1、CD 1 6 2、CD 1 6 3、CD 1 20
6 4、CD 1 6 5、CD 1 6 6、CD 1 6 7 a、CD 1 6 7 b、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 1 9 8、CD 1 9 9、CD 2 0 0、CD 2 0 1、C
D 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 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 2 2 6、CD 2 2 7、C 30
D 2 2 8、CD 2 2 9、CD 2 3 0、CD 2 3 1、CD 2 3 2、CD 2 3 3、CD 2 3 4
、CD 2 3 5 a、CD 2 3 5 b、CD 2 3 6、CD 2 3 8、CD 2 3 9、CD 2 4 0 C E
、CD 2 4 0 D、CD 2 4 1、CD 2 4 2、CD 2 4 3、CD 2 4 4、CD 2 4 5、CD
2 4 6、CD 2 4 7、CD 2 4 8、CD 2 4 9、CD 2 5 2、CD 2 5 3、CD 2 5 4、
CD 2 5 6、CD 2 5 7、CD 2 5 8、CD 2 6 1、CD 2 6 2、CD 2 6 3、CD 2 6
4、CD 2 6 5、CD 2 6 6、CD 2 6 7、CD 2 6 8、CD 2 6 9、CD 2 7 0、CD
2 7 1、CD 2 7 2、CD 2 7 3、CD 2 7 4、CD 2 7 5、CD 2 7 6、CD 2 7 7、
CD 2 7 8、CD 2 7 9、CD 2 8 0、CD 2 8 1、CD 2 8 2、CD 2 8 3、CD 2 8
4、CD 2 8 6、CD 2 8 8、CD 2 8 9、CD 2 9 0、CD 2 9 2、CD w 2 9 3、C
D 2 9 4、CD 2 9 5、CD 2 9 6、CD 2 9 7、CD 2 9 8、CD 2 9 9、CD 3 0 0 40
a、CD 3 0 0 c、CD 3 0 0 d、CD 3 0 0 e、CD 3 0 0 f、CD 3 0 0 g、CD 3
0 1、CD 3 0 2、CD 3 0 3、CD 3 0 4、CD 3 0 5、CD 3 0 6、CD 3 0 7 a、
CD 3 0 7 b、CD 3 0 7 c、CD 3 0 7 d、CD 3 0 7 e、CD 3 0 9、CD 3 1 2、
CD 3 1 4、CD 3 1 5、CD 3 1 6、CD 3 1 7、CD 3 1 8、CD 3 1 9、CD 3 2
0、CD 3 2 1、CD 3 2 2、CD 3 2 4、CD 3 2 5、CD 3 2 6、CD 3 2 7、CD
3 2 8、CD 3 2 9、CD 3 3 1、CD 3 3 2、CD 3 3 3、CD 3 3 4、CD 3 3 5、
CD 3 3 6、CD 3 3 7、CD 3 3 8、CD 3 3 9、CD 3 4 0、CD 3 4 4、CD 3 4
9、CD 3 5 0、CD 3 5 1、CD 3 5 2、CD 3 5 3、CD 3 5 4、CD 3 5 5、CD
3 5 7、CD 3 5 8、CD 3 6 0、CD 3 6 1、CD 3 6 2、CD 3 6 3、CD 3 6 4、
CD 3 6 5、CD 3 6 6、CD 3 6 7、CD 3 6 8、CD 3 6 9、CD 3 7 0、CD 3 7 50

1、又はそれらの任意の組み合わせの細胞表面抗原遺伝子において1つ、2つ、又は複数の修飾を有する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、細胞表面抗原（例えば、mRNA、タンパク質、又はそれらの組み合わせ）の1つ以上の遺伝子産物の低減された発現レベルを有する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された細胞は、細胞表面抗原（例えば、mRNA、タンパク質、又はそれらの組み合わせ）の1つ以上の遺伝子産物を欠いている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の1つ以上の遺伝子修飾の検出及び/又は発現レベルの減少は、例えば、遺伝子産物（例えば、遺伝子によってコードされるタンパク質又は核酸転写物）の存在量を検出する定量的又は半定量的アッセイから得られたシグナルを反映する、例えば、単一の遺伝子の発現の定量的又は半定量的値など、1つ以上の測定値又はアッセイに基づいてもよい。遺伝子発現産物の検出に好適なアッセイは、当業者に周知であり、例えば、ウェスタンブロット、ELISA、RT-PCR（例えば、エンドポイントRT-PCR、リアルタイムPCR、又はqPCR）、タンパク質又は核酸マイクロアレイ、及び超並列シーケンシングアッセイを含む。しかしながら、ハイブリダイゼーション、特異的結合（例えば、抗体結合）、又は任意の他の技術に基づいて、任意の好適なアッセイを使用してもよい。本開示の特定の態様は、本明細書に提供される組成物を使用する方法、例えば、遺伝子操作された細胞、例えば、内因性CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）遺伝子において複数の修飾を有する細胞を作製するために提供されるある特定のgRNA及び/又は遺伝子編集酵素を使用する方法を提供する。

10

20

【0042】

本開示のいくつかの態様は、本明細書に提供される遺伝子操作された細胞、例えば、内因性CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）遺伝子において修飾を有する細胞を、それを必要とする対象に投与方法を提供する。いくつかの実施形態では、対象は、がん若しくは前がん状態を有するか、又はがん若しくは前がん状態と診断されている。いくつかの実施形態では、対象は、血液悪性腫瘍を有する。いくつかの実施形態では、前がん状態は、骨髓異形成症候群である。いくつかの実施形態では、がん又は前がん状態は、対象における悪性細胞の表面上のCD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）の発現によって特徴付けられる。

30

【0043】

本開示のいくつかの態様は、がんを有し、かつ抗CD33（Siglec-3）、抗CLL-1、抗CD123、抗CD327（Siglec-6）、及び/若しくは抗CD312（EMR2）療法を受けているか、又は受ける必要がある患者の治療のための戦略、組成物、方法、及び治療モダリティを提供し、いくつかの実施形態では、対象は、がん若しくは前がん状態を有するか、又はがん若しくは前がん状態と診断されている。いくつかの実施形態では、対象は、血液悪性腫瘍を有する。いくつかの実施形態では、前がん状態は、骨髓異形成症候群である。いくつかの実施形態では、がん又は前がん状態は、対象における悪性細胞の表面上のCD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）の発現によって特徴付けられる。

40

【0044】

列挙された実施形態

1. 表1～19の標的ドメインと結合する標的化ドメインを含むgRNA。
2. 配列番号1～2021のうちのいずれか1つの核酸配列を含む標的ドメインと結合する、標的化ドメインを含むgRNA。
3. 表1～19の標的ドメインの編集を指向することができる標的化ドメインを含むgRNA。
4. 標的化ドメインを含むgRNAであって、標的化ドメインが、

50

- 配列番号 1 ~ 2021 のうちのいずれか 1 つの核酸配列を含む、gRNA。
- 5 . CD33 (S i g l e c - 3) 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 6 . CLL - 1 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 7 . CD123 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 8 . CD327 (S i g l e c - 6) 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 9 . CD312 (E M R 2) 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の gRNA。 10
- 10 . CD327 (S i g l e c - 6) 遺伝子中の標的ドメインと結合する、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 11 . 標的化ドメインが、gRNA が遺伝子編集酵素と複合体を形成し、それによって gRNA : 酵素複合体を形成する、かつ gRNA : 酵素複合体が標的核酸分子中の標的ドメインと結合するのに好適な条件下で、標的ドメイン内に編集事象を提供するように構成されている、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 12 . 遺伝子編集酵素が、エンドヌクレアーゼを含む、実施形態 11 に記載の gRNA。
- 13 . エンドヌクレアーゼが、Cas エンドヌクレアーゼを含む、実施形態 12 に記載の gRNA。 20
- 14 . エンドヌクレアーゼが、触媒的に不活性な Cas 分子を含む、実施形態 12 又は 13 に記載の gRNA。
- 15 . エンドヌクレアーゼが、死滅 Cas (d C a s) を含む、実施形態 12 ~ 14 のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 16 . エンドヌクレアーゼが、死滅 Cas 9 (d C a s 9) を含む、実施形態 15 に記載の gRNA。
- 17 . エンドヌクレアーゼが、ニック - ゼ (n C a s) を含む、実施形態 12 ~ 14 のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 18 . エンドヌクレアーゼが、n Cas 9 を含む、実施形態 17 に記載の gRNA。
- 19 . エンドヌクレアーゼが、1 つ以上のウラシルグリコシラーゼ阻害剤 (U G I) ドメインに融合された d C a s 又は n C a s を含む、実施形態 12 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の gRNA。 30
- 20 . エンドヌクレアーゼが、塩基エディター (B E) に融合された d C a s 又は n C a s を含む、実施形態 12 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 21 . エンドヌクレアーゼが、アデニン塩基エディター (A B E) に融合された d C a s 又は n C a s を含む、実施形態 12 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 22 . A B E が、アデニンデアミナーゼ酵素を含む、実施形態 21 に記載の gRNA。
- 23 . エンドヌクレアーゼが、シトシン塩基エディター (C B E) に融合された d C a s 又は n C a s を含む、実施形態 12 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 24 . C B E が、シチジンデアミナーゼ酵素を含む、実施形態 23 に記載の gRNA。 40
- 25 . 核酸分子が、細胞のゲノム DNA に含まれる、実施形態 11 ~ 24 のいずれか 1 つに記載の gRNA。
- 26 . 細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態 25 に記載の gRNA。
- 27 . 細胞が、ヒト細胞である、実施形態 25 又は 26 に記載の gRNA。
- 28 . 細胞が、CD34 + 細胞である、実施形態 25 又は 26 に記載の gRNA。
- 29 . 細胞が、造血細胞である、実施形態 25 又は 26 に記載の gRNA。
- 30 . 細胞が、造血幹細胞である、実施形態 25 又は 26 に記載の gRNA。
- 31 . 細胞が、造血前駆細胞である、実施形態 25 又は 26 に記載の gRNA。
- 32 . 細胞が、免疫エフェクター細胞である、実施形態 25 又は 26 に記載の gRNA。
- 33 . 細胞が、リンパ球である、実施形態 25 又は 26 に記載の gRNA。 50

34. 細胞が、Tリンパ球である、実施形態25又は26に記載のgRNA。
35. 細胞が、ナチュラルキラー(NK)細胞である、実施形態25又は26に記載のgRNA。
36. 細胞が、幹細胞である、実施形態25又は26に記載のgRNA。
37. 幹細胞が、胚性幹細胞(ESC)、人工多能性幹細胞(iPSC)、間葉系幹細胞、又は組織特異的幹細胞である、実施形態36に記載のgRNA。
38. 編集事象が、核酸塩基への化学的变化を含む、実施形態11~37のいずれか1つに記載のgRNA。
39. 編集事象が、シトシンの脱アミノ化を含む、実施形態38に記載のgRNA。
40. 編集事象が、アデニンの脱アミノ化を含む、実施形態38に記載のgRNA。 10
41. 編集事象が、核酸塩基転移を含む、実施形態38に記載のgRNA。
42. 編集事象が、核酸塩基転換を含む、実施形態38に記載のgRNA。
43. 編集事象が、シトシン-グアニン(C-G)塩基対を、標的核酸分子内のチミン-アデニン(T-A)塩基対に変換することを含む、実施形態38に記載のgRNA。
44. 編集事象が、チミン-アデニン(T-A)塩基対を、標的核酸分子内のシトシン-グアニン(C-G)塩基対に変換することを含む、実施形態38に記載のgRNA。
45. 編集事象が、標的核酸分子内に未成熟終止コドンを導入することを含む、実施形態38に記載のgRNA。
46. 編集事象が、標的核酸分子内にスプライス部位を導入することを含む、実施形態38に記載のgRNA。 20
47. 編集事象が、標的核酸分子内のスプライス部位を破壊することを含む、実施形態38に記載のgRNA。
48. 標的核酸分子が、染色体又はゲノムDNA分子を含む、実施形態38~47のいずれか1つに記載のgRNA。
49. 標的核酸分子が、標的ドメインを含む、実施形態38~47のいずれか1つに記載のgRNA。
50. gRNAの標的化ドメインが、PAM配列を含む鎖に相補的である鎖である、標的ドメインの配列に相補的な二本鎖標的核酸分子の配列と(完全又は部分的相補性で)塩基対形成する、実施形態49に記載のgRNA。
51. gRNAの標的化ドメインが、PAM配列を含まない、実施形態50に記載のgRNA。 30
52. PAMの位置が、標的ドメインの配列の5'又は3'であり得る、実施形態50に記載のgRNA。
53. 標的ドメイン中の標的核酸塩基の位置が、PAMから約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個の核酸塩基である、実施形態51に記載のgRNA。
54. 編集事象が、細胞におけるCD33(Siglec-3)の活性を低減する、実施形態11~53のいずれか1つに記載のgRNA。
55. 編集事象が、細胞におけるCD33(Siglec-3)をコードする核酸の発現レベルを低減する、実施形態11~54のいずれか1つに記載のgRNA。 40
56. 編集事象が、細胞におけるCD33(Siglec-3)タンパク質の発現レベルを低減する、実施形態11~55のいずれか1つに記載のgRNA。
57. 編集事象が、細胞における完全長CD33(Siglec-3)RNA又はCD33(Siglec-3)タンパク質の発現を低減又は無効化する、実施形態11~56のいずれか1つに記載のgRNA。
58. 編集事象が、細胞におけるCLL-1の活性を低減する、実施形態11~57のいずれか1つに記載のgRNA。
59. 編集事象が、細胞におけるCLL-1をコードする核酸の発現レベルを低減する、実施形態11~58のいずれか1つに記載のgRNA。
60. 編集事象が、細胞におけるCLL-1タンパク質の発現レベルを低減する、実施形 50

態 11 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

61 . 編集事象が、細胞における完全長 CLL - 1 RNA 又は CLL - 1 タンパク質の発現を低減又は無効化する、実施形態 11 ~ 60 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

62 . 編集事象が、細胞における CD 123 の活性を低減する、実施形態 11 ~ 61 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

63 . 編集事象が、細胞における CD 123 をコードする核酸の発現レベルを低減する、実施形態 11 ~ 62 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

64 . 編集事象が、細胞における CD 123 タンパク質の発現レベルを低減する、実施形態 11 ~ 63 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

65 . 編集事象が、細胞における完全長 CD 123 RNA 又は CD 123 タンパク質の発現を低減又は無効化する、実施形態 11 ~ 64 のいずれか 1 つに記載の gRNA。 10

66 . 編集事象が、細胞における CD 327 (Siglec - 6) の活性を低減する、実施形態 11 ~ 65 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

67 . 編集事象が、細胞における CD 327 (Siglec - 6) をコードする核酸の発現レベルを低減する、実施形態 11 ~ 66 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

68 . 編集事象が、細胞における CD 327 (Siglec - 6) タンパク質の発現レベルを低減する、実施形態 11 ~ 67 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

69 . 編集事象が、細胞における完全長 CD 327 (Siglec - 6) RNA 又は CD 327 (Siglec - 6) タンパク質の発現を低減又は無効化する、実施形態 11 ~ 68 のいずれか 1 つに記載の gRNA。 20

70 . 編集事象が、細胞における CD 312 (EMR 2) の活性を低減する、実施形態 11 ~ 69 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

71 . 編集事象が、細胞における CD 312 (EMR 2) をコードする核酸の発現レベルを低減する、実施形態 11 ~ 70 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

72 . 編集事象が、細胞における CD 312 (EMR 2) タンパク質の発現レベルを低減する、実施形態 11 ~ 71 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

73 . 編集事象が、細胞における完全長 CD 312 (EMR 2) RNA 又は CD 312 (EMR 2) タンパク質の発現を低減又は無効化する、実施形態 11 ~ 72 のいずれか 1 つに記載の gRNA。

74 . 細胞が、CD 33 (Siglec - 3)、CLL - 1、CD 123、CD 327 (Siglec - 6)、及び / 若しくは CD 312 (EMR 2) RNA 又はタンパク質の切断型を発現する、実施形態 25 ~ 73 のいずれか 1 つに記載の gRNA。 30

75 . CD 33 (Siglec - 3)、CLL - 1、CD 123、CD 327 (Siglec - 6)、及び / 若しくは CD 312 (EMR 2) RNA 又はタンパク質の切断型が、非編集細胞における完全長 CD 33 (Siglec - 3)、CLL - 1、CD 123、CD 327 (Siglec - 6)、及び / 若しくは CD 312 (EMR 2) RNA 又はタンパク質のレベル以上のレベルで発現される、実施形態 74 に記載の gRNA。

76 . CD 33 (Siglec - 3)、CLL - 1、CD 123、CD 327 (Siglec - 6)、及び / 若しくは CD 312 (EMR 2) RNA 又はタンパク質の切断型の機能又は活性が、損なわれるか、又は無効化される、実施形態 75 に記載の gRNA。 40

77 . 機能又は活性が、抗体又はキメラ抗原受容体 (CAR) に結合することを含む、実施形態 76 に記載の gRNA。

78 . 標的化ドメインが、16ヌクレオチド以上の長さである、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の gRNA。

79 . 標的化ドメインが、約 16 ~ 約 30ヌクレオチドの長さである、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の gRNA。

80 . 標的化ドメインが、30ヌクレオチドの長さである、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の gRNA。

81 . 標的化ドメインが、21ヌクレオチドの長さである、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の gRNA。 50

82. 標的化ドメインが、20ヌクレオチドの長さである、先行実施形態のいずれか1つに記載のgRNA。

83. 標的化ドメインが、配列番号1~2021のうちのいずれか1つの配列若しくはその逆相補鎖、又は配列番号1~2021に対して少なくとも90%若しくは95%の同一性を有する配列、又は配列番号1~2021に対して1、2、若しくは3個以下の変異を有する配列を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載のgRNA。

84. 標的化ドメインが、配列番号1~2021のうちのいずれか1つの少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含み、かつ/又は配列番号1~2021のうちのいずれか1つの標的ドメインの少なくとも10個のヌクレオチドを塩基対形成するか、若しくはそれと相補的である、先行実施形態のいずれか1つに記載のgRNA。

85. 単一ガイドRNA (sgRNA) である、先行実施形態のいずれか1つに記載のgRNA。

86. 1つ以上の化学的修飾を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載のgRNA。

87. 塩基エディターと結合する、先行実施形態のいずれか1つに記載のgRNA。

88. 塩基エディターが、シトシン塩基エディター (CBE) である、実施形態87に記載のgRNA。

89. CBEが、CBE1、CBE2、CBE3、又はCBE4である、実施形態88に記載のgRNA。

90. CBEが、nCas9-2xUGI、BE4-rAPOBEC1、BE4-rAPOBEC1 K34A H122A、BE4-PpAPOBEC1、BE4-PpAPOBEC1 R33A、BE4-PpAPOBEC1 H122A、BE4-RrA3F、BE4-AmAPOBEC1、及びBE4-SsAPOBEC3Bからなる群から選択される、実施形態88又は89に記載のgRNA。

91. CBEが、CBE-PpAPOBEC1 WTである、実施形態88~90のいずれか1つに記載のgRNA。

92. 塩基エディターが、アデニン塩基エディター (ABE) である、実施形態87に記載のgRNA。

93. ABEが、ABE1、ABE2、ABE3、ABE4、ABE5、ABE6、ABE7、又はABE8である、実施形態92に記載のgRNA。

94. ABEが、ABE7.10-m、ABE7.10-d、ABE8.8-m、ABE8.8-d、ABE8.13-m、ABE8.13-d、ABE8.17-m、ABE8.17-d、ABE8.20-m、及びABE8.20-dからなる群から選択される、実施形態92又は93に記載のgRNA。

95. ABEが、ABE8である、実施形態92~94のいずれか1つに記載のgRNA。

96. 塩基エディターが、野生型塩基エディターである、実施形態87に記載のgRNA。

97. 実施形態1~96のいずれか1つに記載のgRNAと、塩基エディターと、を含む、リボ核タンパク質 (RNP) 複合体。

98. 塩基エディターが、シトシン塩基エディター (CBE) である、実施形態97に記載のgRNA。

99. CBEが、CBE1、CBE2、CBE3、又はCBE4である、実施形態98に記載のgRNA。

100. CBEが、nCas9-2xUGI、BE4-rAPOBEC1、BE4-rAPOBEC1 K34A H122A、BE4-PpAPOBEC1、BE4-PpAPOBEC1 R33A、BE4-PpAPOBEC1 H122A、BE4-RrA3F、BE4-AmAPOBEC1、及びBE4-SsAPOBEC3Bからなる群から選択される、実施形態98又は99に記載のgRNA。

101. CBEが、CBE-PpAPOBEC1 WTである、実施形態98に記載のg

10

20

30

40

50

R N A。

102．塩基エディターが、アデニン塩基エディター（A B E）である、実施形態97に記載のg R N A。

103．A B Eが、A B E 1、A B E 2、A B E 3、A B E 4、A B E 5、A B E 6、A B E 7、又はA B E 8である、実施形態102に記載のg R N A。

104．A B Eが、A B E 7 . 10 - m、A B E 7 . 10 - d、A B E 8 . 8 - m、A B E 8 . 8 - d、A B E 8 . 13 - m、A B E 8 . 13 - d、A B E 8 . 17 - m、A B E 8 . 17 - d、A B E 8 . 20 - m、及びA B E 8 . 20 - dからなる群から選択される、実施形態102又は103に記載のg R N A。

105．A B Eが、A B E 8である、実施形態102に記載のg R N A。

10

106．塩基エディターが、野生型塩基エディターである、実施形態97に記載のg R N A。

107．塩基エディターと、実施形態1～96のいずれか1つに記載のg R N Aと、を含む、予め形成された複合体を含む、組成物。

108．塩基エディターをコードするm R N Aと、実施形態1～96のいずれか1つに記載のg R N Aと、を含む、混合物。

109．塩基編集のための方法であって、

二本鎖D N A分子中の標的ドメインを、塩基エディターと、実施形態1～96のいずれか1つに記載のガイドR N A（g R N A）とを含む複合体と接触させることを含み、塩基エディターが、バリエーション塩基エディターと比較して、より高いオンターゲット編集効率を有するC B E又はA B Eである、方法。

20

110．塩基エディターが、野生型塩基エディターである、実施形態109に記載の方法。

111．野生型塩基エディターが、B E 4 - P p A P O B E Cを含む、実施形態110に記載の方法。

112．バリエーション塩基エディターが、B E 4 - P p A P O B E C 1 R 3 3 Aを含む、実施形態109に記載の方法。

113．二本鎖D N A分子が、細胞内にある、実施形態109～112のいずれか1つに記載の方法。

114．細胞を、g R N A、及び塩基エディターをコードするm R N Aと接触させることを含む、実施形態113に記載の方法。

30

115．塩基エディターをコードするm R N Aが、コードされた塩基エディターの発現を改善するように化学的に修飾される、実施形態114に記載の方法。

116．化学的に修飾されたm R N Aが、5 - メトキシウリジン修飾を含む、115に記載の方法。

117．化学的に修飾されたm R N Aが、N 1 - メチルシュードウリジン修飾を含む、実施形態115に記載の方法。

118．細胞を、g R N A及び塩基エディターを含むリボ核タンパク質（R N P）複合体と接触させることを含む、実施形態114～117のいずれか1つに記載の方法。

119．マルチプレックス塩基編集のための方法であって、

40

(i) 細胞を提供することと、

(i i) 細胞に、

(a) C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする1つ以上のガイドR N A (g R N A)、C L L - 1 を標的とする1つ以上のg R N A、C D 1 2 3 を標的とする1つ以上のg R N A、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) を標的とする1つ以上のg R N A、及び/又はC D 3 1 2 (E M R 2) を標的とする1つ以上のg R N A、並びに

(b) 1つ以上のg R N Aと結合する塩基エディターを導入することと、を含み、

1つ以上のg R N Aが、同じ又は異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

120．遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

50

(i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする1つ以上のガイドRNA (g R N A)、C L L - 1 を標的とする1つ以上のgRNA、C D 1 2 3 を標的とする1つ以上のgRNA、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) を標的とする1つ以上のgRNA、及び/又はC D 3 1 2 (E M R 2) を標的とする1つ以上のgRNA、並びに
 (b) 1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することと、を含み、
 1つ以上のgRNAが、同じ又は異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

1 2 1 . マルチプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) C D 3 3 を標的とする1つ以上のガイドRNA (g R N A)、
 (b) C L L - 1 を標的とする1つ以上のgRNA及び/又はC D 1 2 3 を標的とする1つ以上のgRNA、並びに
 (c) 1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することと、を含み、
 1つ以上のgRNAが、異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

1 2 2 . 遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

(i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) C D 3 3 を標的とする1つ以上のガイドRNA (g R N A)、
 (b) C L L - 1 を標的とする1つ以上のgRNA及び/又はC D 1 2 3 を標的とする1つ以上のgRNA、並びに
 (c) 1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することと、を含み、
 1つ以上のgRNAが、異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

1 2 3 . マルチプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする1つ以上のガイドRNA (g R N A)、
 (b) C L L - 1 を標的とする1つ以上のgRNA、C D 1 2 3 を標的とする1つ以上のgRNA、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) を標的とする1つ以上のgRNA、及び/又はC D 3 1 2 (E M R 2) を標的とする1つ以上のgRNA、並びに
 (c) 1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することと、を含み、
 1つ以上のgRNAが、同じ又は異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

1 2 4 . 遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

(i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする1つ以上のガイドRNA (g R N A)、
 (b) C L L - 1 を標的とする1つ以上のgRNA、C D 1 2 3 を標的とする1つ以上のgRNA、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) を標的とする1つ以上のgRNA、及び/又はC D 3 1 2 (E M R 2) を標的とする1つ以上のgRNA、並びに
 (c) 1つ以上のgRNAと結合する塩基エディターを導入することと、を含み、
 1つ以上のgRNAが、同じ又は異なる標的ドメイン内に編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

1 2 5 . トリプレックス塩基編集のための方法であって、

10

20

30

40

50

(i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) 少なくとも3つの異なるゲノム標的内に同時編集事象を提供するように構成された複数の g R N A、及び
 (d) 複数の g R N A と結合し、それによって遺伝子操作された細胞を産生する、塩基エディターを導入することと、を含む、方法。

1 2 6 . トリプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする1つ以上の g R N A、
 (b) C L L 1 を標的とする1つ以上の g R N A、
 (c) C D 1 2 3 を標的とする1つ以上の g R N A、及び
 (d) 1つ以上の g R N A と結合する塩基エディターを導入することと、を含み、
 1つ以上の g R N A が、少なくとも3つの異なる標的ドメイン内に同時編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

10

1 2 7 . 遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

(i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) 少なくとも3つの異なるゲノム標的内に同時編集事象を提供するように構成された複数の g R N A、及び
 (d) 複数の g R N A と結合し、それによって遺伝子操作された細胞を産生する、塩基エディターを導入することと、を含む、方法。

20

1 2 8 . 遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

(i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする1つ以上の g R N A、
 (b) C L L 1 を標的とする1つ以上の g R N A、
 (c) C D 1 2 3 を標的とする1つ以上の g R N A、及び
 (d) 1つ以上の g R N A と結合する塩基エディターを導入することと、を含み、
 1つ以上の g R N A が、少なくとも3つの異なる標的ドメイン内に同時編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

30

1 2 9 . クアドロプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) 少なくとも4つの異なるゲノム標的内に同時編集事象を提供するように構成された複数の g R N A、及び
 (d) 複数の g R N A と結合し、それによって遺伝子操作された細胞を産生する、塩基エディターを導入することと、を含む、方法。

1 3 0 . クアドロプレックス塩基編集のための方法であって、

(i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする1つ以上の g R N A、
 (b) C L L 1 を標的とする1つ以上の g R N A、
 (c) C D 1 2 3 を標的とする1つ以上の g R N A、
 (d) C D 3 1 2 (E M R 2) を標的とする1つ以上の g R N A、
 (e) 1つ以上の g R N A と結合する塩基エディターを導入することと、を含み、
 1つ以上の g R N A が、少なくとも4つの異なる標的ドメイン内に同時編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。

40

1 3 1 . 遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、

(i) 細胞を提供することと、

50

- (i i) 細胞に、
 (a) 少なくとも4つの異なるゲノム標的内に同時編集事象を提供するように構成された複数の g R N A、及び
 (d) 複数の g R N A と結合し、それによって遺伝子操作された細胞を産生する、塩基エディターを導入することと、を含む、方法。
- 1 3 2 . 遺伝子操作された細胞を産生する方法であって、
 (i) 細胞を提供することと、
 (i i) 細胞に、
 (a) C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする1つ以上の g R N A、
 (b) C L L 1 を標的とする1つ以上の g R N A、 10
 (c) C D 1 2 3 を標的とする1つ以上の g R N A、
 (d) C D 3 1 2 (E M R 2) を標的とする1つ以上の g R N A、
 (e) 1つ以上の g R N A と結合する塩基エディターを導入することと、を含み、
 1つ以上の g R N A が、少なくとも4つの異なる標的ドメイン内に同時編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている、方法。
- 1 3 3 . 1つ以上のガイドRNA (g R N A) が、実施形態1 ~ 9 6 のいずれか1つに記載の g R N A を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 3 4 . 同じ遺伝子内及び / 又は異なる遺伝子内の1つ以上の標的ドメインの同時編集をもたらす、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 3 5 . 同じ遺伝子内及び / 又は異なる遺伝子内の2つ以上の標的ドメインの同時編集をもたらす、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。 20
- 1 3 6 . 同じ遺伝子内及び / 又は異なる遺伝子内の3つ以上の標的ドメインの同時編集をもたらす、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 3 7 . 同じ遺伝子内及び / 又は異なる遺伝子内の4つ以上の標的ドメインの同時編集をもたらす、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 3 8 . C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子、C L L - 1 遺伝子、C D 1 2 3 遺伝子、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子、及び / 又はC D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子内の1つ以上の標的ドメインの同時編集をもたらす、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 3 9 . C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする1つ以上の g R N A が、シトシン塩基エディター (C B E) 及び / 又はアデニン塩基エディター (A B E) とともに使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。 30
- 1 4 0 . C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする1つ以上の g R N A が、C B E とともに使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 4 1 . C D 3 3 (S i g l e c - 3) を標的とする1つ以上の g R N A が、A B E とともに使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 4 2 . C L L 1 を標的とする1つ以上の g R N A が、シトシン塩基エディター (C B E) 及び / 又はアデニン塩基エディター (A B E) とともに使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 4 3 . C L L 1 を標的とする1つ以上の g R N A が、C B E とともに使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。 40
- 1 4 4 . C L L 1 を標的とする1つ以上の g R N A が、A B E とともに使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 4 5 . C D 1 2 3 を標的とする1つ以上の g R N A が、C B E 及び / 又はA B E とともに使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 4 6 . C D 1 2 3 を標的とする1つ以上の g R N A が、C B E とともに使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 4 7 . C D 1 2 3 を標的とする1つ以上の g R N A が、A B E とともに使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。
- 1 4 8 . E M R 2 を標的とする1つ以上の g R N A が、C B E 及び / 又はA B E とともに 50

使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

149. EMR2を標的とする1つ以上のgRNAが、CBEとともに使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

150. EMR2を標的とする1つ以上のgRNAが、ABEとともに使用するために設計されている、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

151. 細胞を、1つ以上のgRNA及び塩基エディターをコードするmRNAと接触させることを含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

152. 細胞を、1つ以上のgRNA及び塩基エディターを含むリボ核タンパク質(RNP)複合体と接触させることを含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

153. 細胞を、gRNA及び塩基エディターをコードするmRNAと接触させることを含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。 10

154. 塩基エディターをコードするmRNAが、コードされた塩基エディターの発現を改善するように化学的に修飾される、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

155. 化学的に修飾されたmRNAが、5-メトキシウリジン修飾を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

156. 化学的に修飾されたmRNAが、N1-メチルシュードウリジン修飾を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

157. RNPが、エレクトロポレーションを介して細胞中に導入される、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

158. 塩基エディターが、野生型塩基エディターである、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。 20

159. 塩基エディターが、シトシン塩基エディター(CBE)及び/又はアデニン塩基エディター(ABE)である、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

160. CBEのみが、細胞中に導入される、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

161. ABEのみが、細胞中に導入される、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

162. CBE及びABEの両方が、細胞中に導入される、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

163. 野生型塩基エディターが、細胞中に導入され、任意選択的に、野生型塩基エディターが、バリエーション塩基エディターと比較して、より高いオンターゲット編集効率でシトシン-グアニン(C-G)塩基対又はチミン-アデニン(T-A)塩基対を標的とする、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。 30

164. バリエーション塩基エディターと比較してより低い転座リスクをもたらす、任意選択的に、方法が、内因性CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)遺伝子における修飾について、0%の転座、又は検出不可能なレベルの転座、及び少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%以上のオンターゲット編集効率をもたらす、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。 40

167. 細胞が、造血幹細胞又は前駆細胞である、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

168. 先行実施形態のいずれか1つに記載の方法の方法によって産生される、遺伝子操作された造血幹細胞又は前駆細胞。

169. 複数の実施形態168に記載の遺伝子操作された造血幹細胞又は前駆細胞を含む、細胞集団。

170. 複数の遺伝子操作された造血幹細胞又は前駆細胞を含む細胞集団であって、細胞の少なくとも一部分が、

- (i) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子、
- (i i) 編集された C L L - 1 遺伝子、
- (i i i) 編集された C D 1 2 3 遺伝子、
- (i v) 編集された C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子、
- (v) 編集された C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子、
- (v i) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子及び編集された C L L - 1 遺伝子、
- (v i i) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子及び編集された C D 1 2 3 遺伝子、
- (v i i i) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子及び編集された C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子、 10
- (i x) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子及び編集された C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子、
- (x) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子、編集された C L L - 1 遺伝子、及び編集された C D 1 2 3 遺伝子、
- (x i) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子、編集された C L L - 1 遺伝子、編集された C D 1 2 3 遺伝子、及び編集された C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子、
- (x i i) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子、編集された C L L - 1 遺伝子、編集された C D 1 2 3 遺伝子、編集された C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子、及び編集された C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子、又は 20
- (x i i i) 編集された C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子、編集された C L L - 1 遺伝子、編集された C D 1 2 3 遺伝子、編集された C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子、及び/若しくは編集された C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子を含む、細胞集団。
- 1 8 0 . C D 3 3 (S i g l e c - 3) 遺伝子が、終止コドン又は変異スプライス部位を含むが、典型的には C R I S P R ヌクレアーゼ媒介性非相同末端結合 (N H E J) によって導入されるフレームシフト変異を含まない、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の細胞集団。
- 1 8 1 . C L L - 1 遺伝子が、終止コドン又は変異スプライス部位を含むが、典型的には C R I S P R ヌクレアーゼ媒介性非相同末端結合 (N H E J) によって導入されるフレームシフト変異を含まない、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の細胞集団。 30
- 1 8 2 . C D 1 2 3 遺伝子が、終止コドン又は変異スプライス部位を含むが、典型的には C R I S P R ヌクレアーゼ媒介性非相同末端結合 (N H E J) によって導入されるフレームシフト変異を含まない、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の細胞集団。
- 1 8 3 . C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 遺伝子が、終止コドン又は変異スプライス部位を含むが、典型的には C R I S P R ヌクレアーゼ媒介性非相同末端結合 (N H E J) によって導入されるフレームシフト変異を含まない、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の細胞集団。
- 1 8 4 . C D 3 1 2 (E M R 2) 遺伝子が、終止コドン又は変異スプライス部位を含むが、典型的には C R I S P R ヌクレアーゼ媒介性非相同末端結合 (N H E J) によって導入されるフレームシフト変異を含まない、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の細胞集団。 40
- 1 8 5 . 野生型対応物細胞集団によって発現される C D 3 3 (S i g l e c - 3) の 3 0 % 未満を発現する、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の細胞集団。
- 1 8 6 . 野生型対応物細胞集団によって発現される C L L - 1 の 3 0 % 未満を発現する、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の細胞集団。
- 1 8 7 . 野生型対応物細胞集団によって発現される C D 1 2 3 の 3 0 % 未満を発現する、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の細胞集団。
- 1 8 8 . 野生型対応物細胞集団によって発現される C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) の 3 0 % 未満を発現する、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の細胞集団。
- 1 8 9 . 野生型対応物細胞集団によって発現される C D 3 1 2 (E M R 2) の 3 0 % 未満 50

を発現する、先行実施形態のいずれか1つに記載の細胞集団。

190．細胞の少なくとも一部分が、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、又はCD312 (EMR2) 以外の系統特異的細胞表面抗原をコードする遺伝子で遺伝子編集を有する、先行実施形態のいずれか1つに記載の細胞集団。

191．CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、又はCD312 (EMR2) 以外の系統特異的細胞表面抗原をコードする遺伝子が、

CD19、CD30、CD5、CD6、CD7、CD34、CD38、又はBCMAである、実施形態190に記載の細胞集団。

192．先行実施形態のいずれか1つに記載の細胞集団を投与することを必要とする対象にそれを行う方法であって、

任意選択的に、対象が、造血器悪性腫瘍を有する、方法。

193．造血器悪性腫瘍が、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、白血病、又は多発性骨髄腫である、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

194．白血病が、急性骨髄性白血病 (AML)、急性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病又は慢性リンパ芽球性白血病、及び慢性リンパ球性白血病である、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

195．造血器悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病 (AML) を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

196．対象に、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 標的とする有効量の薬剤を投与することを更に含み、薬剤が、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) と結合する抗原結合断片を含む、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

197．CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) を標的とする薬剤が、抗体又はキメラ抗原受容体 (CAR) である、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

198．実施形態1~96のいずれか1つに記載のgRNAをコードする核酸。

199．a) 実施形態1~96のいずれか1つに記載のgRNA、又はgRNAをコードする核酸、及びb) 第2のgRNA、又は第2のgRNAをコードする核酸を含む、キット又は組成物。

【0045】

上の要約は、非限定的な様式において、本明細書中に開示される技術の実施形態、利点、特徴、及び使用の一部を例証することを意味する。本明細書中に開示される技術の他の実施形態、利点、特徴、及び使用は、詳細な説明、図面、実施例、及び特許請求の範囲から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1A】図1Aは、シトシン塩基エディター (CBE) 及びアデニン塩基エディター (ABE) を使用した精密なゲノム編集の例を示す概略図である。

【図1B】図1Bは、終止コドン (右上パネル)、低減された転座及び低いオフターゲット活性を有するマルチプレックス編集 (右下パネル)、遺伝子補正 (左上パネル)、並びにエピトープエンジニアリング (左下パネル) の導入による遺伝子サイレンシングのための例示的な塩基編集用途を示す概略図である。

【図1C】図1Cは、例えば、CD33及びCLL-1を含む治療用遺伝子を標的とするための塩基編集ガイドを識別及び指名するための例示的なマルチプレックス編集戦略を示す。

【図2A】図2Aは、例示的なインシリコ塩基エディターガイド設計及び優先順位付けを示し、これは、未成熟終止コドン又はスプライス部位破壊の導入を介して塩基エディター

10

20

30

40

50

を使用して遺伝子ノックアウト (KO) を達成するために使用され得る。

【図 2 B】図 2 B は、タンパク質ノックアウト (KO) を誘導するための例示的な CD 3 3 及び CLL - 1 塩基エディター候補ガイドを示す。

【図 2 C】図 2 C は、例示的な塩基エディター CD 3 3 及び CLL - 1 ガイド結合部位を示す概略図である。

【図 3 A】図 3 A は、高いオンターゲット活性及び低減されたオフターゲット活性を有する例示的な CBE 構築物及び ABE 構築物の選択を示す。Yu et al., Cytosine base editors with minimized unguided DNA and RNA off-target events and high on-target activity. Nature Communications, Volume 11, Article number 2052 (2020)、及び Gaudelli et al., Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. Nature Biotechnology Volume 38, pages 892 - 900 (2020) から適合し、その各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【図 3 B】図 3 B は、化学的修飾を有する mRNA を使用した造血幹細胞及び前駆細胞 (HSPC) における例示的な塩基エディター送達を示す。

【図 3 C】図 3 C は、塩基エディターを使用して HSPC を編集するための例示的なエンジニアリングプロトコルを示す。

20

【図 3 D】図 3 D は、ガイド 7、8、及び 17 を使用した HSPC における高いオンターゲット塩基編集を示す例示的な CD 3 3 CBE ガイドスクリーニングを示す。N1: 塩基エディターをコードする N1 - メチルシュドウリジン修飾 mRNA; 5 - mO: 塩基エディターをコードする 5 - メトキシウリジン修飾 mRNA。

【図 3 E】図 3 E は、ガイド 3 及び 4 を使用した HSPC における高いオンターゲット塩基編集を示す例示的な CLL - 1 CBE ガイドスクリーニングを示す。

【図 4 A】図 4 A は、例示的な CD 3 3 / CLL - 1 タンパク質ノックアウト (KO) 実験計画を示す。

【図 4 B】図 4 B は、例示的な塩基エディターガイドを使用して CD 3 3 / CLL - 1 タンパク質 KO を評価し、CBE WT 及び R33A バリエーションを比較するための研究概要を示す。

30

【図 4 C】図 4 C は、異なるガイド RNA を使用した CD 3 3 E1 スプライス部位のシトシン / アデニン塩基編集が、CD 3 3 発現を効率的に破壊することを示す。挿入は、ガイド RNA 17 の結果を示す。EP: エレクトロポレーション。

【図 4 D】図 4 D は、CD 3 3 E1 スプライドナー部位が CBE / ABE - CD 3 3 sg 17 によって破壊されたときに、タンパク質 KO を媒介すると想定される例示的なナンセンス媒介減衰機構を示す。

【図 4 E】図 4 E は、様々なガイド RNA を使用した CLL - 1 のシトシン塩基編集が、タンパク質発現を効率的に破壊することを示す。挿入は、ガイド RNA 3 の結果を示す。

【図 4 F】図 4 F は、遺伝子 KO の可能性に関する塩基エディター技術の改善を示す。これらのデータは、例示的な CD 3 3 BE 及びガイドの組み合わせが、HSPC 又は 60% 超の CD 3 3 において CD 3 3 タンパク質喪失を達成することができ、例示的な CLL - 1 BE 及びガイドの組み合わせが、HSPC において 60% 超の CLL - 1 タンパク質喪失を達成することができることを示す。

40

【図 5 A】図 5 A は、塩基エディターガイドを選択して優先順位を付けるための例示的な基準を示す概略図である。

【図 5 B】図 5 B は、標的化 iSTOP ガイド 7 及び 8 並びに SpliceR ガイド 17 - ガイドスクリーニング 2 CBE__R33A N1 mod を使用して、塩基編集が効率的な CD 3 3 タンパク質 KO を可能にすることを示す。

【図 5 C】図 5 C は、ガイド 7、8、及び 17 を使用して HSPC における高いオンター

50

ゲット塩基編集を示す C D 3 3 C B E (及び A B E s g 1 7) ガイドスクリーニングを示す。

【図 5 D】図 5 D は、細胞生存率及び細胞増殖 C D 3 3 ガイドスクリーニング 2 の結果を示す。

【図 5 E】図 5 E は、細胞生存率及び細胞増殖 C L L - 1 ガイドスクリーニング 2 の結果を示す。

【図 5 F】図 5 F は、細胞生存率 C D 3 3 / C L L - 1 - 構築物比較結果を示す。

【図 5 G】図 5 G は、細胞増殖 C D 3 3 / C L L - 1 - 構築物比較結果を示す。

【図 5 H】図 5 H は、C L L - 1 タンパク質 K O の時間経過を示す。

【図 6 A】図 6 A は、例示的な C B E C D 3 3 + C L L - 1 マルチプレックス塩基編集及び実験計画を示す。 10

【図 6 B】図 6 B は、上位 C L L - 1 ガイドを用いた用量滴定マルチプレックス塩基編集上部 C B E C D 3 3 ガイドのための研究群の概要を示す。

【図 6 C】図 6 C は、マルチプレックス塩基編集 C D 3 4 + 細胞が、H P S C において効率的な細胞表面 C D 3 3 及び C L L - 1 タンパク質 K O を示すことを示す。

【図 6 D】図 6 D は、マルチプレックス塩基編集 C D 3 4 + 細胞が、H P S C において効率的な C D 3 3 及び C L L - 1 タンパク質 K O を示すことを示す。

【図 6 E】図 6 E は、H P S C における C D 3 3 タンパク質 K O データを示す。C D 3 3 g 8 及び C L L - 1 g 3 のデータを強調表示する。C D 3 3 s g 8 の例示的なオフターゲット分析を左下に示し、望ましいオフターゲットプロファイルが示される。 20

【図 6 F】図 6 F は、マルチプレックス編集細胞の約 8 0 % が C D 3 3 及び C L L - 1 表面タンパク質発現を欠くことを示すフローデータを示す。

【図 7】図 7 は、塩基編集が H P S C の細胞分化に影響を与えないことを示すデータを示す。

【図 8 A】図 8 A は、シトシン塩基エディター及び C p f 1 ヌクレアーゼの複合化同時送達、単一送達を可能にし、B E が二本鎖切断をしないため、転座リスクがないことを示す。

【図 8 B】図 8 B は、C D 3 4 細胞において同時に C B E 及び A s C p f 1 を送達する場合、生存率及び細胞増殖が影響を受けないことを示す。

【図 9 A】図 9 A は、C L L - 1 ガイド R N A s g 3 と組み合わせた、異なる C D 3 3 ガイド R N A (s g 7 、 s g 8 、 又は s g 1 7) を使用して実施された C D 3 3 及び C L L - 1 のマルチプレックス編集のための実験設計を示す概略図である。 30

【図 9 B】図 9 B は、タンパク質ノックアウト (K O) 読み出しについてフローサイトメトリーによって評価された骨髓インビトロ分化データを示す。C D 3 3 g 8 及び C L L - 1 g 3 との塩基エディター (B E) の組み合わせは、8 0 % の二重表面タンパク質 K O を示した。

【図 9 C】図 9 C は、R h a m p S e q アッセイによって決定された場合、バランスの取れた転座がマルチプレックス塩基編集試料で検出されなかったことを示す。

【図 1 0】図 1 0 は、C D 3 4 + 造血幹細胞及び前駆細胞 (H S P C) におけるシトシン塩基エディター (C B E) を使用したマルチプレックス塩基編集を示す概略図である。 40

【図 1 1】図 1 1 A は、C D 3 3 遺伝子座及び C a s 9 対照結合部位 (左パネル) 上の終止コドン及びスプライス破壊体塩基編集ガイド、並びに構築物をコードする 3 つの異なる C B E 4 m R N A (右パネル) を使用した単一ガイド (s g 7 、 s g 8 、 又は s g 1 7 、 標識された g 7 、 g 8 、 又は g 1 7) を誘導する上位 3 つの C B E 遺伝子 K O のオンターゲット塩基編集効率のマッピングを示す。灰色のバーは、C D 3 3 遺伝子座上の C a s 9 誘導インデル頻度を表す。図 1 1 B は、C L L - 1 遺伝子座及び C a s 9 対照結合部位 (左パネル) 上の終止コドン及びスプライス破壊体塩基編集ガイド、並びに構築物をコードする 3 つの異なる C B E 4 m R N A (右パネル) を使用した単一ガイド (s g 3 又は s g 4 、 標識された g 3 又は g 4) を誘導する上位 2 つの C B E 遺伝子 K O のオンターゲット塩基編集効率のマッピングを示す。灰色のバーは、C L L - 1 遺伝子座上の C a s 9 50

誘導インデル頻度を表す。

【図12】図12は、3つの異なるCD33 gRNA (sg7、sg8、又はsg17、標識されたg7、g8、又はg17、左パネル)又は2つの異なるCLL-1 gRNA (sg3又はsg4、標識されたg3又はg4)について、エレクトロポレーション(EP)の9日後にフローサイトメトリーによる編集されたCD34+ HSPCにおいて定量されたCD33(左パネル)及びCLL-1(右パネル)表面タンパク質発現を示す。ヒストグラムは、ガイド毎に色分けされ、対照未処置細胞と比較して、CD33又はCLL-1編集試料の陽性集団の割合を示す。

【図13A】図13Aは、マルチプレックスCas9対照編集細胞と比較した、CD33及びCLL-1に対する単一及びマルチプレックス塩基編集細胞のオンターゲット編集効率を示す。

【図13B】図13Bは、骨髄分化培養条件でのEPの9日後のフローサイトメトリーを使用した、編集及び未編集CD34+ HSPCにおける正規化CD33及びCLL-1表面タンパク質発現を示す。

【図14】図14は、複数の前駆細胞系統の成長を支持するために、分化培養条件で培養された編集及び未処理対照HSPCを示す。コロニー形成単位(CFU)を播種の14日後に測定し、エリスロイド(CFU-E)、骨髄(CFU-G/M/GM)、及び混合(CFU-GEMM)系統を定量化した。

【図15A】図15Aは、CD33及びCLL-1合成ガイドを使用してmRNA又はCas9リボ核タンパク質(RNP)複合体をコードするCBE4でエレクトロポレーションされ、単球系統にインピトロで分化されたCD34+ HSPCを示す。

【図15B】図15Bは、EP後(2日目)、及び単球分化全体を通して、異なる時点で採取された塩基編集及びCas9編集試料におけるCD33及びCLL-1のオンターゲット編集効率を示す。編集効率を計算し、CRISPResso v2.0.30及びバリエーションエフェクター予測因子(VEP)を使用して注釈付けした。編集及び未編集試料におけるCD33(上パネル)及びCLL-1(下パネル)タンパク質発現を、フローサイトメトリーを使用して単球分化全体を通して測定した。マルチプレックス塩基編集細胞全体のバルク集団は、単球分化CD34+ HSPCにおけるCD33及びCLL-1発現の減少を示した。

【図16A】図16Aは、2つの異なる遺伝子座間の予想される転座の223bp接合部にリードを折り畳んで整列させた、217442のカバレッジを有するマルチプレックスrhAmpSeqアプローチを使用したオン-オン(CD33-CLL-1切断部位)転座事象の頻度を示す。

【図16B】図16Bは、ドナーの変動性(線量測定)を説明するために正規化剤として使用されたピンク色(染色体1、2、3)、黄色(染色体12、CLL-1遺伝子座)、及び緑色(染色体19、CD33遺伝子座)の染色体塗料を示す、編集及び未編集試料における指向性ゲノムハイブリダイゼーション(dGH)アッセイを使用した代表的な中期スプレッドを示す。

【図17A】図17Aは、アデニン塩基エディター(ABE)と、CD33及びCD123(例えば、それぞれCD33g17及びCD123g18)を標的とするgRNAとの複合化同時送達、CD123において約90%のオンターゲット編集効率を可能にすることを示す。

【図17B】図17Bは、CD123g18を用いたアデニン塩基編集のオフターゲットプロファイルを示す。

【図17C】図17Cは、異なるCD33及びCD123ガイドRNAをアデニン塩基エディター(ABE)と組み合わせて使用して実施されたCD33及びCD123のマルチプレックス編集のための実験設計を示す概略図である。

【図18A】図18Aは、Cas9対照編集細胞と比較した、CD33に対する単一塩基編集細胞のオンターゲット編集効率を示す。塩基編集は、異なるCD33ガイドRNA(例えば、CD33g7、CD33g8、及びCD33g17)を、アデニン塩基エディタ

10

20

30

40

50

ー (A B E) 又はシトシン塩基エディター (C B E) と組み合わせて使用して実施した。
 N 1 : 塩基エディターをコードする N 1 - メチルシュードウリジン修飾 m R N A ; 5 - m
 O : 塩基エディターをコードする 5 - メトキシウリジン修飾 m R N A 。 アデニン塩基エ
 ディター (A B E) と C D 3 3 g 1 7 の組み合わせは、アデニン塩基エディター (A B E)
 をコードする 9 μ g の 5 - メトキシウリジン修飾 m R N A を有する C D 3 4 + H S P C
 のエレクトロポレーション (E P) 後 1 2 0 時間で、約 9 5 % のオンターゲット編集効率
 をもたらした。

【図 1 8 B】図 1 8 B は、異なる C D 3 3 ガイド R N A (例えば、C D 3 3 g 7、C D 3
 3 g 8、及び C D 3 3 g 1 7) を、アデニン塩基エディター (A B E) 又はシトシン塩基
 エディター (C B E) と組み合わせて使用して実施した C D 3 3 に対する単一塩基編集細
 胞のオンターゲット編集効率を示す。N 1 : 塩基エディターをコードする N 1 - メチルシ
 ユードウリジン修飾 m R N A ; 5 - m O : 塩基エディターをコードする 5 - メトキシウリ
 ジン修飾 m R N A 。 アデニン塩基エディター (A B E) と C D 3 3 g 1 7 の組み合わせは、
 アデニン塩基エディター (A B E) をコードする 9 μ g の 5 - メトキシウリジン修飾 m
 R N A を有する C D 3 4 + H S P C のエレクトロポレーション (E P) 後 1 2 0 時間で、
 スプライシングを破壊する置換を作り出す全ての編集を実質的にもたらした。

【図 1 8 C】図 1 8 C は、エレクトロポレーション (E P) 後 1 2 0 時間の編集及び未編
 集 C D 3 4 + H S P C における C D 3 3 表面タンパク質発現を示す。アデニン塩基エ
 ディター (A B E) と C D 3 3 g 1 7 の組み合わせは、アデニン塩基エディター (A B E)
 をコードする 9 μ g の 5 - メトキシウリジン修飾 m R N A を有する C D 3 4 + H S P C
 のエレクトロポレーション (E P) 後 1 2 0 時間で、未編集 (M o c k E P) と比較して
 C D 3 3 表面タンパク質発現の強力な喪失をもたらした。

【図 1 9】図 1 9 は、アデニン塩基編集 (A B E) マルチプレックス編集のための実験設
 計を示す概略図である。C D 3 4 + 細胞を解凍し、培養物中で 4 8 時間休止させる。次に
 、A B E 部分 (箱内) について、A B E C D 3 3 g 1 7 を、以下のガイド R N A : A B
 E C D 1 2 3 g 1 7、A B E C D 1 2 3 g 1 8、及び A B E C D 1 2 3 g 2 1 の各
 々とのマルチプレックス編集のために対形成する。アデニン塩基エディター (A B E) を
 コードする 2 つのガイド R N A 及び m R N A を、細胞内にエレクトロポレーションする。
 次いで、細胞を骨髄性インビトロ分化培地中で培養する。サイトメーターを使用してガイ
 ド編集細胞試料中の C D 3 3 及び C D 1 2 3 の表面タンパク質発現を測定するために、エ
 レクトロポレーション後 2 日目及び 9 日目にフローサイトメリーを実施し、g D N A 分
 子分析のための細胞を、エレクトロポレーション後 6 日目及び 9 日目に収集した。

【図 2 0 A】図 2 0 A は、アデニン塩基エディター (A B E) と、C D 3 3 及び C D 1 2
 3 (例えば、それぞれ C D 3 3 g 1 7 及び C D 1 2 3 g 1 8) を標的とする g R N A との
 複合化同時送達、C D 1 2 3 において約 9 0 % のオンターゲット編集効率を可能にする
 ことを示す。

【図 2 0 B】図 2 0 B は、エレクトロポレーションなし対照 (E P なし)、モックエレク
 トロポレーション対照 (M o c k E P C t l)、C D 3 3 又は C D 1 2 3 (例えば、
 それぞれ C D 3 3 g 1 7 又は C D 1 2 3 g 1 8 を使用する) の単一 A B E g R N A 標的
 化、並びに C D 3 3 及び C D 1 2 3 の両方 (例えば、C D 3 3 g 1 7 及び C D 1 2 3 g 1
 8 の両方を使用する) の複合化同時 A B E 標的化の、骨髄 (B M) における 1 6 週間の生
 着後のキメリズムの割合 (右パネル) 及びオンターゲット編集インプット (右パネル) を
 示す。これらのデータは、ヒト造血幹細胞及び前駆細胞 (H S P C) における塩基編集に
 よる骨髄性抗原のマルチプレックス欠失が、急性骨髄性白血病 (A M L) 治療のための次
 世代移植の可能性を可能にすることを示す。

【図 2 0 C】図 2 0 C は、A B E によって誘発されたスプライス部位破壊頻度が、研究の
 異なる群にわたって一貫して増加したことを示す。

【図 2 1 A】図 2 1 A は、N S G マウスにおける同時に C B E C D 3 3 + C L L 1 及び
 A B E C D 3 3 + C D 1 2 3 マルチプレックス編集された C D 3 4 + H S P C の編集
 及び長期再構成の持続性を評価するための、インビボ研究 V i i v s 0 4 2 の実験設計

10

20

30

40

50

を示す概略図である。

【図 2 1 B】図 2 1 B は、V i i v s 0 4 2 研究及び材料生成の群を示す。

【図 2 2 A】図 2 2 A は、V i i v s 0 4 2 インプット材料生成ワークフローの実験設計を示す概略図である。

【図 2 2 B】図 2 2 B は、V i i v s 0 4 2 研究の例示的な編集条件の詳細を示す表である。

【図 2 3 A】図 2 3 A は、V i i v s 0 4 2 研究の細胞生存率を示す。これらのデータは、B E 単一条件とマルチプレックス条件との間の高い生存率（約 9 0 %）を示す。

【図 2 3 B】図 2 3 B は、V i i v s 0 4 2 研究の細胞増殖を示す。これらのデータは、B E 単一条件とマルチプレックス条件との間の同様の細胞計数を示す。

【図 2 4 A】図 2 4 A は、V i i v s 0 4 2 研究条件の総編集効率を示す。

【図 2 4 B】図 2 4 B は、V i i v s 0 4 2 研究条件の塩基編集効率を示す。これらのデータは、投与のためにエレクトロポレーション（E P）の 4 8 時間後に採取された試料における塩基編集効率が、終止コドン増加を有し、かつスプライス部位が破壊された対立遺伝子を含む予想される対立遺伝子を示したことを示す。

【図 2 5】図 2 5 は、V i i v s 0 4 2 研究条件の総編集効率を示す。高い総編集は、E P 後 4 8 時間（投与された細胞）で、全試料で確認され、E P 後 1 4 4 時間でわずかに増加した。

【図 2 6 A】図 2 6 A は、2 0 0 希釈でのコロニー形成単位（C F U）の結果を示す。

【図 2 6 B】図 2 6 B は、4 0 0 希釈でのコロニー形成単位（C F U）の結果を示す。

【図 2 7】図 2 7 は、骨髄（B M）における 1 6 週間の生着後のキメリズムの割合を示す。これらのデータは、編集された群におけるキメリズムへの影響を示さない。

【図 2 8 A】図 2 8 A ~ 2 8 C は、A B E を用いて編集された群における C D 3 3（図 2 8 A）、C L L - 1（図 2 8 B）、及び C D 1 2 3（図 2 8 C）の非常に効率的なノックアウトを示す。

【図 2 8 B】図 2 8 A ~ 2 8 C は、A B E を用いて編集された群における C D 3 3（図 2 8 A）、C L L - 1（図 2 8 B）、及び C D 1 2 3（図 2 8 C）の非常に効率的なノックアウトを示す。

【図 2 8 C】図 2 8 A ~ 2 8 C は、A B E を用いて編集された群における C D 3 3（図 2 8 A）、C L L - 1（図 2 8 B）、及び C D 1 2 3（図 2 8 C）の非常に効率的なノックアウトを示す。

【図 2 9 A】図 2 9 A ~ 2 9 H は、編集された群における系統再構成に効果を示さない。

図 2 9 A は、編集された群における総系統再構成を示す。図 2 9 B ~ 2 9 H は、以下を含む、異なる細胞型にわたる編集された群における系統再構成を示す：B リンパ球（図 2 9 B）、T リンパ球（図 2 9 C）、単球（図 2 9 D）、H S P C（図 2 9 E）、顆粒球（図 2 9 F）、c D C（図 2 9 G）、及び p D C（図 2 9 H）。

【図 2 9 B】図 2 9 A ~ 2 9 H は、編集された群における系統再構成に効果を示さない。

図 2 9 A は、編集された群における総系統再構成を示す。図 2 9 B ~ 2 9 H は、以下を含む、異なる細胞型にわたる編集された群における系統再構成を示す：B リンパ球（図 2 9 B）、T リンパ球（図 2 9 C）、単球（図 2 9 D）、H S P C（図 2 9 E）、顆粒球（図 2 9 F）、c D C（図 2 9 G）、及び p D C（図 2 9 H）。

【図 2 9 C】図 2 9 A ~ 2 9 H は、編集された群における系統再構成に効果を示さない。

図 2 9 A は、編集された群における総系統再構成を示す。図 2 9 B ~ 2 9 H は、以下を含む、異なる細胞型にわたる編集された群における系統再構成を示す：B リンパ球（図 2 9 B）、T リンパ球（図 2 9 C）、単球（図 2 9 D）、H S P C（図 2 9 E）、顆粒球（図 2 9 F）、c D C（図 2 9 G）、及び p D C（図 2 9 H）。

【図 2 9 D】図 2 9 A ~ 2 9 H は、編集された群における系統再構成に効果を示さない。

図 2 9 A は、編集された群における総系統再構成を示す。図 2 9 B ~ 2 9 H は、以下を含む、異なる細胞型にわたる編集された群における系統再構成を示す：B リンパ球（図 2 9 B）、T リンパ球（図 2 9 C）、単球（図 2 9 D）、H S P C（図 2 9 E）、顆粒球（図

10

20

30

40

50

29F)、cDC(図29G)、及びpDC(図29H)。

【図29E】図29A~29Hは、編集された群における系統再構成に効果を示さない。図29Aは、編集された群における総系統再構成を示す。図29B~29Hは、以下を含む、異なる細胞型にわたる編集された群における系統再構成を示す：Bリンパ球(図29B)、Tリンパ球(図29C)、単球(図29D)、HSPC(図29E)、顆粒球(図29F)、cDC(図29G)、及びpDC(図29H)。

【図29F】図29A~29Hは、編集された群における系統再構成に効果を示さない。図29Aは、編集された群における総系統再構成を示す。図29B~29Hは、以下を含む、異なる細胞型にわたる編集された群における系統再構成を示す：Bリンパ球(図29B)、Tリンパ球(図29C)、単球(図29D)、HSPC(図29E)、顆粒球(図29F)、cDC(図29G)、及びpDC(図29H)。

10

【図29G】図29A~29Hは、編集された群における系統再構成に効果を示さない。図29Aは、編集された群における総系統再構成を示す。図29B~29Hは、以下を含む、異なる細胞型にわたる編集された群における系統再構成を示す：Bリンパ球(図29B)、Tリンパ球(図29C)、単球(図29D)、HSPC(図29E)、顆粒球(図29F)、cDC(図29G)、及びpDC(図29H)。

【図29H】図29A~29Hは、編集された群における系統再構成に効果を示さない。図29Aは、編集された群における総系統再構成を示す。図29B~29Hは、以下を含む、異なる細胞型にわたる編集された群における系統再構成を示す：Bリンパ球(図29B)、Tリンパ球(図29C)、単球(図29D)、HSPC(図29E)、顆粒球(図29F)、cDC(図29G)、及びpDC(図29H)。

20

【図30A】図30A~30Eは、以下を含む、異なる細胞型にわたる骨髓亜集団における高レベルのCD123 KOを示す：単球(図30A)、顆粒球(図30B)、肥満/好塩基球(図30C)、cDC(図30D)、及びpDC(図30E)。

【図30B】図30A~30Eは、以下を含む、異なる細胞型にわたる骨髓亜集団における高レベルのCD123 KOを示す：単球(図30A)、顆粒球(図30B)、肥満/好塩基球(図30C)、cDC(図30D)、及びpDC(図30E)。

【図30C】図30A~30Eは、以下を含む、異なる細胞型にわたる骨髓亜集団における高レベルのCD123 KOを示す：単球(図30A)、顆粒球(図30B)、肥満/好塩基球(図30C)、cDC(図30D)、及びpDC(図30E)。

30

【図30D】図30A~30Eは、以下を含む、異なる細胞型にわたる骨髓亜集団における高レベルのCD123 KOを示す：単球(図30A)、顆粒球(図30B)、肥満/好塩基球(図30C)、cDC(図30D)、及びpDC(図30E)。

【図30E】図30A~30Eは、以下を含む、異なる細胞型にわたる骨髓亜集団における高レベルのCD123 KOを示す：単球(図30A)、顆粒球(図30B)、肥満/好塩基球(図30C)、cDC(図30D)、及びpDC(図30E)。

【図31A】図31A~31Eは、以下を含む、異なる細胞型にわたってCLL1 KOのレベルが低いため、骨髓亜集団における低レベルの二重KOを示す：単球(図31A)、顆粒球(図31B)、肥満/好塩基球(図31C)、cDC(図31D)、及びpDC(図31E)。

40

【図31B】図31A~31Eは、以下を含む、異なる細胞型にわたってCLL1 KOのレベルが低いため、骨髓亜集団における低レベルの二重KOを示す：単球(図31A)、顆粒球(図31B)、肥満/好塩基球(図31C)、cDC(図31D)、及びpDC(図31E)。

【図31C】図31A~31Eは、以下を含む、異なる細胞型にわたってCLL1 KOのレベルが低いため、骨髓亜集団における低レベルの二重KOを示す：単球(図31A)、顆粒球(図31B)、肥満/好塩基球(図31C)、cDC(図31D)、及びpDC(図31E)。

【図31D】図31A~31Eは、以下を含む、異なる細胞型にわたってCLL1 KOのレベルが低いため、骨髓亜集団における低レベルの二重KOを示す：単球(図31A)

50

、顆粒球（図 3 1 B）、肥満/好塩基球（図 3 1 C）、c D C（図 3 1 D）、及び p D C（図 3 1 E）。

【図 3 1 E】図 3 1 A ~ 3 1 E は、以下を含む、異なる細胞型にわたって C L L 1 K O のレベルが低いため、骨髄垂集団における低レベルの二重 K O を示す：単球（図 3 1 A）、顆粒球（図 3 1 B）、肥満/好塩基球（図 3 1 C）、c D C（図 3 1 D）、及び p D C（図 3 1 E）。

【図 3 2】図 3 2 は、研究の異なる群にわたる骨髄材料におけるオンターゲット編集分析を示す。これらのデータは、編集の持続性を確認する。

【図 3 3】図 3 3 は、C B E によって誘導される終止コドン頻度が、研究の異なる群にわたって一貫してわずかに減少したことを示す。

10

【図 3 4】図 3 4 は、A B E によって誘発されたスプライス部位破壊頻度が、研究の異なる群にわたって一貫して増加したことを示す。

【図 3 5】図 3 5 は、インビボでの B E マルチプレックススケールアップの特徴付けを示す概略図である。

【図 3 6】図 3 6 は、インビボでの B E マルチプレックススケールアップで評価された様々な条件を示す概略図である。

【図 3 7】図 3 7 は、インビボでの B E マルチプレックススケールアップの実験条件を示す。

【図 3 8 A】図 3 8 A 及び 3 8 B は、それぞれ、インビボでの B E マルチプレックススケールアップについての細胞計数及び生存率を示す。細胞増殖は、6 M 細胞、2 倍用量条件でわずかに低減した。

20

【図 3 8 B】図 3 8 A 及び 3 8 B は、それぞれ、インビボでの B E マルチプレックススケールアップについての細胞計数及び生存率を示す。細胞増殖は、6 M 細胞、2 倍用量条件でわずかに低減した。

【図 3 9】図 3 9 は、インビボでの B E マルチプレックススケールアップのフローゲーティング戦略を示す。

【図 4 0 A】図 4 0 A 及び 4 0 B は、それぞれ、C D 3 3 及び C L L - 1 についてのフローサイトメトリーデータを示す。

【図 4 0 B】図 4 0 A 及び 4 0 B は、それぞれ、C D 3 3 及び C L L - 1 についてのフローサイトメトリーデータを示す。

30

【図 4 1】図 4 1 は、C D 3 3 及び C L L - 1 の二重ロックアウトを示す。

【図 4 2】図 4 2 は、C B E C D 3 3 s g 8 を用いた塩基編集効率を示す。これらのデータは、2 倍用量が、C B E C D 3 3 g 8 の未成熟終止コドン形成をもたらすより高い頻度の対立遺伝子をもたらすことを示す。

【図 4 3】図 4 3 は、C B E C L L 1 g 3 を用いた塩基編集効率を示す。これらのデータは、2 倍用量が、C B E C L L 1 g 3 の未成熟終止コドン形成をもたらすより高い頻度の対立遺伝子をもたらすことを示す。

【図 4 4】図 4 4 は、E M R 2 及び C D 3 3 の C B E 及び A B E 編集のための実験条件を示す概略図である。

【図 4 5】図 4 5 は、C D 3 3 及び E M R 2 ガイドスクリーニングランドスケープを示す概略図である。

40

【図 4 6】図 4 6 は、E M R 2 ガイドスクリーニング及びタンパク質 K O 評価の実験計画を示す概略図である。

【図 4 7 A】図 4 7 A 及び 4 7 B は、それぞれ、E M R 2 及び C D 3 3 の C B E 及び A B E 編集についての細胞生存率及び細胞計数を示す。

【図 4 7 B】図 4 7 A 及び 4 7 B は、それぞれ、E M R 2 及び C D 3 3 の C B E 及び A B E 編集についての細胞生存率及び細胞計数を示す。

【図 4 8 A】図 4 8 A 及び 4 8 B は、それぞれ、E M R 2 の低減された表面発現を示す。これらのデータは、A B E E M R 2 ガイドが E P の 6 日後に強力なタンパク質 K O を示すことを示す。

50

【図 4 8 B】図 4 8 A 及び 4 8 B は、それぞれ、E M R 2 の低減された表面発現を示す。これらのデータは、A B E E M R 2 ガイドが E P の 6 日後に強力なタンパク質 K O を示すことを示す。

【図 4 9 A】図 4 9 A 及び 4 9 B は、それぞれ、E M R 2 実験条件が、E P の 6 日後に様々なレベルのタンパク質 K O をもたらしたことを示す。

【図 4 9 B】図 4 9 A 及び 4 9 B は、それぞれ、E M R 2 実験条件が、E P の 6 日後に様々なレベルのタンパク質 K O をもたらしたことを示す。

【図 5 0 A】図 5 0 A 及び 5 0 B は、それぞれ、C D 3 3 の低減された表面発現を示す。これらのデータは、A B E C D 3 3 ガイドが E P の 6 日後に強力なタンパク質 K O を示すことを示す。

【図 5 0 B】図 5 0 A 及び 5 0 B は、それぞれ、C D 3 3 の低減された表面発現を示す。これらのデータは、A B E C D 3 3 ガイドが E P の 6 日後に強力なタンパク質 K O を示すことを示す。

【図 5 1 A】図 5 1 A 及び 5 1 B は、それぞれ、C D 3 3 実験条件が、E P の 6 日後に様々なレベルのタンパク質 K O をもたらしたことを示す。

【図 5 1 B】図 5 1 A 及び 5 1 B は、それぞれ、C D 3 3 実験条件が、E P の 6 日後に様々なレベルのタンパク質 K O をもたらしたことを示す。

【図 5 2 A】図 5 2 A 及び 5 2 B は、それぞれ、A B E による総編集効率及び塩基編集効率を示す。H S P C における A B E ガイドスクリーニングは、C D 3 3 及び E M R 2 遺伝子座の様々な部位で高い編集、及びパイスタンダー編集の低い頻度を示した。全ての実験条件は、M o c k E P 対照と比較して良好な生存率 (9 0 %) 及び細胞増殖を示した。

【図 5 2 B】図 5 2 A 及び 5 2 B は、それぞれ、A B E による総編集効率及び塩基編集効率を示す。H S P C における A B E ガイドスクリーニングは、C D 3 3 及び E M R 2 遺伝子座の様々な部位で高い編集、及びパイスタンダー編集の低い頻度を示した。全ての実験条件は、M o c k E P 対照と比較して良好な生存率 (9 0 %) 及び細胞増殖を示した。

【図 5 3】図 5 3 は、A B E C D 3 3 g R N A の編集効率を示す。

【図 5 4】図 5 4 は、A B E 及び C B E E M R 2 g R N A の編集効率を示す。

【図 5 5】図 5 5 は、E M R 2 / C D 3 3 マルチプレックス A B E 塩基編集を示す概略図である。

【図 5 6】図 5 6 は、例示的な E M R 2 / C D 3 3 マルチプレックス A B E 塩基編集条件を示す。

【図 5 7】図 5 7 は、インシリコオフターゲット部位における潜在的な A B E ガイドを示す。

【図 5 8 A】図 5 8 A 及び 5 8 B は、それぞれ、E M R 2 及び C D 3 3 の A B E 編集のための細胞計数及び細胞生存率を示す。

【図 5 8 B】図 5 8 A 及び 5 8 B は、それぞれ、E M R 2 及び C D 3 3 の A B E 編集のための細胞計数及び細胞生存率を示す。

【図 5 9 A】図 5 9 A 及び 5 9 B は、それぞれ、A B E E M R 2 及び C D 3 3 D N A 編集頻度を示す。

【図 5 9 B】図 5 9 A 及び 5 9 B は、それぞれ、A B E E M R 2 及び C D 3 3 D N A 編集頻度を示す。

【図 6 0 A】図 6 0 A ~ 6 0 C は、それぞれ、A B E E M R 2 編集頻度、編集結果、及びベース編集の要約を示す。

【図 6 0 B】図 6 0 A ~ 6 0 C は、それぞれ、A B E E M R 2 編集頻度、編集結果、及びベース編集の要約を示す。

【図 6 0 C】図 6 0 A ~ 6 0 C は、それぞれ、A B E E M R 2 編集頻度、編集結果、及びベース編集の要約を示す。

【図 6 1 A】図 6 1 A 及び 6 1 B は、それぞれ、C D 9 7 における E M R 2 オフターゲット編集の頻度及びその結果を示す。

【図 6 1 B】図 6 1 A 及び 6 1 B は、それぞれ、C D 9 7 における E M R 2 オフターゲット

10

20

30

40

50

ト編集の頻度及びその結果を示す。

【図62A】図62A～62Cは、それぞれ、A B E C D 3 3 編集頻度、編集結果、及びベース編集の要約を示す。

【図62B】図62A～62Cは、それぞれ、A B E C D 3 3 編集頻度、編集結果、及びベース編集の要約を示す。

【図62C】図62A～62Cは、それぞれ、A B E C D 3 3 編集頻度、編集結果、及びベース編集の要約を示す。

【図63】図63は、E M R 2 表面タンパク質発現を示す。

【図64】図64は、E M R 2 表面タンパク質発現を示す。

【図65】図65は、C D 3 3 表面タンパク質発現を示す。

【図66】図66は、C D 3 3 表面タンパク質発現を示す。

【図67】図67は、C D 3 3、C L L 1、C D 1 2 3、及びE M R 2 のC B E 単一編集及びクアドロプレックス編集を示す概略図である。

【図68】図68は、C B E をC D 3 4 + 細胞に送達して、4つの遺伝子座を同時に標的とする実験設計を示す概略図である。

【図69A】図69A及び69Bは、それぞれ、C D 3 3、C L L 1、C D 1 2 3、及びE M R 2 についてのC B E 単一編集及びクアドロプレックス編集についての細胞生存率及び細胞計数を示す。これらの日付は、クアドロプレックス編集が細胞の健康に影響を与えないことを示す。

【図69B】図69A及び69Bは、それぞれ、C D 3 3、C L L 1、C D 1 2 3、及びE M R 2 についてのC B E 単一編集及びクアドロプレックス編集についての細胞生存率及び細胞計数を示す。これらの日付は、クアドロプレックス編集が細胞の健康に影響を与えないことを示す。

【図70】図70は、C D 3 3、C L L 1、C D 1 2 3、及びE M R 2 のC B E 単一編集及びクアドロプレックス編集の総編集効率を示す。これらのデータは、ヒト造血幹細胞及び前駆細胞(H S P C)における塩基編集による骨髄性抗原の対立遺伝子マルチプレックス欠失が、急性骨髄性白血病(A M L)治療のための次世代移植の可能性を可能にすることを示す。

【図71】図71は、C D 3 3、C L L 1、C D 1 2 3、及びE M R 2 のC B E 単一編集及びクアドロプレックス編集の編集効率を示す。これらのデータは、ヒト造血幹細胞及び前駆細胞(H S P C)における塩基編集による骨髄性抗原の対立遺伝子マルチプレックス欠失が、急性骨髄性白血病(A M L)治療のための次世代移植の可能性を可能にすることを示す。

【図72】図72は、A B E C D 3 3 / C D 1 2 3 / E M R 2 三重K Oを示す概略図である。

【図73】図73は、A B E C D 3 3 / C D 1 2 3 / E M R 2 三重K Oの例示的なエレクトロポレーション条件を示す。

【図74A】図74A及び74Bは、それぞれ、E P 後2日目及び5日目のD N A 編集頻度を示す。これらのデータは、E P 後5日目に、C D 3 3 g 1 6 について> 8 0 % の編集、及びC D 1 2 3 g 1 8、E M R 2 s D e x 1 3、及びE M R 2 s D e x 1 9 について> 9 0 % の編集を示す。C D 1 2 3 g 1 8、E M R 2 s D e x 1 3、及びE M R 2 s D e x 1 9 について、単一及びトリプレックスE P 条件で同様の編集が観察された。単一のE P と比較して、トリプレックスにおけるC D 3 3 g 1 6 の編集のわずかな減少(約5%の減少)も観察された。全てのガイド及び条件にわたって、2日目と比較して、5日目でより高い編集が観察された。E M R 2 s D e x 1 3 及びE M R 2 s D e x 1 9 に対するC D 9 7 におけるオフターゲット編集は観察されなかった。

【図74B】図74A及び74Bは、それぞれ、E P 後2日目及び5日目のD N A 編集頻度を示す。これらのデータは、E P 後5日目に、C D 3 3 g 1 6 について> 8 0 % の編集、及びC D 1 2 3 g 1 8、E M R 2 s D e x 1 3、及びE M R 2 s D e x 1 9 について> 9 0 % の編集を示す。C D 1 2 3 g 1 8、E M R 2 s D e x 1 3、及びE M

10

20

30

40

50

R 2 s D e x 1 9 について、単一及びトリプレックス E P 条件で同様の編集が観察された。単一の E P と比較して、トリプレックスにおける C D 3 3 g 1 6 の編集のわずかな減少（約 5 % の減少）も観察された。全てのガイド及び条件にわたって、2 日目と比較して、5 日目でより高い編集が観察された。E M R 2 s D e x 1 3 及び E M R 2 s D e x 1 9 に対する C D 9 7 におけるオフターゲット編集は観察されなかった。

【図 7 5 A】図 7 5 A 及び 7 5 B は、それぞれ、E P 後 2 日目及び 5 日目の D N A 編集頻度を示す。これらのデータは、単一及びトリプレックス条件における全てのガイドに対する編集の大部分が、スプライス部位の破壊を引き起こすことを示す。E M R 2 s D e x 1 3 は、E P 後 2 日目及び 5 日目に約 4 % の I N D E L 形成を示す。

【図 7 5 B】図 7 5 A 及び 7 5 B は、それぞれ、E P 後 2 日目及び 5 日目の D N A 編集頻度を示す。これらのデータは、単一及びトリプレックス条件における全てのガイドに対する編集の大部分が、スプライス部位の破壊を引き起こすことを示す。E M R 2 s D e x 1 3 は、E P 後 2 日目及び 5 日目に約 4 % の I N D E L 形成を示す。

【図 7 6 A】図 7 6 A 及び 7 6 B は、それぞれ、C D 3 3 s g 1 6 群及び C D 1 2 3 s g 1 8 群における詳細な置換割合の概要を示す概略図である。

【図 7 6 B】図 7 6 A 及び 7 6 B は、それぞれ、C D 3 3 s g 1 6 群及び C D 1 2 3 s g 1 8 群における詳細な置換割合の概要を示す概略図である。

【図 7 7 A】図 7 7 A 及び 7 7 B は、それぞれ、E M R 2 s g 1 3 群及び E M R 2 s g 1 9 群における詳細な置換割合の概要を示す概略図である。

【図 7 7 B】図 7 7 A 及び 7 7 B は、それぞれ、E M R 2 s g 1 3 群及び E M R 2 s g 1 9 群における詳細な置換割合の概要を示す概略図である。

【図 7 8 A - 1】図 7 8 A ~ 7 8 C は、フローサイトメトリーゲーティング戦略を示す概略図である。

【図 7 8 A - 2】図 7 8 A ~ 7 8 C は、フローサイトメトリーゲーティング戦略を示す概略図である。

【図 7 8 B - 1】図 7 8 A ~ 7 8 C は、フローサイトメトリーゲーティング戦略を示す概略図である。

【図 7 8 B - 2】図 7 8 A ~ 7 8 C は、フローサイトメトリーゲーティング戦略を示す概略図である。

【図 7 8 C】図 7 8 A ~ 7 8 C は、フローサイトメトリーゲーティング戦略を示す概略図である。

【図 7 9 A】図 7 9 A 及び 7 9 B は、それぞれ、E M R 2 表面タンパク質発現及び総 g M F I を示す。

【図 7 9 B】図 7 9 A 及び 7 9 B は、それぞれ、E M R 2 表面タンパク質発現及び総 g M F I を示す。

【図 8 0】図 8 0 及び 8 1 は、それぞれ、C D 3 3 表面タンパク質発現及び総 g M F I を示す。

【図 8 1】図 8 0 及び 8 1 は、それぞれ、C D 3 3 表面タンパク質発現及び総 g M F I を示す。

【図 8 2 A】図 8 2 A 及び 8 2 B は、それぞれ、C D 1 2 3 表面タンパク質発現及び総 g M F I を示す。

【図 8 2 B】図 8 2 A 及び 8 2 B は、それぞれ、C D 1 2 3 表面タンパク質発現及び総 g M F I を示す。

【図 8 3 A】図 8 3 A 及び 8 3 B は、それぞれ、C D 3 3、C D 1 2 3、及び E M R 2 表面タンパク質発現、並びに三重 K O 表面発現を示す。

【図 8 3 B】図 8 3 A 及び 8 3 B は、それぞれ、C D 3 3、C D 1 2 3、及び E M R 2 表面タンパク質発現、並びに三重 K O 表面発現を示す。

【図 8 4 A】図 8 4 A 及び 8 4 B は、それぞれ、C D 3 3、C D 1 2 3、及び E M R 2 D N A 編集、並びに三重 K O 表面タンパク質分析を示す。

【図 8 4 B】図 8 4 A 及び 8 4 B は、それぞれ、C D 3 3、C D 1 2 3、及び E M R 2

DNA編集、並びに三重KO表面タンパク質分析を示す。

【図85A】図85Aは、SpCas9 NGG PAMを有するCLL-1 ABEガイドを示す。

【図85B】図85Bは、不完全なPAM(NG)を有するCLL-1 ABEガイドを示す。

【図85C】図85Cは、不完全なPAM(NRG)を有するCLL-1 ABEガイドを示す。

【図85D】図85Dは、Cpf1 TTTN PAMを有するCLL-1 ABEガイドを示す。

【図85E】図85Eは、CLL-1遺伝子の概要を示す概略図である。

【図86】図86は、Siglec-6に対するABE/CBE g17アライメントを示し、g17がSiglec-3及びSiglec-6の両方を標的化し、破壊する可能性が高いと予測する。

【図87】図87は、CD33 g17での編集後に、Siglec-6表面発現が減少することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0047】

定義

標的ドメインとのgRNA相互作用に関して本明細書で使用される場合、用語「結合する」は、gRNA分子及び複合体を形成する標的ドメインを指す。複合体は、二本鎖構造を形成する2つの鎖、又は多鎖の複合体を形成する3つ以上の鎖を含んでもよい。結合は、Casエンドヌクレアーゼによる標的ドメインの切断などの、より広範なプロセスにおけるステップを構成し得る。いくつかの実施形態では、gRNAは、完全相補性で標的ドメインに結合し、他の実施形態では、gRNAは、例えば、1つ以上のミスマッチで、部分相補性を有する標的ドメインに結合する。いくつかの実施形態では、gRNAが標的ドメインに結合するとき、gRNA塩基の全標的化ドメインは、標的化ドメインと対形成する。他の実施形態では、標的化ドメインの部分のみ、及び/又は標的ドメイン塩基の部分のみが、他と対形成する。一実施形態では、相互作用は、標的ドメイン介在性切断現象を介在するのに十分である。

【0048】

本明細書で使用される用語である「Cas9分子」は、gRNAと相互作用し、gRNAと協調して、標的ドメインを含む部位に向かうか、又は局在化することができる分子又はポリペプチドを指す。Cas9分子は、天然に存在するCas9分子、及び例えば、天然に存在するCas9分子と少なくとも1つのアミノ酸残基によって異なる、操作、改変、又は修飾されたCas9分子を含む。

【0049】

用語「gRNA」及び「ガイドRNA」は、全体を通して互換的に使用され、gRNA/Cas9分子複合体の標的核酸への特異的標的化又はホーミングを促進する核酸を指す。gRNAは、本明細書で、時にsgRNAと称されることもある、単分子(単一のRNA分子を有する)、又はモジュール式(1つより多い、典型的には、2つの別個のRNA分子を含む)であり得る。gRNAは、宿主細胞のゲノム中の標的ドメインに結合してもよい。gRNAは、標的ドメインに対して部分的又は完全に相補的であり得る標的化ドメインを含み得る。gRNAはまた、(例えば、gRNA配列の標的化ドメインによって)gRNA配列と結合された標的ドメインにCas9分子を動員する、「足場配列」(例えば、tracrRNA配列)を含み得る。足場配列は、少なくとも1つのステムループ構造を含み、エンドヌクレアーゼを動員し得る。例示的な足場配列は、例えば、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、及びPCT公開第WO2013/176772号に見出され得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用される「変異」という用語は、参照配列、例えば、そのような変異を有していない細胞の対応する配列、又は対応する野生型核酸配列と比較して、核酸における遺伝的变化（例えば、挿入、欠失、逆位、又は置換）を指す。本明細書に提供されるいくつかの実施形態では、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD 3 3 (S i g l e c - 3)、CLL - 1、CD 1 2 3、CD 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び/又はCD 3 1 2 (E M R 2)) 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系統特異的細胞表面抗原の発現の喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、遺伝子に対する変異は、遺伝子によって産生されるタンパク質を脱標的化する。いくつかの実施形態では、脱標的化系統特異的細胞表面抗原タンパク質は、系統特異的細胞表面抗原を標的とする薬剤によって結合されないか、又はより低いレベルで結合される。いくつかの実施形態では、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD 3 3 (S i g l e c - 3)、CLL - 1、CD 1 2 3、CD 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び/又はCD 3 1 2 (E M R 2)) をコードする遺伝子における変異は、系統特異的細胞表面抗原を標的とする免疫療法剤によって結合されないか、又は遺伝子によってコードされる非変異系統特異的細胞表面抗原型よりも著しく低いレベルで結合される、系統特異的細胞表面抗原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、本明細書に提供される系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD 3 3 (S i g l e c - 3)、CLL - 1、CD 1 2 3、CD 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び/又はCD 3 1 2 (E M R 2)) 遺伝子にゲノム変異を持つ細胞は、系統特異的細胞表面抗原を標的とする免疫療法剤、例えば、抗CD 3 3抗体若しくはキメラ抗原受容体 (C A R)、抗CLL - 1抗体若しくはキメラ抗原受容体 (C A R)、抗CD 1 2 3抗体若しくはキメラ抗原受容体 (C A R)、抗CD 1 9抗体若しくはキメラ抗原受容体 (C A R)、抗CD 3 0抗体若しくはキメラ抗原受容体 (C A R)、抗CD 5抗体若しくはキメラ抗原受容体 (C A R)、抗CD 6抗体若しくはキメラ抗原受容体 (C A R)、抗CD 7抗体若しくはキメラ抗原受容体 (C A R)、抗CD 3 4抗体若しくはキメラ抗原受容体 (C A R)、抗CD 3 8抗体若しくはキメラ抗原受容体 (C A R)、及び/又は抗BCMA抗体若しくはキメラ抗原受容体 (C A R) によって結合されないか、又は著しくより低いレベルで結合される。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD 3 3 (S i g l e c - 3)、CLL - 1、CD 1 2 3、CD 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び/又はCD 3 1 2 (E M R 2)) 遺伝子にゲノム変異を持つ細胞は、系統特異的細胞表面抗原を標的とする免疫療法剤、例えば、CD 3 3 (S i g l e c - 3)、CLL - 1、CD 1 2 3、CD 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び/又はCD 3 1 2 (E M R 2) を標的とする抗体又はキメラ抗原受容体 (C A R) によって結合されないか、又は著しくより低いレベルで結合される。

10

20

30

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される細胞表面抗原遺伝子にゲノム変異を持つ細胞は、細胞表面抗原を標的とする免疫療法剤、例えば、抗体又はキメラ抗原受容体 (C A R) によって結合されないか、又は著しく低いレベルで結合される。いくつかの実施形態では、免疫療法剤、例えば、抗体又はキメラ抗原受容体 (C A R) は、細胞表面抗原を標的とし、CD 1 a、CD 1 b、CD 1 c、CD 1 d、CD 1 e、CD 2、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 1 0、CD 1 1 a、CD 1 1 b、CD 1 1 c、CD 1 1 d、CD 1 3、CD 1 4、CD 1 5、CD 1 6 a、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、CD 3 3、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 R A、CD 4 5 R B、CD 4 5 R C、CD 4 5 R O、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 5 0、CD 5 1、CD 5 2、CD 5 3、CD 5 4、CD 5 5、CD 5 6、CD 5 7、CD 5 8、CD 5 9、CD 6 0 a、CD 6 0 b

40

50

、 CD 6 0 c、 CD 6 1、 CD 6 2 E、 CD 6 2 L、 CD 6 2 P、 CD 6 3、 CD 6 4、
 CD 6 5 s、 CD 6 6 a、 CD 6 6 b、 CD 6 6 c、 CD 6 6 d、 CD 6 6 e、 CD 6 6
 f、 CD 6 7、 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 b、 CD 8 5 c、 CD 8 5 d、 C
 D 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 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 10
 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、 C
 D 1 2 0 a、 CD 1 2 0 b、 CD 1 2 1 a、 CD 1 2 1 b、 CD 1 2 2、 CD 1 2 3、 C
 D 1 2 4、 CD 1 2 5、 CD 1 2 6、 CD 1 2 7、 CD 1 2 8 a、 CD 1 2 8 b、 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、 C
 D 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 4、 CD 1 4 6、 CD 1 4 7、 CD 1 4 8、 C
 D 1 5 0、 CD 1 5 1、 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 a、 CD 1 5 8 b 1、 CD 1
 5 8 b 2、 CD 1 5 8 c、 CD 1 5 8 d、 CD 1 5 8 e 1、 CD 1 5 8 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 2、 CD 1 6 3、 CD 1 6 4
 、 CD 1 6 5、 CD 1 6 6、 CD 1 6 7 a、 CD 1 6 7 b、 CD 1 6 8、 CD 1 6 9、 C
 D 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、 C
 D 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 1 9 8、 CD 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 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 2 2 6、 CD 2 2 7、 CD 2
 2 8、 CD 2 2 9、 CD 2 3 0、 CD 2 3 1、 CD 2 3 2、 CD 2 3 3、 CD 2 3 4、 C
 D 2 3 5 a、 CD 2 3 5 b、 CD 2 3 6、 CD 2 3 8、 CD 2 3 9、 CD 2 4 0 C E、 C
 D 2 4 0 D、 CD 2 4 1、 CD 2 4 2、 CD 2 4 3、 CD 2 4 4、 CD 2 4 5、 CD 2 4
 6、 CD 2 4 7、 CD 2 4 8、 CD 2 4 9、 CD 2 5 2、 CD 2 5 3、 CD 2 5 4、 CD
 2 5 6、 CD 2 5 7、 CD 2 5 8、 CD 2 6 1、 CD 2 6 2、 CD 2 6 3、 CD 2 6 4、
 CD 2 6 5、 CD 2 6 6、 CD 2 6 7、 CD 2 6 8、 CD 2 6 9、 CD 2 7 0、 CD 2 7
 1、 CD 2 7 2、 CD 2 7 3、 CD 2 7 4、 CD 2 7 5、 CD 2 7 6、 CD 2 7 7、 CD
 2 7 8、 CD 2 7 9、 CD 2 8 0、 CD 2 8 1、 CD 2 8 2、 CD 2 8 3、 CD 2 8 4、
 CD 2 8 6、 CD 2 8 8、 CD 2 8 9、 CD 2 9 0、 CD 2 9 2、 CD w 2 9 3、 CD 2
 9 4、 CD 2 9 5、 CD 2 9 6、 CD 2 9 7、 CD 2 9 8、 CD 2 9 9、 CD 3 0 0 a、
 CD 3 0 0 c、 CD 3 0 0 d、 CD 3 0 0 e、 CD 3 0 0 f、 CD 3 0 0 g、 CD 3 0 1
 、 CD 3 0 2、 CD 3 0 3、 CD 3 0 4、 CD 3 0 5、 CD 3 0 6、 CD 3 0 7 a、 CD
 3 0 7 b、 CD 3 0 7 c、 CD 3 0 7 d、 CD 3 0 7 e、 CD 3 0 9、 CD 3 1 2、 CD
 3 1 4、 CD 3 1 5、 CD 3 1 6、 CD 3 1 7、 CD 3 1 8、 CD 3 1 9、 CD 3 2 0、
 CD 3 2 1、 CD 3 2 2、 CD 3 2 4、 CD 3 2 5、 CD 3 2 6、 CD 3 2 7、 CD 3 2
 8、 CD 3 2 9、 CD 3 3 1、 CD 3 3 2、 CD 3 3 3、 CD 3 3 4、 CD 3 3 5、 CD
 3 3 6、 CD 3 3 7、 CD 3 3 8、 CD 3 3 9、 CD 3 4 0、 CD 3 4 4、 CD 3 4 9、
 CD 3 5 0、 CD 3 5 1、 CD 3 5 2、 CD 3 5 3、 CD 3 5 4、 CD 3 5 5、 CD 3 5
 7、 CD 3 5 8、 CD 3 6 0、 CD 3 6 1、 CD 3 6 2、 CD 3 6 3、 CD 3 6 4、 CD

10

20

30

40

50

365、CD366、CD367、CD368、CD369、CD370、CD371、又はそれらの任意の組み合わせである。BD Biosciences Human CD Marker Chart、https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/campaigns/reagent-education/BD_Reagents_CDMarkerHuman_Poster.pdf (参照によりその全体が組み込まれる)からの系統特異的細胞表面抗原の例も参照されたい。

【0052】

gRNAの「標的化ドメイン」は、標的核酸上の「標的ドメイン」に対して相補的である。gRNAのコアダメインに相補的なヌクレオチド配列を含む標的核酸の鎖は、本明細書において標的核酸の「相補鎖」と称される。標的化ドメインは、標的部位へのgRNA結合RNAガイドヌクレアーゼの標的化を媒介する。標的化ドメインの選択に関するガイダンスは、例えば、Fu Y et al, Nat Biotechnol 2014 (doi:10.1038/nbt.2808)及びSternberg SH et al., Nature 2014 (doi:10.1038/nature13011)に見出すことができる。

10

【0053】

「塩基編集」という用語は、塩基エディター、例えば、特定の核酸塩基、例えば、細胞ミスマッチ修復機構を介して、CからTへのヌクレオチドの変化、又はAからGへのヌクレオチドの変化をもたらす、C又はAヌクレオチドのシトシン又はアデノシン核酸塩基を標的とし、脱アミノ化するデアミナーゼに融合されたヌクレアーゼ損傷遺伝子編集酵素又は部分的ヌクレアーゼ損傷遺伝子編集酵素(例えば、RNAガイドCRISPR/Casタンパク質)の使用を含む、ゲノム編集技術を指す。例えば、Komor et al. Nature (2016) 533:420-424、Rees et al. Nat. Rev. Genet. (2018) 19(12):770-788、Anzalone et al. Nat. Biotechnol. (2020) 38:824-844を参照されたい。

20

【0054】

「標的ドメイン」、「標的部位」、又は「標的配列」という用語は、本明細書に記載されるように塩基エディターによって脱アミノ化される核酸分子(例えば、DNA分子)内の配列を指す。いくつかの実施形態では、標的配列は、ポリヌクレオチド(例えば、二本鎖DNA分子)であり、ポリヌクレオチドは、コード鎖及び相補鎖を含む。「コード鎖」及び「相補鎖」の意味は、当該技術分野における用語の共通意味である。いくつかの実施形態では、標的配列は、哺乳動物のゲノム中の配列である。いくつかの実施形態では、標的配列は、ヒトのゲノム中の配列である。「標的コドン」という用語は、塩基エディターによって編集され、かつ核酸塩基の脱アミノ化を介して異なるコドンに変換される、アミノ酸コドンを指す。いくつかの実施形態では、標的コドンは、コード鎖で編集される。いくつかの実施形態では、標的コドンは、相補鎖で編集される。

30

【0055】

「表面抗原」又は「細胞表面抗原」という用語は、細胞の少なくとも1つの細胞サイクル又は発生段階の間に細胞外アクセス可能である細胞の表面上の抗原を指し、細胞サイクルの全ての段階の間に細胞外アクセス可能である抗原を含む。この文脈において、「細胞外アクセス可能である」とは、細胞膜の透過化を必要とせずに、細胞外に提供される抗体などの薬剤によって結合され得る抗原を指す。本明細書で使用される場合、「細胞表面抗原」という用語は、タンパク質、ペプチド、糖、脂質、又は造血幹細胞及び前駆細胞(HSPC)の表面上などの細胞の表面上に提示される他の部分を含み得る。

40

【0056】

「抗原」という用語は、免疫系の構成要素、例えば、抗体又はその抗原結合部分によって特異的に認識される高分子(例えば、ポリペプチド)の部分の部分を指す。本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、免疫応答を誘発する任意の分子を包含する。この免疫

50

応答は、抗体産生、若しくは特定の免疫適格細胞の活性化のいずれか、又はその両方に関与し得る。したがって、当業者であれば、免疫応答を誘発するタンパク質又はその部分をコードするヌクレオチド配列を含む任意の核酸が、その用語が本明細書で使用される「抗原」をコードすることを理解するであろう。細胞表面抗原としては、これらに限定されないが、タンパク質、ペプチド、糖、脂質、又は細胞表面上の他の部分などの細胞表面分子が挙げられる。

【0057】

例示的な細胞表面抗原としては、これらに限定されないが、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8a、CD8b、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD13、CD14、CD15、CD16a、CD16b、CD17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD45、CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RO、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60a、CD60b、CD60c、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64、CD65s、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD67、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD75s、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85a、CD85b、CD85c、CD85d、CD85e、CD85f、CD85g、CD85h、CD85i、CD85j、CD85k、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107a、CD107b、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120a、CD120b、CD121a、CD121b、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD128a、CD128b、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CD146、CD147、CD148、CD150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156a、CD156b、CD156c、CD157、CD158a、CD158b1、CD158b2、CD158c、CD158d、CD158e1、CD158e2、CD158f、CD158g、CD158h、CD158i、CD158j、CD158k、CD159a、CD159c、CD160、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167a、CD167b、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172a、CD172b、CD172g、CD173、CD174、CD175、CD175s、CD176、CD177、CD178、CD179a、CD179b、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CD198、CD199、CD200、CD201、CD202b、CD203c、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210a、CD210b、CD212、CD213a1、CD213a2、CD215、CD217、CD218a、CD218b、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD2

3 1、CD 2 3 2、CD 2 3 3、CD 2 3 4、CD 2 3 5 a、CD 2 3 5 b、CD 2 3 6、CD 2 3 8、CD 2 3 9、CD 2 4 0 C E、CD 2 4 0 D、CD 2 4 1、CD 2 4 2、CD 2 4 3、CD 2 4 4、CD 2 4 5、CD 2 4 6、CD 2 4 7、CD 2 4 8、CD 2 4 9、CD 2 5 2、CD 2 5 3、CD 2 5 4、CD 2 5 6、CD 2 5 7、CD 2 5 8、CD 2 6 1、CD 2 6 2、CD 2 6 3、CD 2 6 4、CD 2 6 5、CD 2 6 6、CD 2 6 7、CD 2 6 8、CD 2 6 9、CD 2 7 0、CD 2 7 1、CD 2 7 2、CD 2 7 3、CD 2 7 4、CD 2 7 5、CD 2 7 6、CD 2 7 7、CD 2 7 8、CD 2 7 9、CD 2 8 0、CD 2 8 1、CD 2 8 2、CD 2 8 3、CD 2 8 4、CD 2 8 6、CD 2 8 8、CD 2 8 9、CD 2 9 0、CD 2 9 2、CD w 2 9 3、CD 2 9 4、CD 2 9 5、CD 2 9 6、CD 2 9 7、CD 2 9 8、CD 2 9 9、CD 3 0 0 a、CD 3 0 0 c、CD 3 0 0 d、CD 3 0 0 e、CD 3 0 0 f、CD 3 0 0 g、CD 3 0 1、CD 3 0 2、CD 3 0 3、CD 3 0 4、CD 3 0 5、CD 3 0 6、CD 3 0 7 a、CD 3 0 7 b、CD 3 0 7 c、CD 3 0 7 d、CD 3 0 7 e、CD 3 0 9、CD 3 1 2、CD 3 1 4、CD 3 1 5、CD 3 1 6、CD 3 1 7、CD 3 1 8、CD 3 1 9、CD 3 2 0、CD 3 2 1、CD 3 2 2、CD 3 2 4、CD 3 2 5、CD 3 2 6、CD 3 2 7、CD 3 2 8、CD 3 2 9、CD 3 3 1、CD 3 3 2、CD 3 3 3、CD 3 3 4、CD 3 3 5、CD 3 3 6、CD 3 3 7、CD 3 3 8、CD 3 3 9、CD 3 4 0、CD 3 4 4、CD 3 4 9、CD 3 5 0、CD 3 5 1、CD 3 5 2、CD 3 5 3、CD 3 5 4、CD 3 5 5、CD 3 5 7、CD 3 5 8、CD 3 6 0、CD 3 6 1、CD 3 6 2、CD 3 6 3、CD 3 6 4、CD 3 6 5、CD 3 6 6、CD 3 6 7、CD 3 6 8、CD 3 6 9、CD 3 7 0、CD 3 7 1、又はそれらの任意の組み合わせが挙げられる。BD Biosciences Human CD Marker Chart、https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/campaigns/reagent-education/BD_Reagents_CDMarkerHuman_Poster.pdf からの系統特異的細胞表面抗原の例も参照されたい。

【0058】

「エクソン」という用語は、遺伝子のコード配列を含む核酸配列を指す。遺伝子は、典型的には、その間のイントロンによって分離される2つ以上のエクソンを含む。

【0059】

「イントロン」という用語は、遺伝子のコード配列に隣接している核酸配列を指す。「イントロン」という用語は、核輸送前に典型的には切除される前駆体mRNA（プレmRNA）転写物内に位置する非コード配列を包含する。プレmRNAのスプライシングは、イントロン中の配列モチーフを必要とし、スプライセオソームと呼ばれるリボ核タンパク質複合体によって媒介される。イントロンは、典型的には、5'ドナースプライス部位及び3'アクセプタースプライス部位を含み、通常は、それぞれのイントロン末端にGU及びAGジヌクレオチド、並びにイントロン内に位置する分岐点を有する。5'末端で、DNAヌクレオチドは、GT（プレmRNA中のGU）であり得、3'末端で、それらは「AG」であり得る。これらのヌクレオチドは、スプライシング部位の一部である。いくつかの実施形態では、イントロンは、それが存在するRNA又はmRNA配列からスプライシングされるか、又は除去される。スプライシング中、分岐点ヌクレオチドは、5'ドナースプライス部位への求核攻撃を開始する。次いで、上流イントロンの遊離末端は、3'アクセプタースプライス部位への第2の求核攻撃を開始し、RNAラリアットとしてイントロンを放出し、2つのエクソンを共有結合させる。イントロンは、典型的には、主に真核細胞の核内に見出される大きなリボ核タンパク質（RNP）複合体である主要なスプライセオソームによって除去される。スプライセオソームは、核内低分子RNA（snRNA）及び多数のタンパク質から組み立てられる。イントロン及び互いに対するsnRNAの塩基対形成、並びにスプライシング因子のタンパク質-タンパク質及びタンパク質-RNA相互作用は、スプライシングのためにスプライス部位を位置付ける。

【0060】

「スプライスドナー部位」という用語は、イントロンの5'末端上の核酸配列又はドメ

インを指す。一実施形態では、スプライドナー部位は、イントロン及び／又はイントロンの境界の開始を、直前のコード配列（例えば、エクソン）でマークする。

【0061】

「スプライスアクセプター部位」という用語は、イントロンの3'末端上の核酸配列又はドメインを指す。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプター部位は、イントロンの開始及びその境界を、以下のコード配列（例えば、エクソン）でマークする。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプター部位は、イントロン分岐点を含む。いくつかの実施形態では、イントロン分岐点は、スプライシングのプロセス中にイントロンの5'末端が結合される点である。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプター配列及びイントロン分岐部位は、互いに隣接している。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプター配列及びイントロン分岐部位は、分離されてもよく、例えば、分岐部位は、スプライスアクセプター配列の更に5'であってもよい。

10

【0062】

「スプライシング分岐点」という用語は、分岐RNAラリアットの形成を促進することによってスプライシングに關与するイントロンのヌクレオチドを指す。

【0063】

「スプライス部位」という用語は、本明細書に記載のイントロンの5'末端又は3'末端のいずれかに存在する核酸の配列又はドメインを指す。

【0064】

「スプライス部位変異」という用語は、前駆体メッセンジャーRNAの成熟メッセンジャーRNAへの処理中にスプライシングが行われる特定の部位に1つ以上のヌクレオチドを挿入、欠失、又は変更する遺伝子変異である。スプライシングプロセス自体は、少なくとも部分的に、各エクソンを囲むスプライドナー配列及びスプライスアクセプター配列によって制御される。これらの配列における変異は、例えば、mRNAによるイントロンDNAの大きなセグメントの保持、又はmRNAからスプライシングされるエクソン全体につながり得る。こうした変化は、潜在的に、非機能性タンパク質の産生をもたらし得る。

20

【0065】

ヌクレアーゼ / 遺伝子編集酵素

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞（例えば、HSC又はHPC）は、本明細書に記載のヌクレアーゼを使用して作製される。例示的なヌクレアーゼとしては、CRISPR/Cas分子（CRISPR/Casヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9とも称される）、TALEN、ZFN、及びメガヌクレアーゼが挙げられる。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは、本明細書に記載の系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び／又はCD312（EMR2））gRNAと組み合わせて使用される（例えば、表1～19に従う）。本開示のいくつかの態様は、本明細書に記載の遺伝子操作された細胞、例えば、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び／又はCD312（EMR2））の発現の喪失をもたらすそれらのゲノムにおける修飾、又は系統特異的細胞表面抗原を標的とする免疫療法剤によって認識されない系統特異的細胞表面抗原のバリエーション形態の発現を含む遺伝子操作された細胞を生成するための組成物及び方法を提供する。本明細書に提供されるこのような組成物及び方法は、限定されるものではないが、細胞を遺伝子操作するための好適な戦略及びアプローチ、例えば、CRISPR/Casヌクレアーゼなどのヌクレアーゼと、そのようなヌクレアーゼに結合し、かつ系統特異的細胞表面抗原の発現の喪失をもたらすゲノム修飾、又は系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び／又はCD312（EMR2））を標的とする免疫療法剤によって認識されない系統特異的細胞表面抗原のバリエーション形態の発現をもたらす細胞のゲノム内の好適な標的部位にそれらを標的とすることができる好適なRNAを使用することによるものを

30

40

50

含む。

【0066】

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若しくは前駆細胞又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、本明細書に記載のヌクレアーゼのうちのいずれかなどのヌクレアーゼを使用する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。

【0067】

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又は二本鎖DNA切断を導入するためのヌクレアーゼ、例えば、CRISPR/CasヌクレアーゼなどのRNA-RNAガイド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」若しくは「alt-NHEJ」と称されることもあるMMEJ)、又は典型的には(例えば、ヌクレオチド若しくはヌクレオチド配列挿入、欠失、逆位、又は置換を介して)ヌクレアーゼ切断の部位に、又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。

【0068】

別の例示的に好適なゲノム編集技術は、塩基エディター、例えば、特定の核酸塩基、例えば、細胞ミスマッチ修復機構を介して、CからTへのヌクレオチドの変化、又はAからGへのヌクレオチドの変化をもたらす、C又はAヌクレオチドのシトシン又はアデノシン核酸塩基を標的とし、脱アミノ化するデアミナーゼに融合されたヌクレアーゼ損傷遺伝子編集酵素又は部分的ヌクレアーゼ損傷酵素(例えば、RNAガイドCRISPR/Casタンパク質)の使用を含む、「塩基編集」である。例えば、Komor et al. Nature (2016) 533: 420 - 424、Rees et al. Nat. Rev. Genet. (2018) 19(12): 770 - 788、Anzalone et al. Nat. Biotechnol. (2020) 38: 824 - 844を参照されたい。

【0069】

更に別の例示的な好適なゲノム編集技術には、操作された逆転写酵素(RT)ドメインに融合された、触媒的に損なわれた又は部分的に触媒的に損なわれたヌクレアーゼ(例えば、RNAガイドヌクレアーゼ、例えば、CRISPR/Casヌクレアーゼ)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、Anzalone et al. Nature (2019) 576(7785): 149 - 157を参照されたい。

【0070】

Cas9分子

いくつかの実施形態では、ゲノム編集技術の使用は、いくつかの実施形態では、例えば、塩基編集又はプライム編集のために、触媒的に損なわれるか、又は部分的に触媒的に損なわれ得る、好適なRNAガイドヌクレアーゼの使用を特徴とする。好適なRNAガイドヌクレアーゼの例としては、Cas9などのCRISPR/Casヌクレアーゼ、又はCas12a/Cpf1などの他のCasヌクレアーゼが挙げられる。

【0071】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される系統特異的細胞表面抗原(例えば、C

10

20

30

40

50

D 3 3 (S i g l e c - 3)、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び/又はC D 3 1 2 (E M R 2)) g R N Aは、C a s 9分子と複合体化される。様々なC a s 9分子が使用され得る。いくつかの実施形態では、系統特異的細胞表面抗原(例えば、C D 3 3 (S i g l e c - 3)、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)、及び/又はC D 3 1 2 (E M R 2))において、g R N A / C a s 9分子複合体を標的ドメインに標的とするための所望のP A M特異性を有するC a s 9分子が選択される。いくつかの実施形態では、細胞を遺伝子操作することは、1つ以上(例えば、1、2、3つ以上)のC a s 9分子を細胞に導入することを含む。

【0072】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるC D 3 3 g R N Aは、C a s 9分子と複合体化される。様々なC a s 9分子が使用され得る。いくつかの実施形態では、C D 3 3中の標的ドメインに対してg R N A / C a s 9分子複合体を標的とする所望のP A M特異性を有するC a s 9分子が選択される。いくつかの実施形態では、細胞を遺伝子操作することは、1つ以上(例えば、1、2、3つ以上)のC a s 9分子を細胞に導入することを含む。

10

【0073】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるC L L - 1 g R N Aは、C a s 9分子と複合体化される。様々なC a s 9分子が使用され得る。いくつかの実施形態では、C L L - 1中の標的ドメインに対してg R N A / C a s 9分子複合体を標的とする所望のP A M特異性を有するC a s 9分子が選択される。いくつかの実施形態では、細胞を遺伝子操作することは、1つ以上(例えば、1、2、3つ以上)のC a s 9分子を細胞に導入することを含む。

20

【0074】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるC D 1 2 3 g R N Aは、C a s 9分子と複合体化される。様々なC a s 9分子が使用され得る。いくつかの実施形態では、C D 1 2 3中の標的ドメインに対してg R N A / C a s 9分子複合体を標的とする所望のP A M特異性を有するC a s 9分子が選択される。いくつかの実施形態では、細胞を遺伝子操作することは、1つ以上(例えば、1、2、3つ以上)のC a s 9分子を細胞に導入することを含む。

【0075】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるC D 3 2 7 (S i g l e c - 6) g R N Aは、C a s 9分子と複合体化される。様々なC a s 9分子が使用され得る。いくつかの実施形態では、C D 3 2 7 (S i g l e c - 6)中の標的ドメインに対してg R N A / C a s 9分子複合体を標的とする所望のP A M特異性を有するC a s 9分子が選択される。いくつかの実施形態では、細胞を遺伝子操作することは、1つ以上(例えば、1、2、3つ以上)のC a s 9分子を細胞に導入することを含む。

30

【0076】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるC D 3 1 2 (E M R 2) g R N Aは、C a s 9分子と複合体化される。様々なC a s 9分子が使用され得る。いくつかの実施形態では、C D 3 1 2 (E M R 2)中の標的ドメインに対してg R N A / C a s 9分子複合体を標的とする所望のP A M特異性を有するC a s 9分子が選択される。いくつかの実施形態では、細胞を遺伝子操作することは、1つ以上(例えば、1、2、3つ以上)のC a s 9分子を細胞に導入することを含む。

40

【0077】

様々な種のC a s 9分子を、本明細書に記載される方法及び組成物に使用することができる。いくつかの実施形態では、C a s 9分子は、S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s (S p C a s 9)、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s (S a C a s 9)、又はS t r e p t o c o c c u s t h e r m o p h i l u s (S t C a s 9)のものであるか、又はそれらに由来する。追加の好適なC a s 9分子としては、黄色ブドウ球菌、N e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s (N m C a s 9)、A c i d o

50

vorax 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 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*, *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、若しくは *Verminephrobacter eiseniae* のもの、又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では、そのような Cas9ヌクレアーゼの触媒的に損なわれた、又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、及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。

【0078】

いくつかの実施形態では、Cas9分子は、天然に存在するCas9分子である。いくつかの実施形態では、Cas9分子は、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、又は参照によりその全体で本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2015/157070号の表50の配列と異なる、操作、改変、又は修飾されたCas9分子である。いくつかの実施形態では、Cas9分子は、Cpf1又はその断片若しくはバリエーションを含む。

【0079】

天然に存在するCas9分子は、典型的には、2つのローブ：認識(REC)ローブ及びヌクレアーゼ(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

10

20

30

40

50

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。

【0080】

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、及び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及びアルギニンリッチ領域であり、*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又は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及び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ドメイン又はその一部はまた、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。

10

【0081】

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)、及び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、及び909~1098において、3つの分割RuvCモチーフ(当該技術分野ではしばしば、RuvCIドメイン、又はN末端RuvCドメイン、RuvCIIドメイン、及びRuvCIIIドメインと一般的に称される、RuvCI、RuvCII、及びRuvCIII)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、RuvCII-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。

20

30

【0082】

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

【0083】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCas9分子は、標的部位に、又はその直接近位にヌクレアーゼ活性、例えば、二本鎖切断活性を有する。いくつかの実施形態では、Cas9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、Cas9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)を参照のこと。酵素のRuvC及びHNH触媒ドメイン内の1つ以上の変異が、Cas9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、Cas9分子は、第2のドメイン、例えば、DNA又はクロマチンを修飾するドメイン、例えば、デアミナーゼ又はデメチラーゼドメインに融合される。いくつかのそのような実施形態では、Cas9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。

40

50

【0084】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9分子又は Cas/gRNA複合体）は、相同性指向修復（HDR）のための鋳型と一緒に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される Cas9分子は、HDR鋳型なしで投与される。

【0085】

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、Cas9分子が使用される。いくつかの実施形態では、Cas9分子は、強化特異性 Cas9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、Cas9分子は、高忠実度 Cas9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。

10

【0086】

様々な Cas9分子が、当該技術分野で既知であり、様々な供給源から入手され、酵素の1つ以上の活性又は特異性を調節するように操作/修飾され得る。いくつかの実施形態では、Cas9分子は、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、Cas9分子は、Cas9分子が操作/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、Cas9分子は、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。

20

【0087】

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又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、Cas9分子をコードするヌクレオチド配列が更に修飾される。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、Cas9分子をコードするヌクレオチド配列は、エンドヌクレアーゼの PAM認識を改変するように修飾される。例えば、Cas9分子 SpCas9は、PAM配列 NGGを認識し、一方、エンドヌクレアーゼ（例えば、VQR SpCas9、EQR SpCas9、VRE SpCas9）の1つ以上の修飾を含む SpCas9の不完全バリエーションは、PAM配列 NGA、NGAG、NGCGを認識し得る。修飾された Cas9分子の PAM認識は、Cas9分子が、修飾されていない Cas9分子と比較して、より多くの潜在的な PAM配列を認識する場合、「不完全」とみなされる。例えば、Cas9分子 SaCas9は、PAM配列 NNGRRTを認識する一方で、1つ以上の修飾を含む SaCas9の不完全なバリエーション（例えば、KKH SaCas9）は、PAM配列 NNNRRTを認識し得る。一例は、Cas9分子 FnCas9は、PAM配列 NNGを認識する一方で、エンドヌクレアーゼの1つ以上の修飾を含む FnCas9の不完全なバリエーション（例えば、RHA FnCas9）は、PAM配列 YGを認識し得る。一例は、Cas9分子は、置換変異 S542R及び K607Rを含む Cpf1エンドヌクレアーゼであり、PAM配列 TYCVを認識する。一例は、Cas9分子は、置換変異 S542R、K607R、及び N552Rを含む Cpf1エンドヌクレアーゼであり、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。

30

40

【0088】

いくつかの実施形態では、1つより多く（例えば、2つ、3つ、又はそれ以上）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、Cas9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

50

つは、*Streptococcus pyogenes*に由来する。いくつかの実施形態では、Cas 9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Cas 9分子は、*Streptococcus pyogenes*ではない生物に由来する。

【0089】

いくつかの実施形態では、Cas 9分子は、塩基エディターである。いくつかの実施形態では、塩基エディターが、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)）の発現の喪失、又は免疫療法によって標的化されない系統特異的細胞表面抗原のバリエーションの発現をもたらす、ゲノム修飾を作り出すために使用される。塩基エディターエンドヌクラーゼは、概して、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なCas 9分子を含む。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 9分子は、「死Cas」又は「dCas9」と称される。いくつかの実施形態では、触媒的に不活性なCas 9分子は、低減した活性を有し、例えば、ニックラーゼ (nCAs と称される) である。いくつかの実施形態では、エンドヌクラーゼは、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、エンドヌクラーゼは、アデニン塩基エディター (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、エンドヌクラーゼは、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Cas 9分子は、低減した活性を有し、nCAs 9である。いくつかの実施形態では、触媒的に不活性なCas 9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、Cas 9分子は、アデニン塩基エディター (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Cas 9分子 (dCas9) を含む。いくつかの実施形態では、Cas 9分子は、アデニン塩基エディター (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nCAs 9を含む。いくつかの実施形態では、Cas 9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、Cas 9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nCAs 9を含む。

【0090】

塩基エディターの例としては、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、VRER-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、VRER-ABE、Sa(KKH)-ABE、及びCRISPR-SKIPが挙げられる。塩基エディターの追加の例は、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2018/0312825(A1)号、米国公開第2018/0312828(A1)号、及びPCT公開第WO2018/165629(A1)号で見出すことができる。

【0091】

いくつかの実施形態では、塩基エディターは、標的部位での塩基除去修復を阻害し、細

胞ミスマッチ修復を誘導するよう更に修飾されている。本明細書に記載される Cas 9 分子のいずれかは、Gamドメイン（バクテリオファージ Mutanパク質）に融合されて、分解及びエクソヌクラーゼ活性から Cas 9 分子を保護することができる。例えば、Eid et al. *Biochem. J.* (2018) 475 (11): 1955 - 1964 を参照されたい。

【0092】

いくつかの実施形態では、Cas 9 分子は、Cas エンドヌクラーゼのクラス 2 V 型に属する。クラス 2 の V 型 Cas エンドヌクラーゼは、V - A 型、V - B 型、V - C 型、及び 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) 24: 882 - 892 を参照されたい。いくつかの実施形態では、Cas 分子は、Cpf1 (Cas 12a) ヌクラーゼなどの V - A 型 Cas エンドヌクラーゼである。いくつかの実施形態では、Cas 9 分子は、C2c1 エンドヌクラーゼなどの V - B 型 Cas エンドヌクラーゼである。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、Cas 分子は、MAD7 (商標) である。あるいは、又は加えて、Cas 9 分子は、Cpf1 ヌクラーゼ又はそのバリエーションである。当業者によって理解されるように、Cpf1 ヌクラーゼはまた、Cas 12a と呼んでもよい。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、本明細書に記載される組成物又は方法は、Provetella spp. 又は Francisella spp.、Acidaminococcus sp. (AsCpf1)、Lachnospiraceae bacterium (LpCpf1)、又は Eubacterium rectale に由来する Cpf1 ヌクラーゼを含むか、又は宿主細胞は、それを発現する。いくつかの実施形態では、Cpf1 ヌクラーゼをコードするヌクレオチド配列は、宿主細胞における発現に最適化されたコドンであってもよい。いくつかの実施形態では、Cpf1 エンドヌクラーゼをコードするヌクレオチド配列は、タンパク質の活性を変化させるために更に修飾される。

【0093】

CRISPR / Cas ヌクラーゼの天然に存在するバリエーション及び修飾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 又はニック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、及び改善されたヌクラーゼ活性を有する 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。いくつかの実施形態では、Cas 分子 (例えば、Cas 9 又は Cas 12a) の触媒的に不活性なバリエーションは、本明細書に記載される方法に従って使用される。Cpf1 (Cas 12a) の触媒的に不活性なバリエーションは、dCas 12a と呼ばれてもよい。本明細書に記載されるように、Cpf1 の触媒的に不活性なバリエーションは、機能ドメインに融合されて、塩基エディターを形成してもよい。例えば、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 9 分子は、dCas 9 である。いくつかの実施形態では、エンドヌクラーゼは、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 dCas 12a を含む。いくつかの実施形態では、Cas 9 分子は、アデニン塩基エディター (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 12a を含む。いくつかの実施形態では、Cas 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 dCas 12a を含む。

【0094】

あるいは、又は加えて、Cas 9 分子は、Cas 14 エンドヌクラーゼ又はそのバリエーションである。Cas 14 エンドヌクラーゼは、古細菌に由来し、サイズが小さい傾向がある (例えば、400 ~ 700 アミノ酸)。更に、Cas 14 エンドヌクラーゼは、

P A M 配列を必要としない。例えば、H a r r i n g t o n e t a l . S c i e n c e (2 0 1 8) を参照されたい。

【 0 0 9 5 】

本明細書に記載されるC a s 9分子のいずれかは、所望の時点で、C a s 9分子の発現及び/又は活性のレベルを制御するように調節されてもよい。例えば、細胞周期の特定相の間にC a s 9分子の発現及び/又は活性のレベルを増加させることが有利であり得る。細胞周期のG 1相の間に相同性指定修復のレベルが低減されることが実証されており、したがって、S相、G 2相、及び/又はM相の間のC a s 9分子の発現及び/又は活性のレベルの増加は、C a s エンドヌクレアーゼ編集後の相同性指定修復を増加させ得る。いくつかの実施形態では、C a s 9分子の発現及び/又は活性のレベルは、細胞周期のS期、G 2期、及び/又はM期の間に増加する。一例では、C a s 9分子は、ヒトゲミニンのN末端領域に融合されている。例えば、G u t s c h n e r e t a l . C e l l R e p . (2 0 1 6) 1 4 (6) : 1 5 5 5 - 1 5 6 6 を参照されたい。いくつかの実施形態では、C a s 9分子の発現及び/又は活性のレベルは、G 1期の間に低減する。一例では、C a s 9分子は、G 1期の間に活性が低減するように修飾される。例えば、L o m o v a e t a l . S t e m C e l l s (2 0 1 8) を参照されたい。

10

【 0 0 9 6 】

あるいは、又は加えて、本明細書に記載されるC a s 9分子のいずれかは、エピジェネティック修飾剤(例えば、クロマチン修飾酵素、例えば、DNAメチラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ)に融合されてもよい。例えば、K u n g u l o v s k i e t a l . T r e n d s G e n e t . (2 0 1 6) 3 2 (2) : 1 0 1 - 1 1 3 を参照されたい。エピジェネ修飾剤に融合されたC a s 9分子は、「エピエフェクター」と呼ばれ、一時的及び/又は一時的なエンドヌクレアーゼ活性を可能にし得る。いくつかの実施形態では、C a s 9分子は、クロマチン修飾酵素に融合されたd C a s 9である。

20

【 0 0 9 7 】

塩基エディター

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細胞又は細胞集団は、塩基編集技術を使用して産生される。上記のように、塩基編集は、塩基エディター、例えば、特定の核酸塩基、例えば、細胞ミスマッチ修復機構を介して、CからTへのヌクレオチドの変化、又はAからGへのヌクレオチドの変化をもたらす、C又はAヌクレオチドのシトシン又はアデノシン核酸塩基を標的とし、脱アミノ化するデアミナーゼに融合されたヌクレアーゼ損傷遺伝子編集酵素又は部分的ヌクレアーゼ損傷酵素(例えば、RNAガイドCRISPR/C a s タンパク質)の使用を含む。例えば、K o m o r e t a l . N a t u r e (2 0 1 6) 5 3 3 : 4 2 0 - 4 2 4 、 R e e s e t a l . N a t . R e v . G e n e t . (2 0 1 8) 1 9 (1 2) : 7 7 0 - 7 8 8 、 A n z a l o n e e t a l . N a t . B i o t e c h n o l . (2 0 2 0) 3 8 : 8 2 4 - 8 4 4 を参照されたい。

30

【 0 0 9 8 】

本明細書に記載されるように、塩基編集技術を使用して、マルチプレックス塩基編集を達成することができる。例えば、いくつかの実施形態では、マルチプレックス塩基編集の方法は、本明細書に記載されるように、(i) 細胞を提供することと、(i i) 細胞に、C D 3 3 (S i g l e c - 3) 、 C L L - 1 、 C D 1 2 3 、 C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 、 及び/又はC D 3 1 2 (E M R 2) を標的とする1つ以上のガイドRNA (g R N A) 、 (b) C D 3 3 (S i g l e c - 3) 、 C L L - 1 、 C D 1 2 3 、 C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 、 及び/又はC D 3 1 2 (E M R 2) を標的とする1つ以上のg R N A 、 並びに(c) 1つ以上のg R N A と結合する塩基エディターを導入することと、を含み得、1つ以上のg R N A は、異なる標的ドメイン内の編集事象を提供し、それによって遺伝子操作された細胞を産生するように構成されている。特に、マルチプレックス塩基編集を使用して、1つ以上の標的系統特異的細胞表面抗原(例えば、C D 3 3 (S i g l e c - 3) 、 C L L - 1 、 C D 1 2 3 、 C D 3 2 7 (S i g l e c - 6) 、 及び/又はC D 3 1 2 (E M R 2)) 遺伝子を修飾することができる。特に、マルチプレックス塩基編集を

40

50

使用して、複数の標的系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2））遺伝子を修飾することができる。特に、マルチプレックス塩基編集は、転座のいかなるリスクもなしで使用することができる。ある特定の実施形態では、マルチプレックス塩基編集は、転座のいかなるリスクもなしに、塩基エディター及びCRISPRヌクレアーゼ、例えば、Cas9又はCas12aヌクレアーゼを含むCRISPRヌクレアーゼを利用することによって、複合化すること含み得る。

【0099】

いくつかの実施形態では、Cas9分子は、塩基エディターである。いくつかの実施形態では、塩基エディターが、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2））の発現の喪失、又は免疫療法によって標的化されない系統特異的細胞表面抗原のバリエーションの発現をもたらす、ゲノム修飾を作り出すために使用される。いくつかの実施形態では、塩基エディターを使用して、CD33の発現の喪失、又は免疫療法により標的化されないCD33バリエーションの発現をもたらすゲノム修飾が作製される。いくつかの実施形態では、塩基エディターを使用して、CLL-1の発現の喪失、又は免疫療法により標的化されないCLL-1バリエーションの発現をもたらすゲノム修飾が作製される。いくつかの実施形態では、塩基エディターを使用して、CD123の発現の喪失、又は免疫療法により標的化されないCD123バリエーションの発現をもたらすゲノム修飾が作製される。いくつかの実施形態では、塩基エディターを使用して、CD327（Siglec-6）の発現の喪失、又は免疫療法により標的化されないCD327（Siglec-6）バリエーションの発現をもたらすゲノム修飾が作製される。いくつかの実施形態では、塩基エディターを使用して、CD312（EMR2）の発現の喪失、又は免疫療法により標的化されないCD312（EMR2）バリエーションの発現をもたらすゲノム修飾が作製される。

【0100】

いくつかの実施形態では、塩基エディターを使用して、細胞中の系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2））の活性を低減する編集事象（例えば、ゲノム修飾の作製）を作製する。いくつかの実施形態では、塩基エディターを使用して、細胞中の系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2））をコードする核酸の発現レベルを低減する編集事象（例えば、ゲノム修飾の作製）を作製する。

【0101】

いくつかの実施形態では、塩基エディターを使用して、細胞中の完全長系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2））RNAの発現を無効化する編集事象（例えば、ゲノム修飾の作製）を作製する。いくつかの実施形態では、塩基エディターを使用して、細胞中の完全長系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2））タンパク質の発現を無効化する編集事象（例えば、ゲノム修飾の作製）を作製する。

【0102】

いくつかの実施形態では、細胞は、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2））RNAの切断型を発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2））タンパク質の切断型を発現する。

10

20

30

40

50

【0103】

いくつかの実施形態では、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)）RNAの切断型は、非編集細胞における完全長系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)）RNAのレベル以上のレベルで発現される。いくつかの実施形態では、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)）タンパク質の切断型は、非編集細胞における完全長系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)）タンパク質のレベル以上のレベルで発現される。

10

【0104】

いくつかの実施形態では、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)）RNAの切断型の機能又は活性は、損なわれるか、又は無効化される。いくつかの実施形態では、系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)）タンパク質の切断型の機能又は活性は、損なわれるか、又は無効化される。いくつかの実施形態では、損なわれるか、又は無効化される系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)）RNAの切断型の機能又は活性は、抗体又はキメラ抗原受容体 (CAR) に結合することを含む。

20

【0105】

塩基エディターエンドヌクレアーゼは、概して、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なCas9分子を含む。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Cas9分子は、「死Cas」又は「dCas9」と称される。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。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ー (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ー (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ー (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。

30

40

50

【0106】

いくつかの実施形態では、塩基エディターは、シトシン塩基エディター（CBE）である。いくつかの実施形態では、CBEは、CBE1、CBE2、CBE3、又はCBE4である。いくつかの実施形態では、CBEは、nCAs9-2xUGI、BE4-rAPOBEC1、BE4-rAPOBEC1 K34A H122A、BE4-PpAPOBEC1、BE4-PpAPOBEC1 R33A、BE4-PpAPOBEC1 H122A、BE4-RrA3F、BE4-AmAPOBEC1、及びBE4-SsAPOBEC3Bからなる群から選択される。

【0107】

いくつかの実施形態では、塩基エディターは、アデニン塩基エディター（ABE）である。いくつかの実施形態では、ABEは、ABE1、ABE2、ABE3、ABE4、ABE5、ABE6、ABE7、又はABE8である。いくつかの実施形態では、ABEは、ABE7.10-m、ABE7.10-d、ABE8.8-m、ABE8.8-d、ABE8.13-m、ABE8.13-d、ABE8.17-m、ABE8.17-d、ABE8.20-m、及びABE8.20-dからなる群から選択される。

10

【0108】

いくつかの実施形態では、塩基エディターとしては、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、VRER-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、VRER-ABE、Sa(KKH)-ABE、及びCRISPR-SKIPが挙げられる。

20

【0109】

塩基編集体の追加の例は、例えば、米国公開第2018/0312825(A1)号、米国公開第2018/0312828(A1)号、及びPCT公開第WO2018/165629(A1)号、Yuet al. Nat Commun. (2020) 11(1): 2052、及びGaudelli et al. Nat Biotechnol. (2020) 38(7): 892-900に見出すことができ、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0110】

例示的なabe8__20m配列を以下に提供する。

atgtccgaagtcgagttttcccatgagtgactggatgagacacgcattgactctcgcaaagaggggctcg
agatgaacgcgaggtgcccgtgggggcagtgactcgtgctcaacaatcgcgtaatcggcgaaggttgg
aatagggcaatcggactccacgacccactgcacatgcggaatcatggcccttcgacagggagggc
ttgtgatgcagaattatcgactttatgatgacgacgctgtactcgacggttgaaccttgcgtaatgtgcgc
gggagctatgattcactcccgcattggacgagttgtattcgggtgttcgcaacgccaagacgggtgccg
caggttactgatggacgtgctgcatcatccaggcatgaaccaccgggtagaaatcacagaaggcat
attggcggacgaatgtgcggcgtgtttgtgctgttttttcgcatgccagggcgggtctttaacgcca
gaaaaaagcacaatcctctactgactctggtggttcttctggtggttctagcggcagcgcgagactcccg
ggacctcagagtcggccacacccgaaagttctggtggttcttctggtggttctgacaagaagtacagc
atcggcctggccatcggcaccaactctgtgggctgggcccgtgatcaccgacgagtacaaggtgccca
gcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccct
gctgttcgacagcggcgaaacagccgaggccaccggctgaagagaaccgccagaagaagatacac
cagacggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgac
agcttcttccacagactggaagagtccttctggtggaagaggataagaagcacgagcggcacccca
tcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaaccaccatctaccacctgagaaa
gaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggctgatctatctggccctggcccacatgatc
aagttccggggccacttctgatcgagggcgacctgaaccccgacaacagcgacgtggacaagctgt

40

50

tcatccagctgggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtgga
 cgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctg
 cccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggctgacccccaaactt
 caagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacga
 cctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagctacgccgacctgtttctggccgccaagaacctgt
 ccgacgccatcctgtctgagcgacatcctgagagtgaaacccgagatcaccaaggccccctgagcgc
 ctctatgatcaagagatacgcagcagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctcgtgcggcag
 cagctgctgagaagtacaaagagattttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattga
 cggcggagccagccaggaagagttctacaagttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcacc
 gaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggc
 agcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttacc
 attcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgacctccgcacccccactacgtgggccc
 ctctggccaggggaaaacagcagattcgccctggatgaccagaaagagcggaggaaacccatcacccccg
 gaacttcgaggaagtgggtggacaaggcgcttccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaacttc
 gataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacagcctgctgtacgagcttccaccgtgta
 taacgagctgaccaaagtgaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccgccttctgagcggcggag
 cagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgacctgaaagcagctgaaag
 aggactacttcaagaaaaatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaaagatcggttcaac
 gcctccctgggacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttctggacaatgagga
 aaacgaggacattctggaagatatacgtgctgacctgacactgtttgaggacagagagatgatcgag
 gaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagtgatgaagcagctgaaagcggcggagat
 acaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccgggacaagcagctccggcaaga
 caatcctggatttctgaagtccgacggcttcgccaacagaaaacttcatgcagctgatccacgacgac
 agcctgacctttaaagaggacatccagaaagcccagggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagc
 acattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaagtggtgga
 cgagctcgtgaaagtgatgggcccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaa
 ccagaccaccagaaagggacagaaagacagccgagagaaatgaagcggatcgaaaggggatca
 aagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgagaagc
 tgtacctgtactacctgcagaatgggcccggatatactgctggaccaggaactggacatcaaccggctg
 tccgactacgatgtggaccatacgtgacctcagagctttctgaaaggacgactccatcgacaacaaggt
 gctgaccagaagcgcacaagaaccggggcaagagcgcacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaaaga
 gatgaaagactactggcggcagctgctgaaacgccaagctgattaccagagaaagttcgacaatctg
 accaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctgggtg
 gaaaccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccgatgaacactaagtacgacg
 agaatgacaagctgatccgggaagtgaagtgatcacctgaagtccaagctgggtgtccgatttccgg
 aaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctgaa
 cggcgtcgtgggaaccgcccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcaggttcgtgtacggcgac
 tacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgcagcaggaatcgccaaggctaccgcc
 aagtacttcttctacagcaacatcatgaactttttcaagaccgagattacctggccaacggcgagatc
 cggaaagcggcctctgatcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataaggccgggat
 tttgccaccgtgcggaaagtgctgagcatgccccaaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcaga
 caggcggcttcagcaaaagagtctatcctgcccaagaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaa
 ggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctgggtggg
 ccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtaagagctgctggggatcacccatcat
 ggaaagaagcagcttcgagaagaatccatcgactttctggaagccaagggtacaaagaagtgaaa
 aaggacctgatcaagctgcctaagtactcctgttcgagctggaaaacggccggaagagaaatgct
 ggccctctgccggcgaactgcagaagggaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttctgt
 acctggccagccactatgagaagctgaagggtcccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgt
 ggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcagagttctccaagagagtgatc
 ctggccgacgctaactctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagag

10

20

30

40

50

agcaggccgagaatatcatccacctgtttacctgaccaatctgggagccccctgccgccttcaagtact
 ttgacaccaccatcgaccggaagaggtagaccagcaccaaagagggtgctggacgccaccctgatcca
 ccagagcatcaccggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcagctgggaggtgacgagggagct
 gataagcgcaccgcccgatgggtccgagttcgaaagccccaagaagaagaggaaagtc

【 0 1 1 1 】

例示的な p p a b o b e c 1 - o r f - r 3 3 a 配列を以下に提供する。

atgacctctgagaagggccctagcacaggcgacccccaccctgcggcggagaatcgagagctgggag
 ttcgacgtgttctacgaccctagagaactggccaaggaaacctgcctgctgtacgagatcaagtggg
 catgagcagaaagatctggcggagctctggcaagaacaccaccaaccacgtggaagtgaatttcac
 aagaagttcaccagcgagagaagggtccacagcagcatcagctgcagcatcacctggttcctgagct 10
 ggtccccttctggtggaatgcagccaggccatcagagagttcctgagccaacacccgggagtgacact
 ggtgatctacgtggccagactgttctggcacatggaccagagaaacagacagggcctgagagatctg
 gtcaacagcggcgtgactatccagatcatgcccggcagcgagtactaccactgttggcggaaacttctg
 gaactaccccccgcgatgaggcccactggcctcagtagcctcctctgtggatgatgctgtacgcc
 tggaaactgcactgcatcctgtctctgctccatgtctgaagatctctagaagatggcagaaccacc
 tggccttcttcagactgcacctgcagaattgccactaccagaccatccccccacatcctgctggcta
 caggcctgatccacccttctgtgacctggagacttaagagcggaggatctagcggcggctctagcgg
 atctgagacacctggcacaagcgagctctgccacacctgagagtagcggcggatcttctgggtgctctg
 acaagaagtacagcatcggcctggccatcggcaccaactctgtgggctgggcccgtgatcaccgacga
 gtacaaggtgccagcaagaaattcaagggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaa 20
 cctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccgagggccacccggctgaagagaaccgc
 cagaagaagatacaccagacggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatg
 gccaaaggtggacgacagcttcttcacagactggaagagtccttccctgggtggaagaggataagaagc
 acgagcggcacccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtacccaccat
 ctaccacctgagaaagaaactgggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggtgatctatctggcc
 ctggcccacatgatcaagttccggggccacttccctgatcgaggcgacctgaaccccgacaacagcg
 acgtggacaagctgttcatccagctgggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaac
 gccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaat
 ctgatcggccagctgcccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgg
 gcctgacccccaaacttcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaagga 30
 cacctacgacgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtagcggacctgtttctg
 gccgccaagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaaacccgagatcacca
 aggccccctgagcgcctctatgatcaagagatacagcagcaccaccaggacctgacctgctgaa
 agctctcgtgcggcagcagctgctgagaagtacaagagatcttcttcgaccagagcaagaacggct
 acgcccgtacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagttcatcaagccatcctgga
 aaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcg
 gaccttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcgg
 caggaagatTTTTTaccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcat
 ccctactacgtgggccctctggccaggggaaaacagcagattcgctggatgaccagaaagagcgag
 gaaaccatcacccttggaaacttcgaggaaagtggtggacaaggcgcttccgcccagagcttcatcg 40
 agcggatgaccaacttcgataagaacctgcccacgagaaggtgctgcccacgacagcctgctgta
 cgagtacttaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaatacgtgaccgaggggaatgagaaagccc
 gccttccctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtga
 ccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaaatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggc
 gtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaagga
 ctctctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgacctgacactgtttgagg
 acagagagatgatcgaggaaacggctgaaaacctatgccacctgttcgacgacaaagtgatgaagca
 gctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccggga
 caagcagtcggcaagacaatcctggatttctgaagtcggacggcttcgccaacagaaacttcatgc
 agctgatccacgacgacagcctgacctttaaagaggacatccagaaagcccagggtgtccggccaggg 50

10
20
30
40
50

cgatagcctgcacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcag
acagtgaaggtggtggacgagctcgtgaaagtgatggccggcacaagccccgagaacatcgtgatc
gaaatggccagagagaaccagaccaccagaagggacagaagaacagccccgagagagaatgaagcg
gatcgaagagggcatcaaagagctgggacagccagatcctgaaagaacacccccgtggaaaacacca
gctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggaggatgtgtacgtggaccaggaa
ctggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccataatcgtgcctcagagctttctgaaggacga
ctccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgccctc
cgaagaggtcgtgaaagaagatgaaagaactactggcggcagctgctgaacgccaaagctgattaccag
agaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagagggcggcctgagcgaactggataaggccgggcttc
atcaagagacagctggtggaaacccggcagatcacaagcagctggcacagatcctggactcccgga 10
tgaacactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcacctgaagtcaa
gctggtgtccgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacg
cccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccttaagctggaaag
cgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaa
atcggaaggctaccgccaagtacttcttctacagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattacc
ctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtg
tgggataaggccgggattttgccaccgtgcggaagtgctgagcatgccccaaagtgaatatcgtga
aaaagaccgaggtgcagacagggcggcttcagcaaagagtctatcctgcccaagaggaacagcgata
agctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtgg
cctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaaga 20
gctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagcca
agggtacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtaactcctgttcgagctggaa
aacggccggaagagaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggcctgcc
tcaaataatgtgaacttctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccgaggataa
tgagcagaaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagc
gagttctccaagagagtgatcctggccgacgctaacttggaacaagtgctgtccgcctacaacaagca
ccgggataagcccatcagagagcagggccgagaatatcatccacctgtttacctgaccaatctgggag
cccctgccgccttcaagtaactttgacaccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaagaggt
gctggacgccaccctgatccaccagagcatcacggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcag
ctgggaggtgactctggtggaagcggaggatctggcggcagcaccaatctgagcgacatcatcgaga 30
aagagacaggcaagcagctggtcatccaagagtccatcctgatgctgcctgaagaggtggaagaagt
gatcggcaacaagcccagctccgacatcctggtgcacaccgcctacgatgagagcaccgacgagaac
gtgatgctgctgacctctgacgccccctgagtacaagccttgggctctcgtgatccaggacagcaacgg
cgagaacaagatcaagatgctgagcggcggctctggtggctctggcggatctacaacctgtccgat
attattgagaagaaccgggaaacagctcgtgattcaagagtctattctcatgctcccggaagaagt
cgaggaagtcattggaacaagcctgagagcgatattctggtccatacagcctacgacgagtctaccg
atgagaatgtcatgctcctcaccagcagcgtcccaggtataagccatgggcacttgtcattcaggac
tccaatggggaaaacaaaatcaaatgctcccaagaaaaaacgcaaggtg

【 0 1 1 2 】

例示的な p p a b o b e c 1 - o r f - w t 配列を以下に提供する。

atgacctctgagaagggccctagcacaggcgacccccacctgcgccggagaatcgagagctgggag
ttcgacgtgttctacgacctagagaactgagaaaggaaacctgcctgctgtacgagatcaagtggg
catgagcagaaagatctggcggagctctggcaagaacaccaccaaccacgtggaagtgaatttcac
aagaagttcaccagcgagagaaggttccacagcagcatcagctgcagcatcacctggttctctgagct
ggtccccttctgggaatgcagccaggccatcagagagttcctgagccaacacccccggagtgacact
ggtgatctacgtggccagactgttctggcacatggaccagagaaacagacagggcctgagagatctg
gtcaacagcggcgtgactatccagatcatcgggccagcagtaactaccactgttggcggaaacttctg
gaactacccccccggcgatgaggcccactggcctcagtaacctcctctgtggatgatgctgtacgcc
tggaaactgcactgcatcatcctgtctctgctccatgtctgaagatctctagaagatggcagaaccac
tggccttcttcagactgcacctgcagaattgccactaccagacccatccccccccacatcctgctggcta 40
50

caggcctgatccacccttctgtgacctggagacttaagagcggaggatctagcggcggctctagcgg
atctgagacacctggcacaagcgagtctgccacacctgagagtagcggcggatcttctggtggtctg
acaagaagtacagcatcggcctggccatcggcaccaactctgtgggctgggcccgtgatcaccgacga
gtacaagggtgccagcaagaaattcaagggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaa
cctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccgaggccaccggctgaagagaaccgc
cagaagaagatacaccagacggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatg
gccaagggtggacgacagcttctccacagactggaagagtccctcctgggtggaagaggataagaagc
acgagcggcaccctcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtagccaccat
ctaccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgaggctgatctatctggcc
ctggcccacatgatcaagttccggggccacttctgatcgagggcgacctgaaccccgacaacagcg
acgtggacaagctgttcacagctgggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccctcaac
gccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaat
ctgatcggccagctgcccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgg
gcctgaccccaacttcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaactgcagctgagcaagga
cacctacgacgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtagccgacctgtttctg
gccgccaagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgcacatcctgagagtgaacaccgagatcacca
aggccccctgagcgcctctatgatcaagagatacagcagcaccaccaggacctgacctgctgaa
agctctcgtgcccagcagctgacctgagaagtagaaagagattttcttcgaccagagcaagaaccgct
acgcccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagttcatcaagccatcctgga
aaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcg
gaccttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcgg
caggaagattttaccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttcgcat
cccctactacgtgggcccctctggccaggggaaaacagcagattcgccctggatgaccagaaagagcga
gaaaccatcacccctggaacttcgaggaagtgggtggacaaggggcgttccgcccagagcttcatcg
agcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaagggtgctgcccaagcacagcctgctgta
cgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaaagtgaatacgtgaccgagggaatgagaaagccc
gccttcttgagcggcagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtga
ccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaaaatcgagtgttcgactccgtggaaatctccggc
gtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaagga
cttcttgacaatgaggaaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgacctgacactgtttgagg
acagagagatgatcgaggaaccggctgaaaacctatgccacctgttcgacgacaaagtgatgaagca
gctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccggga
caagcagtcggcaagacaatcctggatttctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgc
agctgatccacgacgacagcctgacctttaaagaggacatccagaaagcccagggtgtccggccaggg
cgatagcctgcacgagcacattgccaatctggccggcagccccgcatttaagaagggcacctctgag
acagtgaagggtggtagcagctcgtgaaagtgatgggcccggcacaagcccgagaacatcgtgatc
gaaatggccagagagaaccagaccaccagaaaggacagaagaacagcccggcagagagaatgaagcg
gatcgaagagggcacaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtgaaaacacca
gctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcccggatagtactgtgaccaggaa
ctggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccataatcgtgcctcagagctttctgaaggacga
ctccatcgacaacaagggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgccctc
cgaagaggctcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaaagctgattaccag
agaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttc
atcaagagacagctggtggaaaccggcgagatcacaagcagctggcacagatcctggactccggga
tgaacactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaagtgatcacctgaagtccaa
gctgggtgtccgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgagatcaacaactaccaccag
cccacgacgcctacctgaacgcctcgtgggaaccgcccctgatcaaaaagtacctaaagctggaaag
cgagttcgtgtacggcgcactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcagcagga
atcggcaaggctaccgccaagtagtcttctacagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattacc
ctggccaacggcagatccggaagcggcctctgatcgagacaaaccggcgaaaccggggagatcgtg

10

20

30

40

50

tgggataagggccgggattttgccaccgtgcggaagtgctgagcatgccccaaagtgaatatcgtga
aaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcctgccccaaaggaacagcgata
agctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtgg
cctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaaga
gctgctggggatcaccatcatggaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagcca
agggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaa
aacggccggaagagaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaacgaactggccctgcc
tccaaatatgtgaacttctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccgaggataa
tgagcagaaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagc
gagttctccaagagagtgatcctggccgacgctaactctggacaaagtgtgtgctccgctacaacaagca
ccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttacctgaccaatctgggag
ccctgccgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaagaggt
gctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcag
ctgggaggtgactctggtggaagcggaggatctggcggcagcaccaatctgagcgacatcatcgaga
aagagacaggcaagcagctggtcatccaagagtccatcctgatgctgcctgaagaggtggaagaagt
gatcggcaacaagcccagctccgacatcctggtgcacaccgcctacgatgagagcaccgacgagaac
gtgatgctgctgacctctgacgcccctgagtacaagccttgggctctcgtgatccaggacagcaacgg
cgagaacaagatcaagatgctgagcggcggctctggtggctctggcggatctacaaacctgtccgat
attattgagaagaagaaccgggaacagctcgtgattcaagagtctattctcatgctcccggaagaagt
cgaggaagtcatggaacaagcctgagagcgatattctggtccatacagcctacgacgagcttaccg
atgagaatgtcatgctcctcaccagcgacgctcccagagtataagccatgggcacttgtcattcaggac
tccaatggggaaaacaaaatcaaatgctcccaaagaaaaaacgcaaggtg

10
20

【 0 1 1 3 】

例示的な p r t n __ S z W 8 e q L 7 - a b e 8 __ 2 0 m 配列を以下に提供する。

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAFLVNLNRRVIGEGWNRAIGLHDPT
AHAEIMALRQGLVMQNYRLYDATLYSTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKT
GAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILADECAALLCRFFRMPRRVFNAQKKAQSSTD
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP
SKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIF
SNEMAKVDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV
DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFILVQTYNQLFEENPI
NASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSGLTPNFKSNFDLA
EDAKLQLSKDXYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPL
SASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYK
FIKPILEKMDGTEELLVVLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPF
LKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGAQAQ
SFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK
AIVDLLFKTRNKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDK
DFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGR
LSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDS
LHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKN
SRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL
SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGSNDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNA
KLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN
DKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPK
LESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRP
LIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDK
LIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEK
NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN
FLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLS

30
40
50

AYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGDEGADKRTADGSEFESP KKKRKV

【 0 1 1 4 】

例示的な p r t n _ Z J V P E x X Y - p p a b o b e c 1 - r 3 3 a - タンパク質配列を以下に提供する。

MTSEKGPSTGDPTLRRRIESWEFDVfyDPRELAKETCLLYEIKWGMsrKIWRSSGKN
TTNHVEVNFikKFTSERRFHSSISCSITWFLSWSPCWECsQAIREFLSQHPGVTLVIY
VARLFWHMDQRNRQGLRDLVNSGVTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPpGDEAHWPQ
YPPLWMMlyALELHCiILSLPPCLKISRrWQNHlAFFRLHLQnCHYQTIPPHILLAT
GLIHPSVTWRLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSV
GWAVITDEYKVPskKfKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYT
RRKNRiCYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEK
YPTIYHLRKKLVDSTDKADLRliYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLV
QTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG
LTPNFksNFDLAEDAklQLSKDtyDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDI
LRVnteITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYI
DGGASQEEfyKfIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHA
ILRRQEDfYPFLKDNREKIEKILTFRIpyyVGPLARGNSRFawMTRKSEETITPWNFE
EVVDKGASaQSFIERMTNFDKNLPNEKVLpkHSLlyEYFTVYNELTKVKYVTEGMR
KPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNrkVtVKQLKEDYfKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT
YHDLLKiiKDKDFLDNEENEDILEdivLTLTLFEDREMIEERLkTYAHLFDDKVMKQL
KRRRYTGWGRLSRKLINGIRDkQSGKTILDFLKSdGFANrNFMQLIHDDSLTFKEDIQ
KAQVSGQGDslHEHIANLAGSPAikKGILQTVKVVDELVKVMGRHkPENIViEMARE
NQTtQKGQNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDM
YVDQELDINRLSDYDvdHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKM
KNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTkaERGGLSELDKAGfIKRQLVETRQITKHVAQILD
SRMNTKYDENDKLIREVKVITLkSKLVSDFRKDFQfyKvREINNYHHAHDAYLNAVv
GTALIKKYPKLESEfVYGDYKvYDVRKMIakSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
LANGEIRKRPLIETNGETGEiVWDKGRDFATVRKVLsMPQVNIvKKTEVQTGGFSKE
SILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDsPTVAYSVLVVAkVEK GKSKKLKSVKELLGI
TIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLiIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN
ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHkHYLDEiIEQISEfSKRVIL
ADANLDKVLsAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTK
EVL DATLIHQsITGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGSGGSTNLSDiIEKETGKQLVIQESIL
MLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMllTSDAPEYKpWALVIQDSNGENK
IKMLSGGSSGGSSGGSTNLSDiIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTA
YDESTDENVMllTSDAPEYKpWALVIQDSNGENKIKMLPKKKRKV

10

20

30

【 0 1 1 5 】

例示的な p r t n _ Z y q E 8 A Y c - p p a b o b e c 1 - w t - タンパク質配列を以下に提供する。

MTSEKGPSTGDPTLRRRIESWEFDVfyDPRELrKETCLLYEIKWGMsrKIWRSSGKN
TTNHVEVNFikKFTSERRFHSSISCSITWFLSWSPCWECsQAIREFLSQHPGVTLVIY
VARLFWHMDQRNRQGLRDLVNSGVTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPpGDEAHWPQ
YPPLWMMlyALELHCiILSLPPCLKISRrWQNHlAFFRLHLQnCHYQTIPPHILLAT
GLIHPSVTWRLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSV
GWAVITDEYKVPskKfKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYT
RRKNRiCYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEK
YPTIYHLRKKLVDSTDKADLRliYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLV
QTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG
LTPNFksNFDLAEDAklQLSKDtyDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDI

40

50

LRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYI
 DGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHA
 ILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE
 EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMR
 KPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT
 YHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQL
 KRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQ
 KAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARE
 NQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDM
 YVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKM 10
 KNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILD
 SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAV
 GTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWVKGRDFATVRKVLVSMQVNIKKTEVQTTGGFSKE
 SILPKRNSDKLIARKKDWDPKKGFGDSPTVAYSVLVVAKVEKSKKLSVKELLGI
 TIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN
 ELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRUIL
 ADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTK
 EVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESIL 20
 MLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENK
 IKMLSGSGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTA
 YDESTDENVMMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLPKKKRKV

【0116】

いくつかの実施形態では、塩基エディターは、標的部位での塩基除去修復を阻害し、細胞ミスマッチ修復を誘導するよう更に修飾されている。本明細書に記載されるCas9分子のいずれかは、Gamドメイン（バクテリオファージMutanパク質）に融合されて、分解及びエクソヌクラーゼ活性からCas9分子を保護することができる。例えば、Eid et al. *Biochem. J.* (2018) 475(11): 1955-1964を参照されたい。

【0117】

いくつかの実施形態では、Cas9分子は、Casエンドヌクラーゼのクラス2V型に属する。クラス2のV型Casエンドヌクラーゼは、V-A型、V-B型、V-C型、及び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) 24: 882-892を参照されたい。いくつかの実施形態では、Cas分子は、Cpf1 (Cas12a)ヌクラーゼなどのV-A型Casエンドヌクラーゼである。いくつかの実施形態では、Cas9分子は、C2c1エンドヌクラーゼなどのV-B型Casエンドヌクラーゼである。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、Cas分子は、MAD7（商標）である。あるいは、又は加えて、Cas9分子は、Cpf1ヌクラーゼ又はそのバリエーションである。当業者によって理解されるように、Cpf1ヌクラーゼはまた、Cas12aと呼んでもよい。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、本明細書に記載される組成物又は方法は、Provetella spp. 又はFrancisella spp.、Acidaminococcus sp. (AsCpf1)、Lachnospiraceae bacterium (LpCpf1)、又はEubacterium rectaleに由来するCpf1ヌクラーゼを含むか、又は宿主細胞は、それを発現する。いくつかの実施形態では、Cpf1ヌクラーゼをコードするヌクレオチド配列は、宿主細胞における発現に最適化されたコドンであってもよい。いくつかの実施形態では、Cpf1エンドヌクラーゼをコードするヌクレオチド配列 40 50

は、タンパク質の活性を変化させるために更に修飾される。

【0118】

C R I S P R / C a sヌクレアーゼの天然に存在するバリエーション及び修飾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、d C a s又はニックアーゼバリエーション、改変されたP A M特異性を有するC a sバリエーション、及び改善されたヌクレアーゼ活性を有するC a s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。いくつかの実施形態では、C a s分子（例えば、C a s 9又はC a s 1 2 a）の触媒的に不活性なバリエーションは、本明細書に記載される方法に従って使用される。C p f 1（C a s 1 2 a）の触媒的に不活性なバリエーションは、d C a s 1 2 aと呼ばれてもよい。本明細書に記載されるように、C p f 1の触媒的に不活性なバリエーションは、機能ドメインに融合されて、塩基エディターを形成してもよい。例えば、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C a s 9分子は、d C a s 9である。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（U G I）ドメインに融合されたd C a s 1 2 aを含む。いくつかの実施形態では、C a s 9分子は、アデニン塩基エディター（A B E）、例えば、R N AアデニンデアミナーゼT a d Aから進化したA B Eに融合されたd C a s 1 2 aを含む。いくつかの実施形態では、C a s分子は、シチジンデアミナーゼ酵素（例えば、A P O B E Cデアミナーゼ、p m C D A 1、活性化誘発性シチジンデアミナーゼ（A I D））に融合されたd C a s 1 2 aを含む。

10

20

【0119】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される細胞又は細胞集団は、亜鉛フィンガー（Z F N）テクノロジーを使用して産生される。いくつかの実施形態では、Z F Nは、本明細書に記載される標的ドメイン、例えば、本明細書に記載されるC D 3 3（S i g l e c - 3）、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 3 2 7（S i g l e c - 6）、及び/又はC D 3 1 2（E M R 2）中の標的ドメインを認識する。一般に、ジンクフィンガー媒介ゲノム編集は、ジンクフィンガーヌクレアーゼの使用を伴い、典型的には、ジンクフィンガーD N A結合ドメイン及びヌクレアーゼドメインを含む。ジンクフィンガー結合ドメインは、目的の任意の標的ドメインを認識し、結合するように操作されてもよく、例えば、約3ヌクレオチド～約21ヌクレオチド長、又は約8～約19ヌクレオチド長の範囲のD N A配列を認識するように設計されてもよい。ジンクフィンガー結合ドメインは、典型的には、少なくとも3つのジンクフィンガー認識領域（例えば、亜鉛フィンガー）を含む。

30

【0120】

（認識部位での）D N Aへの配列特異的結合及び結合部位又はその近傍でのD N Aの切断が可能な制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は、当該技術分野で既知であり、ゲノム編集で使用するためのZ F Nを形成するために使用され得る。例えば、I I S型制限エンドヌクレアーゼは、認識部位から除去された部位でD N Aを切断し、分離可能な結合ドメイン及び切断ドメインを有する。一例では、D N A切断ドメインは、F o k Iエンドヌクレアーゼから誘導されてもよい。

40

【0121】

T A L E N

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞又は細胞集団は、T A L E N技術を使用して産生される。いくつかの実施形態では、T A L E Nは、本明細書に記載の標的ドメイン、例えば、本明細書に記載のC D 3 3（S i g l e c - 3）、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 3 2 7（S i g l e c - 6）、及び/又はC D 3 1 2（E M R 2）中の標的ドメインを認識する。一般に、T A L E Nは、所望の標的D N A分子に特異的に結合し、切断することができる操作された制限酵素である。T A L E Nは、典型的には、D N A切断ドメインに融合された転写活性化因子様エフェクター（T A L E）D N A結合ドメインを含む。D N A結合ドメインは、12位及び13位に、分岐2アミノ酸R V D（反復可変

50

ジペプチドモチーフ)を有する高度に保存された33~34アミノ酸配列を含有してもよい。RVDモチーフは、核酸配列への結合特異性を決定し、所望のDNA配列に特異的に結合するように操作することができる。一例では、DNA切断ドメインは、FokIエンドヌクレアーゼから誘導されてもよい。いくつかの実施形態では、FokIドメインは、適切な向き、及び間隔で標的ゲノム中の部位に対して固有のDNA結合ドメインを有する2つの構築物を使用して、二量体として機能する。

【0122】

目的の標的遺伝子に特異的なTALENを細胞内で使用して、二本鎖切断(DSB)を産生することができる。修復機構が、非相同末端結合を介して破損を不適切に修復する場合、変異は、切断部位に導入され得る。例えば、不適切な修復は、フレームシフト変異を生じさせ得る。あるいは、所望の配列を有する外来DNA分子を、TALENとともに細胞に導入することができる。外来DNAの配列及び染色体配列に応じて、このプロセスを使用して、欠陥を補正するか、若しくはDNA断片を目的の標的遺伝子に導入するか、又はそのような欠陥を内在遺伝子に導入し、したがって、標的遺伝子の発現を減少することができる。

10

【0123】

本明細書において提供されるガイドRNA及び遺伝子操作法に関連して使用するのに好適なエンドヌクレアーゼ及びヌクレアーゼバリエーションのいくつかの例示的な非限定的な実施形態は、上に記載されている。追加の好適なヌクレアーゼ及びヌクレアーゼバリエーションは、本開示及び当該技術分野の知見に基づき、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。

20

【0124】

gRNA配列及び配置

一般的なgRNA配置

gRNAは、いくつかのドメインを含み得る。一実施形態では、単分子、sgRNA、又はキメラgRNAは、例えば、5'から3'に、

標的化ドメイン(標的遺伝子、例えば、系統特異的細胞表面抗原(例えば、CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2))遺伝子中の標的核酸配列に対して相補的であるか、又は部分的に相補的である)、

30

第1の相補性ドメイン、

結合ドメイン、

第2の相補性ドメイン(第1の相補性ドメインと相補的である)、

近位ドメイン、及び

任意選択的に、テールドメインを含む。

【0125】

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。

【0126】

標的化ドメインは、例えば、標的核酸上の標的配列に対して少なくとも80、85、90、又は95%の相補性、例えば、完全な相補性であるヌクレオチド配列を含んでもよい。標的化ドメインは、RNA分子の一部であり、したがって、典型的には、塩基ウラシル(U)を含み、一方、gRNA分子をコードする任意のDNAは、塩基チミン(T)を含む。理論によって拘束されることを望むものではないが、標的化ドメインの標的配列との相補性は、標的核酸とのgRNA/Cas9分子複合体の相互作用の特異性に寄与すると考えられる。標的化ドメイン及び標的配列対において、標的化ドメイン中のウラシル塩基は、標的配列中のアデニン塩基と対形成することが理解される。一実施形態では、標的ドメイン自体は、5'から3'方向に、任意選択の二次ドメイン、及びコアドメインを含む。一実施形態では、コアドメインは、標的配列と完全に相補的である。一実施形態では、標的化ドメインは、5~50ヌクレオチド長である。標的化ドメインは、15~30ヌクレオチド長、15~25ヌクレオチド長、18~22ヌクレオチド長、又は19~21ヌク

40

50

レオチド長であってもよい。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、10~30、又は15~25ヌクレオチド長である。標的化ドメイン配列は、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、又は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。

【0127】

したがって、gRNAの標的化ドメインは、（完全又は部分的相補性で）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形成する。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'又は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の場所及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及び説明については、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)、及びSternberg SH et al., Nature 2014 (doi: 10.1038/nature13011)を参照されたい。

【0128】

22ヌクレオチド標的ドメイン及びNGG PAM配列を含むCas9標的部位、並びに標的ドメインに完全に対応する（したがって、標的ドメイン及び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。

【0129】

【化1】



【0130】

22ヌクレオチド標的ドメイン及びTTN PAM配列を含むCas12a標的部位、並びに標的ドメインに完全に対応する（したがって、標的ドメイン及び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。

10

20

30

40

50

に対して十分な相補性を有する。一実施形態では、第一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。一実施形態では、第一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、及び3'サブドメインである、3つのサブドメインを含む。一実施形態では、5'サブドメインは、長さが4～9個、例えば、4、5、6、7、8又は9個のヌクレオチドである。一実施形態では、中央サブドメインは、長さが1個、2個、又は3個、例えば、1個のヌクレオチドである。一実施形態では、3'サブドメインは、長さが3～25個、例えば、4～22個、4～18個、又は4～10個、又は3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のヌクレオチドである。第一の相補性ドメインは、天然に存在する第一の相補性ドメインと相補性を共有するか、又はそれに由来し得る。一実施形態では、それは、*S. pyogenes*、*S. aureus*、又は*S. thermophilus*、第1の相補性ドメインと少なくとも50%の相補性を有する。

10

【0135】

上記のドメインの配列及び配置は、PCT公開第WO2015/157070号においてより詳細に記載されており、その中のp. 88～112を含めて、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0136】

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す。結合ドメインは、第1及び第2の相補性ドメインを共有結合的又は非共有結合的に結合することができる。一実施形態では、結合は、共有結合である。一実施形態では、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、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、連結ドメインは、1つ以上、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、連結ドメインは、少なくとも1つの非ヌクレオチド結合を含み、例えば、PCT公開第WO2018/126176号において開示されるとおりであり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0137】

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。一実施形態では、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。一実施形態では、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。一実施形態では、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又は25個のヌクレオチドである。一実施形態では、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、及び3'サブドメインである、3つのサブドメインを含む。一実施形態では、5'サブドメインは、長さが3～25個、例えば、4～22個、4～18個、又は4～10個、又は3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のヌクレオチドである。一実施形態では、中央サブドメインは、長さが1個、2個、3個、4個、又は5個、例えば、3個のヌクレオチドである。一実施形態では、3'サブドメインは、長さが4～9個、例えば、4、5、6、7、8又は9個のヌクレオチドである。一実施形態では、第1の相補性ドメインの5'サブドメイン及び3'サブドメインは、それぞれ、第2の相補性ドメインの3'サブドメイン及び5'サブドメインと相補的、例えば、完全に相補的である。

30

40

【0138】

一実施形態では、近位ドメインは、長さが5～20個のヌクレオチドである。一実施形態では、近位ドメインは、天然に存在する近位ドメインと相補性を共有するか、又はそれ

50

に由来し得る。一実施形態では、これは、*S. pyogenes*、*S. aureus*、又は*S. thermophilus*近位ドメインと少なくとも50%の相同性を有する。

【0139】

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。一実施形態では、テールドメインは、長さが0（不在）、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は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、又はそれと相同性を共有する。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、又は長さが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相同性を共有するか、又はそれに由来し得る。いくつかの実施形態では、これは、*S. pyogenes*、*S. aureus*、又は*S. thermophilus*テールドメインと少なくとも50%の相同性を有する。一実施形態では、テールドメインは、3'末端に、インビトロ又はインビボ転写の方法に関連するヌクレオチドを含む。

10

【0140】

いくつかの実施形態では、モジュール式gRNAは、

例えば、5'から3'に、

標的化ドメイン（系統特異的細胞表面抗原（例えば、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2））遺伝子中の標的核酸に相補的である）、及び

20

第1の相補性ドメイン、を含む、第1の鎖と、

好ましくは5'から3'に、

任意選択的に、5'拡張ドメイン、

第2の相補性ドメイン、

近位ドメイン、及び

任意選択的に、テールドメイン、を含む、第2の鎖と、を含む。

【0141】

いくつかの実施形態では、gRNAは、化学的に修飾されている。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の化学的修飾は、以前に記載されており、好適な化学的修飾には、gRNA機能のために有益であり、所与のgRNAの任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。好適な化学的修飾としては、例えば、gRNAがエンドヌクレアーゼ又はエク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、gRNAが、ホスホロチオエート骨格修飾、2'-O-Me修飾糖（例えば、3'及び5'末端の一方又は両方における）、2'F修飾糖、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）、又はそれらの任意の組み合わせから選択される1つ以上の修飾を含み得ることを含む。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、そのような好適なgRNA修飾には、限定されるものではないが、例えば、Rahdar et al., PNAS December 22, 2015 112(51) E7110-E7117及びHendel et al., Nat Biotechnol. 2015 Sep; 33(9): 985-989に記載されるものが含まれ、その各々は全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるgRNAは、1つ以上の2'-O-メチル-3'-ホスホロチオエートヌクレオチド、例えば、少なくとも2、3、4、5、又は6個の2'-O-メチル-3'-ホスホロチオエ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つの末端位置及び5'末端に、並びに/又は3つの末端位置及び3'末端に、修飾ヌクレオチド（例えば、2'-O-メチル-3'-ホスホロチオエートヌクレオチド）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

30

40

50

の全体が組み込まれる、PCT公開第WO2017/214460号、同第WO2016/089433号、及び同第WO2016/164356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。

【0142】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるgRNAは、化学的に修飾されている。例えば、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'及び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、及び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、及び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、及び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、及び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、及び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エート結合を含む。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PAC結合を含む。

【0143】

いくつかの実施形態では、gRNAは、1つ以上の2'-O修飾及び3'リン修飾ヌクレオチド、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオエ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修飾及び3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオエ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修飾及び3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオエ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5'及び3'末端に、2'-O修飾及び3'リン修飾、例えば、2'-O-メチル3'ホスホロチオエ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修飾及び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、及びgRNAの5'末端からの第3のヌクレオチドで、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート修飾される。いくつかの実施形態では、gRNAは、2'-O修飾及び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 50

レオチド、及び gRNA の 3' 末端からの第 3 のヌクレオチドで、2' - O - メチル 3' ホスホロチオエート修飾される。いくつかの実施形態では、gRNA は、2' - O 修飾及び 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、及び gRNA の 3' 末端からの第 3 のヌクレオチドで、2' - O - メチル 3' ホスホロチオエート修飾される。いくつかの実施形態では、gRNA は、2' - O 修飾及び 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、及び gRNA の 3' 末端からの第 4 のヌクレオチドで、2' - O - メチル 3' ホスホロチオエート修飾される。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 修飾及び 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、及び gRNA の 3' 末端からの第 4 のヌクレオチドで、2' - O - メチル 3' ホスホロチオエート修飾される。

【0144】

いくつかの実施形態では、gRNA は、1つ以上の 2' - O 修飾及び 3' - リン修飾、例えば、2' - O - メチル 3' チオ P A C E 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 修飾及び 3' リン修飾、例えば、2' - O - メチル 3' チオ P A C E 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 修飾及び 3' リン修飾、例えば、2' - O - メチル 3' チオ P A C E 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' 及び 3' 末端に、2' - O 修飾及び 3' リン修飾、例えば、2' - O - メチル 3' チオ P A C E 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 修飾及び 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、及び 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 P A C E 修飾される。いくつかの実施形態では、gRNA は、2' - O 修飾及び 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、及び 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 P A C E 修飾される。いくつかの実施形態では、gRNA は、2' - O 修飾及び 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、及び 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 P A C E 修飾される。いくつかの実施形態では、gRNA は、2' - O 修飾及び 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、及び 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、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 修飾及び 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、及び 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。

【0145】

いくつかの実施形態では、gRNA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、gRNAは、ホスホロチオエート結合を含む。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、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、及びgRNAの5'末端からの第3のヌクレオチドは各々、ホスホロチオエート結合を含む。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、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、及びgRNAの3'末端からの第3のヌクレオチドは各々、ホスホロチオエート結合を含む。いくつかの実施形態では、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、及びgRNAの3'末端からの第3のヌクレオチドは各々、ホスホロチオエート結合を含む。いくつかの実施形態では、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、及びgRNAの3'末端からの第4のヌクレオチドは各々、ホスホロチオエート結合を含む。いくつかの実施形態では、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、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、及びgRNAの3'末端からの第4のヌクレオチドは各々、ホスホロチオエート結合を含む。

【0146】

いくつかの実施形態では、gRNAは、チオPACE結合を含む。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、及びgRNAの5'末端からの第3のヌクレオチドは各々、チオPACE結合を含む。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、gRNAの3'末端からの第2のヌクレオチド、及びgRNAの3'末端からの第3のヌクレオチドは各々、チオPACE結合を含む。いくつかの実施形態では、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、及びgRNAの3'末端からの第3のヌクレオチドは各々、チオPACE結合を含む。いくつかの実施形態では、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、及びgRNAの3'末端からの第4のヌクレオチドは各々、チオPACE結合を含む。いくつかの実施形態では、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、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、及びgRNAの3'末端からの第4のヌクレオチドは各々、チオPACE結合を含む。

【0147】

本明細書において提供されるガイドRNA及び遺伝子操作法に関連して使用するのに好適な修飾、例えば、化学的修飾のいくつかの例示的な非限定的な実施形態は、上記に記載されている。追加の好適な修飾、例えば、化学的修飾は、これらに限定されないが、Hendel, A. et al., Nature Biotech., 2015, Vol 33, No. 9, PCT公開第WO2017/214460号、同第WO2016/089433号、及び同第WO2016/164356号(それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるものを含む、本開示及び当該技術分野の知識に基づいて当業者に明らかであろう。

【0148】

本明細書に提供されるgRNAを標的とする系統特異的細胞表面抗原(例えば、CD3(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2))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を含むリボ核タンパク質(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の電ポレーション、細胞へのCasヌクレアーゼ及びgRNAをコードするmRNAの電ポレーション、様々なタンパク質又は核酸トランスフェクション方法、及び例えば、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又は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。

【0149】

CD33(Siglec-3)を標的とするgRNA

10

本開示は、エンドヌクレアーゼをヒトCD33に標的化することができるいくつかの有用なgRNAを提供する。いくつかの実施形態では、gRNAは、各々がその全体において参照により本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2017/066760号、同第WO2020/047164号、同第WO2020/150478号、及び同第WO2020/237217号、同第WO2019/046285号、同第WO2018/160768号、又はBorot et al. PNAS June 11, 2019 116(24)11978-11987のいずれかに開示されるgRNAである。以下の表1~3及び表A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CD33内の標的ドメインを例証する。

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 様々なgRNAにより結合されたヒトCD33の例示的な標的ドメインが本明細書に記載される。各標的ドメインについて、第1の配列は、好適なgRNAによって標的化され得る標的ドメイン配列に対応する例示的な20ヌクレオチドDNA配列を表し、これは、同等のRNA標的ドメイン配列(DNAヌクレオチドの代わりにRNAヌクレオチドを含む)を含み得、第2の配列は、その逆相補鎖である。

識別子	gRNA タイプ	標的ドメイン配列	配列番号	逆相補鎖	配列番号
CD33_CBEsg11	iSTOP ガイド	ACCTGTCAGGTGAAGTTCCG	1	GCGAACTTCACCTGACAGGT	17
CD33_CBEsg7	iSTOP ガイド	ACAGGCCACAGGACACAGAGC	2	GCTCTGTGTCTCTGGCCCTGT	18
CD33_CBEsg9	iSTOP ガイド	TGACAACCAGGAGAAGATCG	3	CGATCTTCTCCTGGTTGTCA	19
CD33_CBEsg12	iSTOP ガイド	GTCCACAGAACCCCAACAAC	4	GTTGTTGGGTTCTGTGGAAC	20
CD33_CBEsg8	iSTOP ガイド	GACAACCAGGAGAAGATCGG	5	CCGATCTTCTCCTGGTTGTC	21
CD33_CBEsg10	iSTOP ガイド	CTGACRACCAGGAGAAGATC	6	GATCTTCTCCTGGTTGTGAG	22
CD33_ABEsg13	SpliceR ガイド	TTCTACCTGAGCCATCTCC	7	GGAGATGGCTCAGGTAGGAA	23
CD33_ABEsg14	SpliceR ガイド	ACTTACAGGTGACGTTGAGC	8	GCTCAACGTACCTGTAAGT	24
CD33_ABEsg15	SpliceR ガイド	CCACTCACCTGCCACACAGCA	9	TGCTGTGGGCAGGTGAGTGG	25
CD33_ABEsg16	SpliceR ガイド	ATGCTCACATGAAGAAGATG	10	CATCTTCTTCATGTGAGCAT	26
CD33_ABEsg17	SpliceR ガイド	CACTCACCTGCCACACAGCAG	11	CATCTTCTTCATGTGAGCAT	27

【表 2】

表2. 様々なgRNAにより結合されたヒトCD33の例示的な標的ドメインが本明細書に提供される。各標的ドメインについて、第1の配列は、DNA標的ドメイン配列を表し、第2の配列は、例示的な同等のgRNA標的ドメイン配列を表す。

識別子	gRNA タイプ	標的ドメイン配列	配列番号	gRNA 標的ドメイン配列	配列番号
CD33_CBEsg11	iSTOP ガイド	ACCTGTCAGGTGAAGTTCGC	1	ACCUGUCAGGUGAAGUUUCG	33
CD33_CBEsg7	iSTOP ガイド	ACAGGCCCCAGGACACAGAGC	2	ACAGGCCCCAGGACACAGAGC	34
CD33_CBEsg9	iSTOP ガイド	TGACAACCAGGAGAAGATCG	3	UGACAACCAGGAGAAGAUCCG	35
CD33_CBEsg12	iSTOP ガイド	GTTCCACAGAACCCCAACAAC	4	GUUCCACAGAACCCCAACAAC	36
CD33_CBEsg8	iSTOP ガイド	GACAACCAGGAGAAGATCGG	5	GACAACCAGGAGAAGAUCCG	37
CD33_CBEsg10	iSTOP ガイド	CTGACAACCAGGAGAAGATC	6	CUGACAACCAGGAGAAGAUCC	38
CD33_ABEsg13	SpliceR ガイド	TTCCTACCTGAGCCATCTCC	7	UUCCUACCCUGAGCCAUCC	39
CD33_ABEsg14	SpliceR ガイド	ACTTACAGGTGACGTTGAGC	8	ACUUACAGGUGACGUUGAGC	40
CD33_ABEsg15	SpliceR ガイド	CCACTCACCTGCCCCACAGCA	9	CCACUCACCCUGCCACAGCA	41
CD33_ABEsg16	SpliceR ガイド	ATGCTCACATGAAGAAGATG	10	AUGCUACAUGAAGAAGAUCC	42
CD33_ABEsg17	SpliceR ガイド	CACTCACCTGCCCCACAGCAG	11	CACUCACCCUGCCCCACAGCAG	43

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表3. 様々なgRNAにより結合されたヒトCD33の例示的な標的ドメインが本明細書に提供される。各標的ドメインについて、ヒトCD33ゲノム配列中のDNA標的配列が提供される。本明細書に提供される標的ドメインを標的とするgRNAは、その標的化ドメイン内に同等のRNA配列を含み得る。

識別子	標的遺伝子	標的ドメイン配列	配列番号
CD33_CBEsg11	CD33	ACCTGTCAGGTGAAGTTTCGC	1
CD33_CBEsg7	CD33	ACAGGCCCCAGGACACAGAGC	2
CD33_CBEsg9	CD33	TGACAACCAGGAGAAGATCG	3
CD33_CBEsg12	CD33	GTTCCACAGAACCCAACAAC	4
CD33_CBEsg8	CD33	GACAACCAGGAGAAGATCGG	5
CD33_CBEsg10	CD33	CTGACAACCAGGAGAAGATC	6
CD33_ABEsg13	CD33	TTCCTACCTGAGCCATCTCC	7
CD33_ABEsg14	CD33	ACTTACAGGTGACGTTGAGC	8
CD33_ABEsg15	CD33	CCACTCACCTGCCCACAGCA	9
CD33_ABEsg16	CD33	ATGCTCACATGAAGAAGATG	10
CD33_ABEsg17	CD33	CACTCACCTGCCCACAGCAG	11

10

20

30

40

50

【表 4】

表4. 例示的なヒトCD33標的配列。ある特定の標的配列の後にPAM配列が続き、テキスト内のスペースで示される。提供される標的配列と結合する好適なgRNAは、典型的には、それぞれの標的配列と同等のRNAヌクレオチド配列を含む(PAMを除く)標的化ドメインを含む。

gRNA 標的	標的配列	配列番号
hCD33	ACCTGTCAGGTGAAGTTCGC TGG	178
hCD33	TGGCCGGGTTCTAGAGTGCC AGG	179
hCD33	GGCCGGGTTCTAGAGTGCCA GGG	180
hCD33	CACCGAGGAGTGAGTAGTCC TGG	181
hCD33	TCCAGCGAACTTCACCTGAC AGG	182
CD33 (イントロン1内)	GCTGTGGGGAGAGGGGTTGT	183
CD33 (イントロン1内)	CTGTGGGGAGAGGGGTTGTC	184
CD33 (イントロン1内)	TGGGGAAACGAGGGTCAGCT	185
CD33 (イントロン1内)	GGGCCCCTGTGGGGAAACGA	186
CD33 (イントロン1内)	AGGGCCCCTGTGGGGAAACG	187
CD33 (イントロン1内)	GCTGACCCTCGTTTCCCCAC	188
CD33 (イントロン1内)	CTGACCCTCGTTTCCCCACA	189
CD33 (イントロン1内)	TGACCCTCGTTTCCCCACAG	190
CD33 (イントロン1内)	CCATAGCCAGGGCCCCTGTG	191
CD33 (イントロン2内)	GCATGTGACAGGTGAGGCAC	192
CD33 (イントロン2内)	TGAGGCACAGGCTTCAGAAG	193
CD33 (イントロン2内)	AGGCTTCAGAAGTGGCCGCA	194
CD33 (イントロン2内)	GGCTTCAGAAGTGGCCGCAA	195
CD33 (イントロン2内)	GTACCCATGAACTTCCCTTG	196
CD33 (イントロン2内)	GTGGCCGCAAGGGAAGTTCA	197
CD33 (イントロン2内)	TGGCCGCAAGGGAAGTTCAT	198
CD33 (イントロン2内)	GGAAGTTCATGGGTACTGCA	199
CD33 (イントロン2内)	TTCATGGGTACTGCAGGGCA	200
CD33 (イントロン2内)	CTAAACCCCTCCCAGTACCA	201
CD33 (イントロン1内)	CACTCACCTGCCACAGCAG	202
CD33 (イントロン1内)	CCCTGCTGTGGGCAGGTGAG	203
CD33 (イントロン1内)	TGGGCAGGTGAGTGGCTGTG	204
CD33 (イントロン1内)	GGTGAGTGGCTGTGGGGAGA	205
CD33 (イントロン1内)	GTGAGTGGCTGTGGGGAGAG	206
CD33 (エクソン2)	ATCCATAGCCAGGGCCCCTG	207
CD33 (エクソン2)	TCCATAGCCAGGGCCCCTGT	208
CD33 (エクソン2)	CCATAGCCAGGGCCCCTGTG	191
CD33 (エクソン2)	TCGTTTCCCCACAGGGGCC	209
CD33 (エクソン2)	TGGCTATGGATCCAAATTC	210
CD33 (エクソン2)	TGGGGAAACGAGGGTCAGCT	185
CD33 (エクソン2)	GGGCCCCTGTGGGGAAACGA	186
CD33 (エクソン2)	AGAAATTTGGATCCATAGCC AGG	211
CD33 (エクソン3)	ATCCCTGGCACTCTAGAACC CGG	212
CD33 (エクソン3)	CCTCACTAGACTTGACCCAC AGG	213

10

20

30

40

50

【表 5】

表5: 好適なgRNAによって結合され得るヒトCD33、CD123、又はCLL-1の標的ドメインの配列。隣接するPAM配列も提供される。好適なgRNAは、典型的には、標的ドメイン配列と同等のRNA配列を含み得る標的化ドメインを含む。

標的遺伝子	配列	PAM	標的位置
CD33	CCCCAGGACTACTCACTCCT (配列番号: 64)	CGG	CD33エクソン3
CD123	TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (配列番号: 65)	CGG	CD123エクソン5
	AGTCCCACATCCTGGTGCG (配列番号: 66)	GGG	CD123エクソン6
CLL-1	GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (配列番号: 74)	TGG	CLL-1エクソン4

10

20

【表 15】

表15: 例示的なABEガイド

ABE ガイド	スペーサー配列 (すなわち、標的 ドメイン配列)	配列 番号	PAM	逆 相補鎖	配列 番号	gRNA 標的化 ドメイン 配列
CD33 ABE sg16	ATGCTCACATGAAG AAGATG	2000	AGG	CATCTTCTTCATGTG AGCAT	2002	TGTCTCTGCC TCATCTTCTT CATGTGAGCA TTTTCTCTGG GTCAGGCATG GGCC
CD33 ABE sg17	CACTCACCTGCCCA CAGCAG	2001	GGG	CTGCTGTGGGCAGGT GAGTG	2003	TGCTACTGCT GCCCTGCTG TGGGCAGGTG AGTGGCTGTG GGGAGAGGGG TTGTCTG

30

【0150】

CLL-1を標的とするgRNA

本開示は、エンドヌクレアーゼをヒトCLL-1に標的化することができるいくつかの有用なgRNAを提供する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼをヒトCLL-1に標的化することができるgRNAは、PCT公開第WO2020/047164号及び第WO2021/041971号のいずれかに開示されているgRNAであり、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。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CLL-1内の標的ドメインを例証する。

40

50

【表 6】

表6. 様々なgRNAにより結合されたヒトCLL-1の例示的な標的ドメインが本明細書に記載される。各標的ドメインについて、第1の配列は、好適なgRNAによって標的化され得る標的ドメイン配列に対応する例示的な20ヌクレオチドDNA配列を表し、これは、同等のRNA標的化ドメイン配列(DNAヌクレオチドの代わりにRNAヌクレオチドを含む)を含み得、第2の配列は、その逆相補鎖である。

識別子	gRNA タイプ	標的ドメイン配列	配列番号	逆相補鎖	配列番号
CLL-1_CBESg3	iSTOP ガイド	CAAAATCCATCTCTGGACA	12	TGTCCAAGGAGATGGATTTG	28
CLL-1_CBESg4	iSTOP ガイド	TTATGCCAAAATCCATCTCCT	13	AGGAGATGGATTTGGCATAA	29
CLL-1_CBESg1	iSTOP ガイド	ATCCAGAACTCCAGTGAGA	14	TCTCACTGGAGTTCGTGAAT	30
CLL-1_CBESg2	iSTOP ガイド	CGCCATACATGAGAGGGAGC	15	GCTCCCTCTCATGTATGGCG	31
CLL-1_CBESg5	iSTOP ガイド	AACATGGCAGGAGAGTAAAA	16	TTTTACTCTCTGCCATGTT	32

10

20

30

40

50

【表 7】

表7. 様々なgRNAにより結合されたヒトCLL-1の例示的な標的ドメインが本明細書に提供される。各標的ドメインについて、第1の配列は、ヒトCLL-1ゲノム配列中のDNA標的ドメイン配列を表し、第2の配列は、例示的な同等のgRNA標的ドメイン配列を表す。

識別子	gRNA タイプ	標的ドメイン配列	配列番号	gRNA 標的ドメイン配列	配列番号
CLL-1_CBESg3	iSTOP ガイド	CAAAATCCATCTCCTTGGACA	12	CAAAUCCAUCCUUGGACA	44
CLL-1_CBESg4	iSTOP ガイド	TTATGCCAAAATCCATCTCCT	13	UUAUGCCAAAUCCAUCCU	45
CLL-1_CBESg1	iSTOP ガイド	ATTCCAGAACCTCCAGTGAGA	14	AUUCAGAAACUCCAGUGAGA	46
CLL-1_CBESg2	iSTOP ガイド	CGCCATACATGAGAGGGAGC	15	CGCCAUACAUGAGAGGGAGC	47
CLL-1_CBESg5	iSTOP ガイド	AACATGGCAGGAGAGTAAAA	16	AACAUGGCAGGAGAGUAAAA	48

10

20

30

40

50

【表 16】

表16. 様々なRNAにより結合されたヒトCLL-1の例示的な標的ドメインが本明細書に記載される。各標的ドメインについて、第1の配列は、ヒトCLL-1ゲノム配列中の好適なPAMに隣接する例示的なDNA標的配列を基とし、これは、同等のRNA標的化ドメイン配列(DNAヌクレオチドの代わりにRNAヌクレオチドを含む)を含み得、第2の配列は、その逆相補鎖である。

ガイド	スベーター配列 (すなわち、標的ドメイン配列)	配列 番号	逆 相補鎖	配列 番号	gRNA 標的化ドメイン配列
g7	ACTCACCTATCCACATGCAG	1100	CTGCATGTGGATAGGTGAGT	1135	ACUCACCUAUCCACAUJGCAG
g7A	TCAAGATTTCTTTACATAATC	1101	GAATATGTAAAGAAATCTTGA	1136	UCAAGAUUUUUUUACAUJUC
g8	GACACTCACCTATCCACATG	1102	CATGTGGATAGGTGAGTGTG	1137	GACACUCACCUAUCCACAUG
g10	CTCACCTATCCACATGCAGA	1103	TCTGCATGTGGATAGGTGAG	1138	CUCACCUAUCCACAUJGCAGA
g11	CTTCTGCATGTGGATAGGTG	1104	CACCTATCCACATGCAGAAG	1139	CUUUCGCAUJUGGAUAGGUG
g12	TCTGCATGTGGATAGGTGAG	1105	CTCACCTATCCACATGCAGA	1140	UCUGCAUUGGGAUAGGUGAG
g13	ACACTCACCTATCCACATGC	1106	GCATGTGGATAGGTGAGTGT	1141	ACACUCACCUAUCCACAUGC
g15	AAAGGTAAGATTTTGAGTTA	1107	TAACTCAAAATCTTACGTTT	1142	AAAGGUAAGAUUUUGAGUUA
g22	CACAGCACCTCCAGCTCCCTC	1108	GAGGGAGCTGGAGTGTGTG	1143	CACAGCACUCCAGCUCUCCUC
g29	AATGTGGATTCACGTAACCTT	1109	AAGTTACGTGAACCTCACAT	1144	AAUGUGGAGUUCACGUAACUJU
g30	ATGTGGATTCACGTAACCTT	1110	AAAGTTACGTGAACCTCACAT	1145	AUGUGGAGUUCACGUAACUJU
g38	AAGGTAATCTTGTATCTCT	1111	AGAGAATACAAAGATTACCTT	1146	AAGGUAUUCUUGAUUUCUCU
g59	CTGTAGGAATTTATAAATCC	1112	GGATTTTATAAATCTCTACAG	1147	CUGUAGGAUUUUUJAAAUJCC
g60	CTTACCTTTTCCCAAAAT	1113	AATTTGGGAAAGGTTAAG	1148	CUUACCUUUUUUJCCCAAAUJ
g64	AAGGTAAGATTTTGAGTTA	1114	ATAACTCAAAATCTTACCTT	1149	AAGGUAAGAUUUUGAGUUAU
g69	AGTACATACACATGCTTGCC	1115	GGCAAGCATGTGTATGTACT	1150	AGUACAUACACAUJGUJGCCC
g69	TCTTTCAGGGTTATAAGAAAC	1116	GTTCTTATAACCCCTGAAAGA	1151	UCUUUCAGGGUUAUJAAAGAAAC
g70	GTGGAGTTCAGTAACCTTG	1117	CAAGTTACGTGAACCTCCAC	1152	GUGGAGUUCACGUAACUJUUG
g104	TACCTTGTCTTTGCTATA	1118	TATAGCAAGAACAAAGGTAA	1153	UUACCUUUGUJUUGUUCUJUA
g106	GGTAATCTTGTATTCTCTG	1119	CAAGAGAATACAAGATTACCC	1154	GGUAAUCUUGUUAUUCUJUG
g110	TCTTCCAGAGCACAAATGT	1120	ACATTTGTGCTCTGGGAAGA	1155	UUCUUCAGAGCACAAAUJGU
g120	GTAGATACACATGCTTGCCA	1121	TGGCAAGCATGTGTATGTAC	1156	GUACAUACACAUJGUJGCCC
g127	ATGTGGATTCACGTAACCTT	1122	AAGTTACGTGAACCTCCACAT	1157	AUGUGGAGUUCACGUAACUJU
g128	TGGAGTTCAGTAACCTTGA	1123	TCAAAGTTACGTGAACCTCCA	1158	UGGAGUUCACGUAACUJUJGA
g154	TGTAGGAATTTATAAATCC	1124	GGATTTTATAAATCTCTACA	1159	UGUAGGAAUUUJAAAUUCC
g183	TGGTAAGTGTCTATTCTTGT	1125	ACAAGAATAGACACTTACCA	1160	UGGUAAGUGUCUUAUUCUJUG
g197	AGGTAATCTTGTATTCTCTT	1126	AAGAAATACAAGATTACCTT	1161	AGGUAUCUUGUUAUUCUJUU
g202	TCTTCCAGAGCACAAATGA	1127	TACATTTGCTCTGGARA	1162	UCUUCAGAGCACAAAUJGA
g267	CTTACCAATGCATTTTGT	1128	ACAAAATGCATTTGTTAAG	1163	CUUUACCAUJGUCAUUUJUG
g268	GGGCTTACCAATGCATTTT	1129	AAAATGCATTTGTTAAGGCC	1164	GGGUUUJACCAUJGUCAUUUU
g278	GTAGGAATTTATAAATCCC	1130	GGGATTTTATAAATCTCTAC	1165	GUAGGAAUUUJAAAUUCCCC
g316	CACCTACAGGCACAGGAGT	1131	ACTCCTCTGCCTGGTAAAGT	1166	CACUUAACCAGGCACAGGAGU
g321	GCCTGGTAAGTGTCTATTCT	1132	AGAATAGACACTTACCAGGC	1167	GCCUGGUAAGUGUCUUAUUCU
g324	GGTAAGTGTCTATTCTTGT	1133	ACAAGAATAGACACTTACC	1168	GGUAAAGUGUCUUAUUCUJUU
g337	TCTTTCAGGGTTATAAGAAA	1134	TTTCTTATAACCCCTGAAAGA	1169	UCUUUCAGGGUUAUJAAAGAAA

10

20

30

40

50

【表 17 - 1】

表17. 例示的なCLL-1 gRNAの特徴

ガイド	スパーサー配列 (すなわち、標的ドメイン配列) 配列番号	PAM配列	PAMタイプ	dbSNP計数	OTスコア	BEウィンドウ	編集可能な対立遺伝子数	BE配列	コドン	アミノ酸	結果
g7	1170	AAG	不完全な PAM (NRG)	0	773	TCaCCT	1	TCgCCT	-	-	スプライス領域ハリアント
g7A	1171	TTTG	Cpf1 TTTN PAM	0	386	aaGaTT	3	agGaTT ggGaTT ggGgTT	-	-	スプライス領域ハリアント
g8	1172	CAG	不完全な PAM (NRG)	0	441	CaCTCa	2	CgCTCa CgCTCg	-	-	スプライス領域ハリアント
g10	1173	AG	PAM (NG)	0	1652	CaCCTa	2	CgCCTa CgCCTg	-	-	スプライス領域ハリアント
g11	1174	AG	不完全な PAM (NG)	0	998	TCTGCa	1	TCTGcg	ATG/ GTG	M->V	開始喪失
g12	1175	TG	不完全な PAM (NG)	0	1738	TGCaTG	1	TGCgTG	ATG/ GTG	M->V	開始喪失
g13	1176	AG	不完全な PAM (NG)	0	685	aCTCaC	2	gCTCaC gCTCgC	-	-	スプライス領域ハリアント
g15	1177	TGG	SpCas9 NGG PAM	0	405	aGGTaa	3	gGGTaa gGGTga gGGIgg	AAA/A AG -	K -	スプライス領域ハリアント
g22	1178	TTTC	Cpf1 TTTN PAM	0	46	CaGCaC	2	CgGCaC CgGCgC	-	-	スプライス領域ハリアント
g29	1179	TTTT	Cpf1 TTTN PAM	1	25	TGTGga	1	TGTGGg	-	-	スプライス領域ハリアント
g30	1180	TTTA	Cpf1 TTTN PAM	1	15	GtGGaG	1	GtGGgG	-	-	スプライス領域ハリアント

10

20

30

40

50

【表 17 - 2】

g38	1181	TGG	SpCas9 NGG PAM	0	210	GGTaaT	2	GGTgaT GGTggT	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g59	1182	TTTC	Cpf1 TTTN PAM	0	54	GtTaCGa	2	GtGgGa GtGgGg	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g60	1183	TG	不完全な PAM (NG)	0	1022	TaCCTT	1	TgCCTT	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g64	1184	GG	不完全な PAM (NG)	0	1043	GGTaaG	2	GGTgaG GGTggG	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g69	1185	AAG	不完全な PAM (NRG)	0	262	TaCaTa	3	TgCaTa TgCgTa TgCgTg	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g69	1186	TTTC	Cpf1 TTTN PAM	0	70	TTTCaG	1	TTTTcgG	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g70	1187	AAG	不完全な PAM (NRG)	1	122	GGaGTT	1	GGgGTT	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g104	1188	TAG	不完全な PAM (NRG)	0	547	aCCTTG	1	gCCTTG	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g106	1189	GAG	不完全な PAM (NRG)	0	673	TaaTCT	2	TgaTCT TggTCT	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g110	1190	AAG	不完全な PAM (NRG)	0	551	CTTCCa	1	CTTCCg	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g120	1191	AG	不完全な PAM (NG)	0	560	aCaTaC	3	gCaTaC gCgTaC gCgTgC	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g127	1192	TG	不完全な PAM (NG)	1	212	GtGGaG	1	GtGGgG	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g128	1193	AG	不完全な PAM (NG)	1	199	GaGTTc	1	GgGTTc	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g154	1194	CAG	不完全な PAM (NRG)	0	484	TaGGaa	3	TgGGaa TgGGga TgGGgg	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g183	1195	TAG	不完全な PAM (NRG)	0	408	GtaaGT	2	GtgaGT GTggGT	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g197	1196	GG	不完全な PAM (NG)	0	14551	GtaaTC	2	GtgaTC GTggTC	-	-	スプライス_領域_ ハリアント
g202	1197	AG	不完全な PAM (NG)	0	866	TTCCaG	1	TTCCgG	-	-	スプライス_領域_ ハリアント

10

20

30

40

50

【表 17 - 3】

g267	1198	TG	不完全な PAM (NG)	0	956	TTaCCa	2	TTgCCa TTgCCg	-	-	スプライス領域 ハリアント
g268	1199	TG	不完全な PAM (NG)	0	462	GCTTTa	1	GCTTTg	-	-	スプライス領域 ハリアント
g278	1200	AG	不完全な PAM (NG)	0	530	aGGaaT	3	gGGaaT gGGgaT gGGggT	-	-	スプライス領域 ハリアント
g316	1201	TG	不完全な PAM (NG)	0	716	CTTaCC	1	CTTgCC	-	-	スプライス領域 ハリアント
g321	1202	TG	不完全な PAM (NG)	0	316	CTGGTa	1	CTGGTg	-	-	スプライス領域 ハリアント
g324	1203	AG	不完全な PAM (NG)	0	476	TaaGTG	2	TgaGTG TggGTG	-	-	スプライス領域 ハリアント
g337	1204	CG	不完全な PAM (NG)	0	1219	TTTCaG	1	TTTCgG	-	-	スプライス領域 ハリアント

10

20

30

40

50

【表 8】

表8. 様々なgRNAにより結合されたヒトCLL-1の例示的な標的ドメインが本明細書に提供される。各標的ドメインについて、ヒトCLL-1ゲノム配列中のDNA標的配列が提供される。本明細書に提供される標的ドメインを標的とするgRNAは、その標的化ドメイン内に同等のRNA配列を含み得る。

識別子	標的遺伝子	標的ドメイン配列	配列番号
CLL-1_CBEsg3	CLL-1	CAAATCCATCTCCTTGGACA	12
CLL-1_CBEsg4	CLL-1	TTATGCCAAATCCATCTCCT	13
CLL-1_CBEsg1	CLL-1	ATTCCAGAACTCCAGTGAGA	14
CLL-1_CBEsg2	CLL-1	CGCCATACATGAGAGGGAGC	15
CLL-1_CBEsg5	CLL-1	AACATGGCAGGAGAGTAAAA	16

10

20

30

40

50

【表 9】

表9. 様々なgRNAにより結合されたヒトCLL-1の例示的な標的ドメインが本明細書に記載される。各標的ドメインについて、第1の配列は、好適なgRNAによって標的化され得る標的ドメイン配列に対応する20ヌクレオチドDNA配列を表し、これは、同等のRNA標的化ドメイン配列（以下に提供される配列においてDNAヌクレオチドの代わりにRNAヌクレオチドを含む）を含み得、第2の配列は、その逆相補鎖である。太字は、配列が、配列番号600として以下に示されるヒトCLL-1 cDNA配列中に存在することを示す。

	標的ドメイン配列
gRNA A	CCCAGAAATTGGCAAATTTG (配列番号: 301)
	CAAATTTGCCAATTTCTGGG (配列番号: 311)
gRNA B	ATTCCAGAACTCCAGTGAGA (配列番号: 302)
	TCTCACTGGAGTTCTGGAAT (配列番号: 312)
gRNA C	GAGCTATATAGCAAAGAACA (配列番号: 303)
	TGTTCTTTGCTATATAGCTC (配列番号: 313)
gRNA D	GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (配列番号: 304)
	CACTGCAAACAATAGCCACC (配列番号: 314)
gRNA E	TTGTTTGCAGTGTGGTGGAG (配列番号: 305)
	CTCCACCACACTGCAAACAA (配列番号: 315)
gRNA F	TAGCTCACGACATAATTTGG (配列番号: 306)
	CCAAATTATGTCGTGAGCTA (配列番号: 316)
gRNA G	GGCTATTGTTTGCAGTGTGG (配列番号: 307)
	CCCACTGCAAACAATAGCC (配列番号: 317)
gRNA H	GGAGAGGTTCTGATCTTGT (配列番号: 308)
	ACAAGATCAGGAACCTCTCC (配列番号: 318)
gRNA I	TGAATATCTCCAACAAGATC (配列番号: 309)
	GATCTTGTTGGAGATATTCA (配列番号: 319)
gRNA J	GTTGTAGAGAAATATTTCTC (配列番号: 310)
	GAGAAATATTTCTCTACAAC (配列番号: 320)
gRNA O2	ATATAATCAACTCCTCTGCC (配列番号: 340)
	GGCAGAGGAGTTGATTATAT (配列番号: 341)
gRNA P2	AATAGACACTTACCAGGCAG (配列番号: 342)
	CTGCCTGGTAAGTGTCTATT (配列番号: 343)

10

20

30

40

50

【表 10】

表10. 様々なgRNAにより結合されたヒトCLL-1の例示的な標的ドメインが本明細書に提供される。各標的ドメインについて、第1の配列は、ヒトCLL-1ゲノム配列中の好適なPAMに隣接するDNA標的配列を表し、第2の配列は、例示的な好適なgRNA標的化ドメイン配列を表す。

	配列	PAM
gRNA A	CCCAGAAATTGGCAAATTTG (配列番号: 301)	GGG
	CCCAGAAAUUGGCAAUUUG (配列番号: 321)	
gRNA B	ATTCCAGAACTCCAGTGAGA (配列番号: 302)	TGG
	AUUCAGAACUCCAGUGAGA (配列番号: 322)	
gRNA C	GAGCTATATAGCAAAGAACA (配列番号: 303)	AGG
	GAGCUAUUAGCAAAGAACA (配列番号: 323)	
gRNA D	GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (配列番号: 304)	TGG
	GGUGGCUAUUGUUUGCAGUG (配列番号: 324)	
gRNA E	TTGTTTGCAGTGTGGTGGAG (配列番号: 305)	AGG
	UUGUUUGCAGUGUGGUGGAG (配列番号: 325)	
gRNA F	TAGCTCACGACATAATTTGG (配列番号: 306)	TGG
	UAGCUCACGACAUAAUUUGG (配列番号: 326)	
gRNA G	GGCTATTGTTTGCAGTGTGG (配列番号: 307)	TGG
	GGCUAUUGUUUGCAGUGUGG (配列番号: 327)	
gRNA H	GGAGAGGTTCTGATCTTGT (配列番号: 308)	TGG
	GGAGAGGUUCCUGAUCUUGU (配列番号: 328)	
gRNA I	TGAATATCTCCAACAAGATC (配列番号: 309)	AGG
	UGAAUAUCUCCAACAAGAUC (配列番号: 329)	
gRNA J	GTTGTAGAGAAATATTTCTC (配列番号: 310)	TGG
	GUUGUAGAGAAAUUUUCUC (配列番号: 330)	
gRNA O2	ATATAATCAACTCCTCTGCC (配列番号: 340)	TGG
	AUAUAAUCAACUCCUCUGCC (配列番号: 344)	
gRNA P2	AATAGACACTTACCAGGCAG (配列番号: 342)	AGG
	AAUAGACACUUACCAGGCAG (配列番号: 345)	

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表11. 様々なgRNAにより結合されたヒトCLL-1の例示的な標的ドメインが本明細書に提供される。各標的ドメインについて、ヒトCLL-1ゲノム配列中の好適なPAMに隣接するDNA標的配列が提供される。本明細書に提供される標的ドメインを標的とするgRNAは、その標的化ドメイン内に同等のRNA配列を含み得る。

	配列番号:	配列	PAM
gRNA K	400	ATGCAGAAGTCAAATTTGAA	AGG
gRNA L	401	TCAAATTTGACTTCTGCATG	TGG
gRNA M	402	TTTGACTTCTGCATGTGGAT	AGG
gRNA N	403	GGATAGGTGAGTGTCTTTTG	TGG
gRNA O	404	TTTCCATCTCACTGGAGTTC	TGG
gRNA P	405	TGGGATTTTTTCCATCTCAC	TGG
gRNA Q	406	ATGGAAAAAATCCCAGAAAT	TGG

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

gRNA R	407	ATCCCAGAAATTGGCAAATT	TGG
gRNA S	408	TCCCAGAAATTGGCAAATTT	GGG
gRNA T	409	CCCCAAATTTGCCAATTTCT	GGG
gRNA U	410	TCCCCAAATTTGCCAATTTTC	TGG
gRNA V	411	ATTGGCAAATTTGGGGAAAA	AGG
gRNA W	412	AAAGGTAAGATTTTGAGTTA	TGG
gRNA X	413	AGAGGGAGCTGGAGGTGCTG	TGG
gRNA Y	414	CTCCAGCTCCCTCTCATGTA	TGG
gRNA Z	415	CATACATGAGAGGGAGCTGG	AGG
gRNA A1	416	CGCCATACATGAGAGGGAGC	TGG
gRNA B1	417	GCTGGACGCCATACATGAGA	GGG
gRNA C1	418	TGCTGGACGCCATACATGAG	AGG
gRNA D1	419	AGAGTCAGAAACAAGGCTGC	TGG
gRNA E1	420	GCACAGAAGAGTCAGAAACA	AGG
gRNA F1	421	CTGTGCCTTCTGTTGCTCAT	TGG
gRNA G1	422	CCTTCTGTTGCTCATTGGAT	TGG
gRNA H1	423	CTTCTGTTGCTCATTGGATT	GGG
gRNA I1	424	CCAATCCAATGAGCAACAGA	AGG
gRNA J1	425	GCTCATTGGATTGGGAGTCT	TGG
gRNA K1	426	ATATAGCTCACGACATAATT	TGG
gRNA L1	427	AAGGTAATCTTGTATTCTCT	TGG

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 3】

gRNA M1	428	CAAGGCTTACATTTGTGCTC	TGG
gRNA N1	429	ACAAATGTAAGCCTTGTCCA	AGG
gRNA O1	430	GTAAGCCTTGTCCAAGGAGA	TGG
gRNA P1	431	CTTGTCCAAGGAGATGGATT	TGG
gRNA Q1	432	CAAATCCATCTCCTTGGACA	AGG
gRNA R1	433	AAGGAGATGGATTTGGCATA	AGG
gRNA S1	434	TTATGCCAAATCCATCTCCT	TGG
gRNA T1	435	TAAGTGATGATGTCCAAACA	TGG
gRNA U1	436	ATGTTTGGACATCATCACTT	AGG
gRNA V1	437	TGATGATGTCCAAACATGGC	AGG
gRNA W1	438	AACATGGCAGGAGAGTAAAA	TGG
gRNA X1	439	TTTTACTCTCCTGCCATGTT	TGG
gRNA Y1	440	GCTGGCATTCTGAGCAGCAC	AGG
gRNA Z1	441	GTTGTTTATCTTCAACAGGC	TGG
gRNA A2	442	TTTTGTTGTTTATCTTCAAC	AGG
gRNA B2	443	GATAAACAACAAAAATGCAT	TGG
gRNA C2	444	AAAATGCATTGGTAAAGCCC	AGG
gRNA D2	445	AGACTATCTGTATTTCTGT	AGG
gRNA E2	446	GGGATTTTATAAATTCCTAC	AGG
gRNA F2	447	AGAGTAGATCATATGACTAT	TGG
gRNA G2	448	ATAGTCATATGATCTACTCT	GGG

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 4】

gRNA H2	449	AATAGTCATATGATCTACTC	TGG
gRNA I2	450	TAGATCATATGACTATTGGC	TGG
gRNA J2	451	AGATCATATGACTATTGGCT	GGG
gRNA K2	452	CCTGAAGAAGATTCCACTCG	TGG
gRNA L2	453	CCACGAGTGAATCTTCTTC	AGG
gRNA M2	454	TTCCACTCGTGGTATGAGAG	TGG
gRNA N2	455	ATCCACTCTCATAACCACGAG	TGG
gRNA Q2	456	AACAAGAATAGACACTTACC	AGG
gRNA R2	457	AATCTTTACTTTCTCTTTC	AGG
gRNA S2	458	ATTCTTTACTTTCTCTTCA	GGG
gRNA T2	459	GACTTAAATAACATGTATTG	TGG
gRNA U2	460	CAATACATGTTATTTAAGTC	AGG
gRNA V2	461	AAGAATGATATGTGAGAAGA	TGG
gRNA W2	462	ATGGCCAATCCAGTGCAGCT	TGG
gRNA X2	463	AGAACCAAGCTGCACTGGAT	TGG
gRNA Y2	464	TATGTAGAACCAAGCTGCAC	TGG
gRNA Z2	465	AGCTTGTTCTACATATTTT	AGG
gRNA A3	466	GCTTGTTCTACATATTTTA	GGG
gRNA B3	467	TGGTTCTACATATTTTAGGG	AGG
gRNA C3	468	ACATATTTTAGGGAGGCATG	AGG
gRNA D3	469	TATTTTGAAGATCAGAGATG	TGG

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 5】

gRNA E3	470	ATCTTCAAAATATCATGATT	TGG
gRNA F3	471	TCTTCAAAATATCATGATTT	GGG
gRNA G3	472	TATCATGATTTGGGTTTTCC	TGG
gRNA H3	473	TCTCTTCTTGTTTTACTTCC	AGG
gRNA I3	474	CTGTCCACCTCTTGCATTA	AGG
gRNA J3	475	CTTAATGCAAAGAGGTGGAC	AGG
gRNA K3	476	CCTCTTGCATTAAGGTAGT	TGG
gRNA L3	477	ACTACCTTAATGCAAAGAGG	TGG
gRNA M3	478	CCAACTACCTTAATGCAAAG	AGG
gRNA N3	479	TTAAGGTAGTTGGTCCACCT	TGG
gRNA O3	480	GAAGGCTGGCATGACCAAGG	TGG
gRNA P3	481	GAGGAAGGCTGGCATGACCA	AGG
gRNA Q3	482	TTAATGTGTGAGAGGAAGGC	TGG
gRNA R3	483	TTATTTAATGTGTGAGAGGA	AGG
gRNA S3	484	AACATTATTTAATGTGTGAG	AGG
gRNA T3	485	ATAATGTTTGTCTCACAGA	AGG
gRNA U3	486	TGTTTGTCTCACAGAAGGT	AGG
gRNA V3	487	GTTTGTCTCACAGAAGGTA	GGG
gRNA W3	488	ATTGTGCTTATTTTCATAAT	GGG
gRNA X3	489	AATTGTGCTTATTTTCATAA	TGG
gRNA Y3	490	GAGTTTTTGGAAAGATGGAAA	AGG

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 6】

gRNA Z3	491	AGGTTTGAGTTTTTGGGAAGA	TGG
gRNA A4	492	CCAAAAACTCAAACCTGTGA	AGG
gRNA B4	493	CAAAAACTCAAACCTGTGAA	GGG
gRNA C4	494	CCTTCACAGGTTTGAGTTTT	TGG
gRNA D4	495	TATTCTAACTTCCCTTCAC	AGG
gRNA E4	496	TCAGAAAATATGTAAGTCAC	TGG
gRNA F4	497	CTGGAAGTGGGAGGATGGCT	CGG
gRNA G4	498	GAGGTCTGGAAGTGGGAGGA	TGG
gRNA H4	499	GAATGAGGTCTGGAAGTGGG	AGG
gRNA I4	500	GTCGAATGAGGTCTGGAAGT	GGG
gRNA J4	501	AGTCGAATGAGGTCTGGAAG	TGG
gRNA K4	502	TCCAGACCTCATTTCGACTTC	TGG
gRNA L4	503	GCCAGAAGTCGAATGAGGTC	TGG
gRNA M4	504	ATCTCGCCAGAAGTCGAATG	AGG
gRNA N4	505	ACTCATTTAATTCGTTGGGT	CGG
gRNA O4	506	CCAACGAATTAAATGAGTCC	TGG
gRNA P4	507	CAGGACTCATTTAATTCGTT	GGG
gRNA Q4	508	CCAGGACTCATTTAATTCGT	TGG
gRNA R4	509	AATAGGAGTACATCAAAGCC	AGG
gRNA S4	510	TGTTTATTTATGTTTACAAT	AGG

10

20

30

40

【0 1 5 1】

代表的な CLL - 1 (NM_138337.6) cDNA 配列を、配列番号 31 として以下に提供する。下線、太字、又は斜体は、gRNA A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、又は O2 (又はその逆補鎖) に対して相補的な領域を示す。2 つ以上のこうした領域の間に重複がある場合、太字及び斜体を使用される。

50

【化 3】

GGCTCATTTCGAGACATATGGGTGATTGGTACAGTAGGTTTATAAACAGAAGTTTAAACTTGTA
 AGCTTAAGCTTCCGTTTATAAACAGAAGTTTAAAATTATAGGTCCTGTTTAACATTCAGCTCTG
 TTAACCTCACTCATCTTTTTGTGTTTTTACACTTTGTCAAGATTTCTTTACATATTCATCAATGT
 CTGAAGAAGTTACTTATGCAGATCTTCAATTCCAGAACTCCAGTGAGATGGAAAAAATCCCAGA
 AATTGGCAAATTTGGGGAAAAAGCACCTCCAGCTCCCTCTCATGTATGGCGTCCAGCAGCCTTG
 TTTCTGACTCTTCTGTGCCTTCTGTTGCTCATTGGATTGGGAGTCTTGGCAAGCATGTTTCACG
 TAACTTTGAAGATAGAAATGAAAAAATGAACAACTACAAAACATCAGTGAAGAGCTCCAGAG
 AAATATTTCTCTACAACCTGATGAGTAACATGAATATCTCCAACAAGATCAGGAACCTCTCCACC
 ACACTGCAAAACAATAGCCACCAAATTATGTCGTGAGCTATATAGCAAAGAACAAGAGCACAAAT
 GTAAGCCTTGTCCAAGGAGATGGATTTGGCATAAGGACAGCTGTTATTTCTAAGTGATGATGT
 CCAAACATGGCAGGAGAGTAAAATGGCCTGTGCTGCTCAGAATGCCAGCCTGTTGAAGATAAAC
 AACAAAAATGCATTGGAATTTATAAAATCCCAGAGTAGATCATATGACTATTGGCTGGGATTAT
 CTCCTGAAGAAGATCCACTCGTGGTATGAGAGTGGATAATATAATCAACTCCTCTGCCTGGGT
 TATAAGAAACGCACCTGACTTAAATAACATGTATTGTGGATATATAAATAGACTATATGTTCAA
 TATTATCACTGCACCTATAAAAAAAGAATGATATGTGAGAAGATGGCCAATCCAGTGCAGCTTG
 GTTCTACATATTTTAGGGAGGCATGAGGCATCAATCAAATACATTTAAGGAGTGTAGGGGGTGG
 GGGTTCTAGGCTATAGGTAAATTTAAATATTTTCTGGTTGACAATTAGTTGAGTTTGTCTGAAG
 ACCTGGGATTTTATCATGCAGATGAAACATCCAGGTAGCAAGCTTCAGAGAGAAATAGACTGTGA
 ATGTTAATGCCAGAGAGGTATAATGAAGCATGTCCCACCTCCCACCTTCCATCATGGCCTGAAC
 CCTGGAGGAAGAGGAAGTCCATTCCAGATAGTTGTGGGGGGCCTTCGAATTTTCATTTTCATTTA
 CGTTCTTCCCCTTCTGGCCAAGATTTGCCAGAGGCAACATCAAAAACCAGCAAATTTTAATTTT
 GTCCCACAGCGTTGCTAGGGTGGCATGGCTCCCCATCTCGGGTCCATCCTATACTTCCATGGGA
 CTCCCTATGGCTGAAGGCCATTATGAGTCAAAGGACTTATAGCCAATTGATTGTTCTAGGCCAGG
 TAAGAATGGATATGGACATGCATTTATTACCTCTTAAAATTATTATTTAAGTAAAAGCCAATA
 AACAAAAACGAAAAGGCAA

10

20

(配列番号 : 6 0 0)

【 0 1 5 2 】

追加の C L L - 1 アイソフォーム (E N S T 0 0 0 0 0 3 5 5 6 9 0 . 8) c D N A は、以下として提供される。

GGAAGAACAGCCTTTCAAATTTGACTTCTGCATGTGGATAGATTTCTTTACATATT
 CATCAATGTCTGAAGAAGTTACTTATGCAGATCTTCAATTCCAGAACTCCAGTGAG
 ATGGAAAAAATCCCAGAAATTGGCAAATTTGGGGAAAAAGCACCTCCAGCTCCCTC
 TCATGTATGGCGTCCAGCAGCCTTGTTTCTGACTTCTGTGCCTTCTGTTGCTCAT
 TGGATTGGGAGTCTTGGCAAGCATGTTTTCACGTAACCTTTGAAGATAGAAATGAAA
 AAATGAACAACTACAAAACATCAGTGAAGAGCTCCAGAGAAATATTTCTCTACAA
 CTGATGAGTAACATGAATATCTCCAACAAGATCAGGAACCTCTCCACCACACTGCA
 AACAATAGCCACCAAATTATGTCGTGAGCTATATAGCAAAGAACAAGAGCACAAAT
 GTAAGCCTTGTCCAAGGAGATGGATTTGGCATAAGGACAGCTGTTATTTCTAAGT
 GATGATGTCCAACATGGCAGGAGAGTAAAATGGCCTGTGCTGCTCAGAATGCCAG
 CCTGTTGAAGATAAACAACAAAATGCATTGGAATTTATAAAATCCCAGAGTAGAT
 CATATGACTATTGGCTGGGATTATCTCCTGAAGAAGATTCCAACCTCGTGGTATGAGA
 GTGGATAATATAATCAACTCCTCTGCCTGGGTTATAAGAAACGCACCTGACTTAAA
 TAACATGTATTGTGGATATATAAATAGACTATATGTTCAATATTATCACTGCACTT
 ATAAAAAAGAATGATATGTGAGAAGATGGCCAATCCAGTGCAGCTTGGTTCTACA
 TATTTTAGGGAGGCATGAGGCATCAATCAAATACATTTAAGGAGTGTAGGGGGTGG
 GGGTTCTAGGCTATAGGTAAATTTAAATATTTTCTGGTTGACAATTAGTTGAGTTT
 GTCTGAAGACCTGGGATTTTATCATGCAGATGAAACATCCAGGTAGCAAGCTTCAG
 AGAGAATAGACTGTGAATGTTAATGCCAGAGAGGTATAATGAAGCATGTCCCACCT
 CCCACTTTCCATCATGGCCTGAACCCTGGAGGAAGAGGAAGTCCATTCAGATAGTT
 GTGGGGGGCCTTCGAATTTTCATTTTCATTTACGTTCTTCCCCTTCTGGCCAAGATT

30

40

50

TGCCAGAGGCAACATCAAAAACCAGCAAATTTTAATTTTGTCCCACAGCGTTGCTA
GGGTGGCATGGCTCCCCATCTCGGGTCCATCCTATACTTCCATGGGACTCCCTATG
GCTGAAGGCCTTATGAGTCAAAGGACTTATAGCCAATTGATTGTTCTAGGCCAGGT
AAGAATGGATATGGACATGCATTTATTACCTCTTAAAATTATTATTTTAAGTAAAA
GCCAATAAACAAAAACGAAAAGGCAA (配列番号 : 6 0 1)

【 0 1 5 3 】

追加の C L L - 1 アイソフォーム (N M _ 0 0 1 2 0 7 0 1 0 . 2) c D N A は、以下
として提供される。

CTATTTAGCATTGCTGCTGCCAGCCCCAACACATTTCTGATTGCCTAGGAAGAAC
AGCCTTTCAAATTTGACTTCTGCATGTGGATAGATTTCTTTACATATTCATCAATGT 10
CTGAAGAAGTTACTTATGCAGATCTTCAATTCCAGAACTCCAGTGAGATGGAAAA
ATCCCAGAAATTGGCAAATTTGGGGAAAAAGCACCTCCAGCTCCCTCTCATGTATG
GCGTCCAGCAGCCTTGTCTGACTCTTCTGTGCCTTCTGTTGCTCATTGGATTGGG
AGTCTTGGCAAGCATGTTTCACGTAACCTTTGAAGATAGAAATGAAAAAATGAACA
AACTACAAAACATCAGTGAAGAGCTCCAGAGAAATATTTCTCTACAACCTGATGAGT
AACATGAATATCTCCAACAAGATCAGGAACCTCTCCACCACACTGCAAACAATAGC
CACCAAATTATGTCGTGAGCTATATAGCAAAGAACAAGAGCACAAATGTAAGCCTT
GTCCAAGGAGATGGATTTGGCATAAAGGACAGCTGTTATTTCCCTAAGTGATGATGTC
CAAACATGGCAGGAGAGTAAAATGGCCTGTGCTGCTCAGAATGCCAGCCTGTTGAA
GATAACAACAATAATGCATTGGAATTTATAAATCCCAGAGTAGATCATATGACT 20
ATTGGCTGGGATTATCTCCTGAAGAAGATTCCACTCGTGGTATGAGAGTGGATAAT
ATAATCAACTCCTCTGCCTGGGTTATAAGAAACGCACCTGACTTAAATAACATGTA
TTGTGGATATATAAATAGACTATATGTTCAATATTATCACTGCACTTATAAAAAA
GAATGATATGTGAGAAGATGGCCAATCCAGTGCAGCTTGGTTCTACATATTTTAGG
GAGGCATGAGGCATCAATCAAATACATTTAAGGAGTGTAGGGGGTGGGGGTTCTAG
GCTATAGGTAAATTTAAATATTTTCTGGTTGACAATTAGTTGAGTTTGTCTGAAGA
CCTGGGATTTTATCATGCAGATGAAACATCCAGGTAGCAAGCTTCAGAGAGAATAG
ACTGTGAATGTTAATGCCAGAGAGGTATAATGAAGCATGTCCCACCTCCCCTTTC
CATCATGGCCTGAACCCTGGAGGAAGAGGAAGTCCATTCCAGATAGTTGTGGGGGGC
CTTCGAATTTTCATTTTACGTTCTTCCCCTTCTGGCCAAGATTTGCCAGAGG 30
CAACATCAAAAACCAGCAAATTTTAATTTTGTCCCACAGCGTTGCTAGGGTGGCAT
GGCTCCCCATCTCGGGTCCATCCTATACTTCCATGGGACTCCCTATGGCTGAAGGC
CTTATGAGTCAAAGGACTTATAGCCAATTGATTGTTCTAGGCCAGGTAAGAATGGA
TATGGACATGCATTTATTACCTCTTAAAATTATTATTTTAAGTAAAAGCCAATAAA
CAAAAACGAAAAGGCAA (配列番号 6 0 2)

【 0 1 5 4 】

追加の C L L - 1 アイソフォーム (N M _ 0 0 1 3 0 0 7 3 0 . 2) c D N A は、以下
として提供される。

GGCTCATTTGCAGACATATGGGTGATTGGTACAGTAGGTTTATAAACAGAAGTTTA
AACTTGTAAGCTTAAGCTTCCGTTTATAAACAGAAGTTTAAAATTATAGGTCCTGT 40
TTAACATTCAGCTCTGTTAACTCACTCATCTTTTTGTGTTTTTACACTTTGTCAAGA
TTTCTTTACATATTCATCAATGTCTGAAGAAGTTACTTATGCAGATCTTCAATTTCCA
GAACTCCAGTGAGATGGAAAAAATCCCAGAAATTGGCAAATTTGGGGAAAAAGCAC
CTCCAGCTCCCTCTCATGTATGGCGTCCAGCAGCCTTGTCTGACTCTTCTGTGCC
TTCTGTTGCTCATTGGATTGGGAGTCTTGGCAAGCATGTTTTCACGTAACCTTTGAAG
ATAGAAATGAAAAAATGAACAACTACAAAACATCAGTGAAGAGCTCCAGAGAAA
TATTTCTCTACAACCTGATGAGTAACATGAATATCTCCAACAAGATCAGGAACCTCT
CCACCACACTGCAAACAATAGCCACCAAATTATGTGCTGAGCTATATAGCAAAGAA
CAAGAGCACAAATGTAAGCCTTGTCCAAGGAGATGGATTTGGCATAAGGACAGCTG
TTATTTCCCTAAGTGATGATGTCCAACATGGCAGGAGAGTAAAATGGCCTGTGCTG 50

CTCAGAATGCCAGCCTGTTGAAGATAAACAAACAAAAATGCATTGGAATTTATAAAA
 TCCCAGAGTAGATCATATGACTATTGGCTGGGATTATCTCCTGAAGAAGATTCCAC
 TCGTGGTATGAGAGTGGATAATATAATCAACTCCTCTGCCTGAAAATATCAAACGA
 AGAAAGAAACCAGAGTCTCAACCTGCTGGACACTATTGGAAGTCCATCATTTAACA
 CGTTTTTAGTATATACTTTTTAGCAGGAGACAGCTCTGAGTCAACTGTGTTGAGGTG
 CCACCACAGCGAGTTTAGGCACTCAGATCCCTGCATACTCATCACATTGGGCCATA
 ATGGCAAATAGAATTTTTTGTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTCTTTTACATAGAA
 ATAGTAAGTGTAGGAGTGTGGGTCAGAAAGAAAAGGTGGCCCTACCTCTGATGGTT
 GGCAATGATAGGATACAATGGGAGATAAGCTATCTACAAATGGAGTGGAGAAGGAT
 ATATATTTCAAAGGCCTAATTTGTAGTGAAAGACTAGAGACAAAGGTAATGTGTGT 10
 GTCAGGAGAGAGTACAGATGGAATCTTGTGTTTTGCAAACGTAGAATATGTATGTGTT
 TGTAATTATTGCAAATGGAATGGTAATCTATAATGGAATGGAAAACATTGTAGATA
 TTTTCAGTTATCAAAAAGAAAAGTATAATAAATTGTATGTATGATAT
 ATATATGTGTGTGTGTGTATATATATCTTCACTTTATAACTCTGTGTTGTTTTGG
 GGTTTGTGTTCTGAAAGGGGGTTGTAATAAATGACATCTGTACTATGTCACCACAAA
 TAAATCTCATTCTTAAACATTTAATTGATGAACTTA (配列番号 : 6 0 3)

【 0 1 5 5 】

追加の C L L - 1 アイソフォーム (N M _ 2 0 1 6 2 3 . 4) c D N A は、以下として
 提供される。

GGCTCATTTGCAGACATATGGGTGATTGGTACAGTAGGTTTATAAACAGAAGTTTA 20
 AACTTGTAAGCTTAAGCTTCCGTTTATAAACAGAAGTTTAAAATTATAGGTCCTGT
 TTAACATTCAGCTCTGTTAACTCACTCATCTTTTTGTGTTTTTACACTTTGTCAAGA
 TTTCTTTACATATTCATCAATGTCTGAAGAAGTTACTTATGCAGATCTTCAATTCCA
 GAACTCCAGTGAGATGGAAAAATCCAGAAATTGGCAAATTTGGGGAAAAAGTTC
 ACGTAACTTTGAAGATAGAAATGAAAAAATGAACAACTACAAAACATCAGTGAA
 GAGCTCCAGAGAAATATTTCTTACAACCTGATGAGTAACATGAATATCTCCAACAA
 GATCAGGAACCTCTCCACCACACTGCAAACAATAGCCACCAAATTATGTCGTGAGC
 TATATAGCAAAGAACAAGAGCACAAATGTAAGCCTTGTCCAAGGAGATGGATTTGG
 CATAAGGACAGCTGTTATTTCTAAGTGATGATGTCCAACATGGCAGGAGAGTAA
 AATGGCCTGTGCTGCTCAGAATGCCAGCCTGTTGAAGATAAACAAACAAAAATGCAT 30
 TGGAAATTTATAAAATCCCAGAGTAGATCATATGACTATTGGCTGGGATTATCTCCT
 GAAGAAGATTCCACTCGTGGTATGAGAGTGGATAATATAATCAACTCCTCTGCCTG
 GGTTATAAGAAACGCACCTGACTTAAATAACATGTATTGTGGATATATAAATAGAC
 TATATGTTCAATATTATCACTGCACTTATAAAAAAAGAATGATATGTGAGAAGATG
 GCCAATCCAGTGACGCTTGGTTCTACATATTTTAGGGAGGCATGAGGCATCAATCA
 AATACATTTAAGGAGTGTAGGGGGTGGGGGTTCTAGGCTATAGGTAATTTAAATA
 TTTTCTGGTTGACAATTAGTTGAGTTTGTCTGAAGACCTGGGATTTTATCATGCAG
 ATGAAACATCCAGGTAGCAAGCTTCAGAGAGAATAGACTGTGAATGTTAATGCCAG
 AGAGGTATAATGAAGCATGTCCCACCTCCACTTTCCATCATGGCCTGAACCCTGG
 AGGAAGAGGAAGTCCATTAGATAGTTGTGGGGGGCCTTCGAATTTTCATTTTCAT 40
 TTACGTTCTTCCCCTTCTGGCCAAGATTTGCCAGAGGCAACATCAAAAACCAGCAA
 ATTTTAATTTTGTCCCACAGCGTTGCTAGGGTGGCATGGCTCCCCATCTCGGGTCC
 ATCCTATACTTCCATGGGACTCCCTATGGCTGAAGGCCTTATGAGTCAAAGGACTT
 ATAGCCAATTGATTGTTCTAGGCCAGGTAAGAATGGATATGGACATGCATTTATTA
 CCTCTTAAATTTATTATTTTAAAGTAAAAGCCAATAAACAAAAACGAAAAGGCAA (配列番号 6 0 4)

【 0 1 5 6 】

C D 1 2 3 を 標 的 と す る g R N A

本開示は、エンドヌクレアーゼをヒト C D 1 2 3 に標的化することができる多数の有用
 な g R N A を提供する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼをヒト C D 3 3 に 50

標的化することができるgRNAは、PCT公開第WO2020/047164号及び第WO2021/041977号のいずれかに開示されているgRNAであり、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。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CD123内の標的ドメインを例証する。
【表12】

表12. 様々なgRNAにより結合されたヒトCD123の例示的な標的ドメインが本明細書に記載される。各標的ドメインについて、第1の配列は、好適なgRNAによって標的化され得る標的ドメイン配列に対応する20ヌクレオチドDNA配列を表し、これは、同等のRNA標的化ドメイン配列(DNAヌクレオチドの代わりにRNAヌクレオチドを含む)を含み得、第2の配列は、その逆相補鎖である。太字は、配列が、配列番号700として以下に示されるヒトCD123 cDNA配列中に存在することを示す。

	標的ドメイン配列
gRNA A	GCCCTGTCTCCTGCAAACGA (配列番号: 801)
	TCGTTTGCAGGAGACAGGGC (配列番号: 811)
gRNA B	TGAGCCAAAGGAGGACCATC (配列番号: 802)
	GATGGTCCTCCTTTGGCTCA (配列番号: 812)
gRNA C	TCAGGAGCAGCGTGAGCCAA (配列番号: 803)
	TTGGCTCACGCTGCTCCTGA (配列番号: 813)
gRNA D	TCCTTCGTTTGCAGGAGACA (配列番号: 804)
	TGTCTCCTGCAAACGAAGGA (配列番号: 814)
gRNA E	ATCCACGTCATGAATCCAGC (配列番号: 805)
	GCTGGATTTCATGACGTGGAT (配列番号: 815)
gRNA F	CAGGTCGTACTGGACGTCCG (配列番号: 806)
	CGGACGTCCAGTACGACCTG (配列番号: 816)
gRNA G	TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (配列番号: 807)
	CCCAGCTGCAGCTCAAGAAA (配列番号: 817)
gRNA H	GGTCGTACTGGACGTCCGCG (配列番号: 808)
	CGCGGACGTCCAGTACGACC (配列番号: 818)
gRNA I	AGTTCCACATCCTGGTGCG (配列番号: 809)
	CGCACCAGGATGTGGAACT (配列番号: 819)
gRNA J	CACTACAAAACGGATGCTCA (配列番号: 810)
	TGAGCATCCGTTTTGTAGTG (配列番号: 820)
gRNA D1	TTCATCCTTAGGTTTCGTGAT (配列番号: 840)
	ATCACGAACCTAAGGATGAA (配列番号: 841)
gRNA N3	TTGACGCCTGCTGCGGTAAG (配列番号: 842)
	CTTACCGCAGCAGGCGTCAA (配列番号: 843)
gRNA P3	CGAGTGTCTTCACTACAAA (配列番号: 844)
	TTTTGTAGTGAAGACACTCG (配列番号: 845)
gRNA S3	ATGCTCAGGGAACACGTATC (配列番号: 846)
	GATACGTGTTCCCTGAGCAT (配列番号: 847)

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表13. 様々なgRNAにより結合されたヒトCD123の例示的な標的ドメインが本明細書に提供される。各標的ドメインについて、第1の配列は、ヒトCD123ゲノム配列中の好適なPAMに隣接するDNA標的配列を表し、第2の配列は、例示的な同等のgRNA標的化ドメイン配列を表す。

	配列	PAM
gRNA A	GCCCTGTCTCCTGCAAACGA (配列番号: 801)	AGG
	GCCCUGUCUCCUGCAAACGA (配列番号: 821)	
gRNA B	TGAGCCAAAGGAGGACCATC (配列番号: 802)	GGG
	UGAGCCAAAGGAGGACCAUC (配列番号: 822)	
gRNA C	TCAGGAGCAGCGTGAGCCAA (配列番号: 803)	AGG
	UCAGGAGCAGCGUGAGCCAA (配列番号: 823)	
gRNA D	TCCTTCGTTTGAGGAGACA (配列番号: 804)	GGG
	UCCUUCGUUUGCAGGAGACA (配列番号: 824)	
gRNA E	ATCCACGTCATGAATCCAGC (配列番号: 805)	AGG
	GCUGGAUUCAUGACGUGGAU (配列番号: 825)	
gRNA F	CAGGTCGACTGGACGTCCG (配列番号: 806)	CGG
	CAGGUCGUACUGGACGUCCG (配列番号: 826)	
gRNA G	TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (配列番号: 807)	CGG
	UUUCUUGAGCUGCAGCUGGG (配列番号: 827)	
gRNA H	GGTCGACTGGACGTCCGCG (配列番号: 808)	GGG
	GGUCGUACUGGACGUCCGCG (配列番号: 828)	
gRNA I	AGTCCCACATCCTGGTGCG (配列番号: 809)	GGG
	AGUUCCACAUCCUGGUGCG (配列番号: 829)	
gRNA J	CACTACAAAACGGATGCTCA (配列番号: 810)	GGG
	UGAGCAUCCGUUUUGUAGUG (配列番号: 830)	
gRNA D1	TTCATCCTTAGGTTTCGTGAT (配列番号: 840)	TGG
	UUCAUCCUUAGGUUCGUGAU (配列番号: 848)	
gRNA N3	TTGACGCCTGCTGCGGTAAG (配列番号: 842)	CGG
	UUGACGCCUGCUGCGGUAAG (配列番号: 849)	
gRNA P3	CGAGTGTCTTCACTACAAAA (配列番号: 844)	CGG
	CGAGUGUCUUCACUACAAAA (配列番号: 850)	
gRNA S3	ATGCTCAGGGAACACGTATC (配列番号: 846)	GGG
	AUGCUCAGGGAACACGUAUC (配列番号: 851)	

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1】

表14. 様々なgRNAにより結合されたヒトCD123の例示的な標的ドメインが本明細書に提供される。各標的ドメインについて、ヒトCD123ゲノム配列中の好適なPAMに隣接するDNA標的配列が提供される。本明細書に提供される標的ドメインを標的とするgRNAは、その標的化ドメイン内に同等のRNA配列を含み得る。

	配列番号	配列	PAM
gRNA K	900	TTCCGGAGCTGCGTTCCCGA	TGG
gRNA L	901	GACCATCGGGAACGCAGCTC	CGG
gRNA M	902	CGTTCCCGATGGTCCTCCTT	TGG
gRNA N	903	GTGAGCCAAAGGAGGACCAT	CGG
gRNA O	904	GGAGCAGCGTGAGCCAAAGG	AGG
gRNA P	905	GGAGACAGGGCAGGGCGATC	AGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

gRNA Q	906	CGTTTGCAGGAGACAGGGCA	GGG
gRNA R	907	TCGTTTGCAGGAGACAGGGC	AGG
gRNA S	908	TGTCTCCTGCAAACGAAGGA	AGG
gRNA T	909	TTCTTCGTTTGCAGGAGAC	AGG
gRNA U	910	TCTTACCTTCCTTCGTTTGC	AGG
gRNA V	911	AAACGAAGGAAGGTAAGAAC	TGG
gRNA W	912	GATCTAAAACGGTGACAGGT	TGG
gRNA X	913	TTTGGATCTAAAACGGTGAC	AGG
gRNA Y	914	TGGTGGGTTTGGATCTAAAA	CGG
gRNA Z	915	AGGTTCGTGATTGGTGGGTT	TGG
gRNA A1	916	ACCCACCAATCACGAACCTA	AGG
gRNA B1	917	TCCTTAGGTTTCGTGATTGGT	GGG
gRNA C1	918	ATCCTTAGGTTTCGTGATTGG	TGG
gRNA E1	919	GAACCTAAGGATGAAAGCAA	AGG
gRNA F1	920	GAGCCTTTGCTTTCATCCTT	AGG
gRNA G1	921	CAAAGGCTCAGCAGTTGACC	TGG
gRNA H1	922	AAAGGCTCAGCAGTTGACCT	GGG
gRNA I1	923	CACATTTCTGTTAAGGTCCC	AGG
gRNA J1	924	TATCGGTCACATTTCTGTTA	AGG
gRNA K1	925	GTCTTTAACACACTCGATAT	CGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

gRNA L1	926	AGACGCCGACTATTCTATGC	CGG
gRNA M1	927	ATTTACCGGCATAGAATAGT	CGG
gRNA N1	928	CAATAGAGAGTATGATTTAC	CGG
gRNA O1	929	CATAGTCCTATGTCTCTCTT	AGG
gRNA P1	930	TCACTGCCTAAGAGAGACAT	AGG
gRNA Q1	931	AACAATAGCTATTGCCAGTT	TGG
gRNA R1	932	ATAAGGAAATTGCTCCAAAC	TGG
gRNA S1	933	GTAGTTGGTCACTTCACATA	AGG
gRNA T1	934	GACCAACTACACCGTCCGAG	TGG
gRNA U1	935	GGCCACTCGGACGGTGTAGT	TGG
gRNA V1	936	TGGTGGGTGGCCACTCGGA	CGG
gRNA W1	937	AGAATGGTGGGTGGCCACT	CGG
gRNA X1	938	CCAACCCACCATTCTCCACG	TGG
gRNA Y1	939	CCACGTGGAGAATGGTGGGT	TGG
gRNA Z1	940	GGATCCACGTGGAGAATGGT	GGG
gRNA A2	941	AGGATCCACGTGGAGAATGG	TGG
gRNA B2	942	AAGAGGATCCACGTGGAGAA	TGG
gRNA C2	943	CTCAGGGAAGAGGATCCACG	TGG
gRNA D2	944	TCTCACTGTTCTCAGGGAAG	AGG
gRNA E2	945	CATTTTCTCACTGTTCTCA	GGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 4】

gRNA F2	946	ACATTTTTCTCACTGTTCTC	AGG
gRNA G2	947	TCTTTCATGTTTGTGAACCC	AGG
gRNA H2	948	TTCATGTTTGTGAACCCAGG	TGG
gRNA I2	949	TCATGTTTGTGAACCCAGGT	GGG
gRNA J2	950	TGAACCCAGGTGGGAAGCCT	TGG
gRNA K2	951	GAACCCAGGTGGGAAGCCTT	GGG
gRNA L2	952	CCAGGTGGGAAGCCTTGGGC	AGG
gRNA M2	953	CTGCCCAAGGCTTCCCACCT	GGG
gRNA N2	954	CCTGCCCAAGGCTTCCCACC	TGG
gRNA O2	955	TGGGAAGCCTTGGGCAGGTG	CGG
gRNA P2	956	AGATTCTCCGCACCTGCCCA	AGG
gRNA Q2	957	GTGCGGAGAATCTGACCTGC	TGG
gRNA R2	958	GACCTGCTGGATTCATGACG	TGG
gRNA S2	959	TGGATTTCTTGAGCTGCAGC	TGG
gRNA T2	960	GGATTTCTTGAGCTGCAGCT	GGG
gRNA U2	961	TTGAGCTGCAGCTGGGCGGT	AGG
gRNA V2	962	CTGCAGCTGGGCGGTAGGCC	CGG
gRNA W2	963	TGCAGCTGGGCGGTAGGCC	GGG
gRNA X2	964	GCAGCTGGGCGGTAGGCCCG	GGG
gRNA Y2	965	CAGCTGGGCGGTAGGCCCGG	GGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 5】

gRNA Z2	966	GGTAGGCCCGGGGGCCCCCG	CGG
gRNA A3	967	GGACGTCCGCGGGGGCCCC	GGG
gRNA B3	968	TGGACGTCCGCGGGGGCCCC	CGG
gRNA C3	969	GTCGTA CTGGACGTCCGCGG	GGG
gRNA D3	970	AGGTCGTA CTGGACGTCCGC	GGG
gRNA E3	971	CGTTCAAGTACAGGTCGTAC	TGG
gRNA F3	972	GTACTTGAACGTTGCCAAGT	AGG
gRNA G3	973	ACTTGGCAACGTTCAAGTAC	AGG
gRNA H3	974	TTGCCAAGTAGGTGTGCCCG	TGG
gRNA I3	975	TGCCAAGTAGGTGTGCCCGT	GGG
gRNA J3	976	TGCCCACGGGCACACCTACT	TGG
gRNA K3	977	ACCTTACCGCTTACCGCAGC	AGG
gRNA L3	978	GCTGCGGTAAGCGGTAAGGT	TGG
gRNA M3	979	GCCTGCTGCGGTAAGCGGTA	AGG
gRNA O3	980	CGTACTGTTGACGCCTGCTG	CGG
gRNA Q3	981	TCACTACAAAACGGATGCTC	AGG
gRNA R3	982	GATGCTCAGGGAACACGTAT	CGG
gRNA T3	983	GACATCTCTCGACTCTCCAG	CGG
gRNA U3	984	GTGGGAAC TTTGAGAACCGC	TGG
gRNA V3	985	TTCTCAAAGTTCCCACATCC	TGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 6】

gRNA W3	986	AAAGTTCCCACATCCTGGTG	CGG
gRNA X3	987	AAGTCCCACATCCTGGTGC	GGG
gRNA Y3	988	CCCACATCCTGGTGCGGGGC	AGG
gRNA Z3	989	CCTGCCCCGCACCAGGATGT	GGG
gRNA A4	990	TCCTGCCCCGCACCAGGATG	TGG
gRNA B4	991	CTGCGCTCCTGCCCCGCACC	AGG
gRNA C4	992	CGGGGCAGGAGCGCAGCCTT	CGG
gRNA D4	993	ATCTGTGCAGGGGATACCGA	AGG
gRNA E4	994	CGACAAACTTATCTGTGCAG	GGG
gRNA F4	995	ACGACAAACTTATCTGTGCA	GGG
gRNA G4	996	GACGACAAACTTATCTGTGC	AGG
gRNA H4	997	TTGTGCTCTTTTCACAGAT	TGG
gRNA I4	998	TCACAGATTGGTGAGTAGCC	CGG
gRNA J4	999	CACAGATTGGTGAGTAGCCC	GGG
gRNA K4	1000	CACTTGCAGTCATGTTGGG	TGG
gRNA L4	1001	TTACACTTGCAGTCATGTT	GGG
gRNA M4	1002	ATTACACTTGCAGTCATGT	TGG
gRNA N4	1003	AGACACATTCCTTTATGCAC	TGG
gRNA O4	1004	TCTCATTTCCAGTGCATAA	AGG
gRNA P4	1005	CTATGAGCTTCAGATACAAA	AGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 7】

gRNA Q4	1006	GCAGCCTGTAATCACAGAAC	AGG
gRNA R4	1007	CTCACCTGTTCTGTGATTAC	AGG
gRNA S4	1008	TTTATTTTCTTTCAAACCAC	AGG
gRNA T4	1009	GAGGTTCTGTCTCTGACCTG	TGG
gRNA U4	1010	TCCTTCCAGCTACTCAATCC	TGG
gRNA V4	1011	AGGATTGAGTAGCTGGAAGG	AGG
gRNA W4	1012	TCCAGGATTGAGTAGCTGGA	AGG
gRNA X4	1013	ACGTTCCAGGATTGAGTAGC	TGG
gRNA Y4	1014	ATTTGTACTGTGTACGTTCC	AGG
gRNA Z4	1015	ACACAGTACAAATAAGAGCC	CGG
gRNA A5	1016	CACAGTACAAATAAGAGCCC	GGG
gRNA B5	1017	GAATTCATACACTCTTTCCC	GGG
gRNA C5	1018	AGAATTCATACACTCTTTCC	CGG
gRNA D5	1019	TGTATGAATTCTTGAGCGCC	TGG
gRNA E5	1020	TGGAGCACCCCCAGCGCTT	CGG
gRNA F5	1021	GAAGCGCTGGGGGTGCTCC	AGG
gRNA G5	1022	CCCCCAGCGCTTCGGTGAG	TGG
gRNA H5	1023	CCCCCAGCGCTTCGGTGAGT	GGG
gRNA I5	1024	CCACTCACCGAAGCGCTGGG	GGG
gRNA J5	1025	CCCACTCACCGAAGCGCTGG	GGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 8】

gRNA K5	1026	GCCCCACTCACCGAAGCGCTG	GGG
gRNA L5	1027	AGCCCCACTCACCGAAGCGCT	GGG
gRNA M5	1028	CAGCCCCACTCACCGAAGCGC	TGG
gRNA N5	1029	GCTTCGGTGAGTGGGCTGTG	CGG
gRNA O5	1030	CTTCGGTGAGTGGGCTGTGC	GGG
gRNA P5	1031	TTCGGTGAGTGGGCTGTGCG	GGG
gRNA Q5	1032	TCTAGGGGTAAAGGGTGAGA	GGG
gRNA R5	1033	CTCTAGGGGTAAAGGGTGAG	AGG
gRNA S5	1034	TTTACCCCTAGAGTGCGACC	AGG
gRNA T5	1035	GGTTCGCACTCTAGGGGTAAA	GGG
gRNA U5	1036	TGGTCGCACTCTAGGGGTAA	AGG
gRNA V5	1037	ACCCCTAGAGTGCGACCAGG	AGG
gRNA W5	1038	CCTAGAGTGCGACCAGGAGG	AGG
gRNA X5	1039	CTAGAGTGCGACCAGGAGGA	GGG
gRNA Y5	1040	TCCTCCTGGTCGCACTCTAG	GGG
gRNA Z5	1041	CTCCTCCTGGTCGCACTCTA	GGG
gRNA A6	1042	CCTCCTCCTGGTCGCACTCT	AGG
gRNA B6	1043	GTGTGTTTGCGCCCTCCTCC	TGG
gRNA C6	1044	AGGGCGCAAACACACGTGCC	TGG
gRNA D6	1045	GCGCAAACACACGTGCCTGG	CGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 9】

gRNA E6	1046	GATCAGCAGCGACGTCCGCC	AGG
gRNA F6	1047	GACGTCGCTGCTGATCGCGC	TGG
gRNA G6	1048	ACGTCGCTGCTGATCGCGCT	GGG
gRNA H6	1049	CGTCGCTGCTGATCGCGCTG	GGG
gRNA I6	1050	GATCGCGCTGGGGACGCTGC	TGG
gRNA J6	1051	GCTGGGGACGCTGCTGGCCC	TGG
gRNA K6	1052	GATCACGAAGACACAGACCA	GGG
gRNA L6	1053	AGATCACGAAGACACAGACC	AGG
gRNA M6	1054	GTGTCTTCGTGATCTGCAGA	AGG
gRNA N6	1055	CTGCAGAAGGTGAGCCCTCG	AGG
gRNA O6	1056	TGCAGAAGGTGAGCCCTCGA	GGG
gRNA P6	1057	GGCCATTTCTCTTTCCTCCG	AGG
gRNA Q6	1058	TACCTCGGAGGAAAGAGAAA	TGG
gRNA R6	1059	TCTCTTTCCTCCGAGGTATC	TGG
gRNA S6	1060	TGCATCACCAGATACCTCGG	AGG
gRNA T6	1061	CTCTGCATCACCAGATACCT	CGG
gRNA U6	1062	TCTTTCATGTGAGGGATGCG	GGG
gRNA V6	1063	GTCTTTCATGTGAGGGATGC	GGG
gRNA W6	1064	GGTCTTTCATGTGAGGGATG	CGG
gRNA X6	1065	CCTCACATGAAAGACCCCAT	CGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1 0】

gRNA Y6	1066	CGATGGGGTCTTTCATGTGA	GGG
gRNA Z6	1067	CCGATGGGGTCTTTCATGTG	AGG
gRNA A7	1068	TTTGAAGCTGTCACCGATG	GGG
gRNA B7	1069	TTTTGAAGCTGTCACCGAT	GGG
gRNA C7	1070	GTTTTGAAGCTGTCACCGA	TGG
gRNA D7	1071	CAGCTTCCAAAACGACAAGC	TGG
gRNA E7	1072	AACATACCAGCTTGTCGTTT	TGG
gRNA F7	1073	CTGCCTCCTCTCGTCTCTGC	AGG
gRNA G7	1074	CCTCCTCTCGTCTCTGCAGG	TGG
gRNA H7	1075	CCACCTGCAGAGACGAGAGG	AGG
gRNA I7	1076	TCTCGTCTCTGCAGGTGGTC	TGG
gRNA J7	1077	CTCGTCTCTGCAGGTGGTCT	GGG
gRNA K7	1078	AGACCACCTGCAGAGACGAG	AGG
gRNA L7	1079	GTCTCTGCAGGTGGTCTGGG	AGG
gRNA M7	1080	TCTGCAGGTGGTCTGGGAGG	CGG
gRNA N7	1081	CTGCAGGTGGTCTGGGAGGC	GGG
gRNA O7	1082	GTCTGGGAGGCGGGCAAAGC	CGG
gRNA P7	1083	GGAGGCGGGCAAAGCCGGCC	TGG
gRNA Q7	1084	GGCGGGCAAAGCCGGCCTGG	AGG
gRNA R7	1085	AGCCGGCCTGGAGGAGTGTC	TGG

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1 1】

gRNA S7	1086	CACCAGACACTCCTCCAGGC	CGG
gRNA T7	1087	CAGTCACCAGACACTCCTCC	AGG
gRNA U7	1088	GTGTCTGGTGACTGAAGTAC	AGG
gRNA V7	1089	TCGTGCAGAAAACCTTGAGAC	TGG
gRNA W7	1090	CGTGCAGAAAACCTTGAGACT	GGG
gRNA X7	1091	GTGCAGAAAACCTTGAGACTG	GGG
gRNA Y7	1092	AAAACCTTGAGACTGGGGTTC	AGG
gRNA Z7	1093	AAACCTTGAGACTGGGGTTCA	GGG
gRNA A8	1094	AGACTGGGGTTCAGGGCTTG	TGG
gRNA B8	1095	GACCTGCTGGATTCATGACG	TGG
gRNA C8	1096	GTCGTACTGGACGTCCGCGG	GGG
gRNA D8	1097	GGTCGTACTGGACGTCCGCG	GGG

10

20

30

【 0 1 5 7】

代表的な CD 1 2 3 (NM_001267713.1) cDNA 配列を、配列番号 3 1 として以下に提供する。下線又は太字は、gRNA A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、P 3、又は S 3 (又はその逆補鎖) に対して相補的な領域を示す。2つのこうした領域の間に重複がある場合、太字が使用される。

40

50

【化 4】

GTCAGGTTTCATGGTTACGAAGCTGCTGACCCCAGGATCCCAGCCCGTGGGAGAGAAGGGGGTCT
 CTGACAGCCCCCACCCCTCCCCACTGCCAGATCCTTATTGGGTCTGAGTTTCAGGGGTGGGGCC
 CCAGCTGGAGGTTATAAAACAGCTCAATCGGGGAGTACAACCTTCGGTTTCTCTTCGGGGAAAG
 CTGCTTTCAGCGCACACGGGAAGATATCAGAAACATCCTAGGATCAGGACACCCCAGATCTTCT
 CAACTGGAACCACGAAGGCTGTTTCTTCCACACAGTACTTTGATCTCCATTTAAGCAGGCACCT
 CTGTCCTGCGTTCCGGAGCTGCGTTCCCGATGGTCTCTCT**TTGGCTCAGCTGCTCCTGATCGC**
 CCTGCCCT**TGTCTCCTGCAAACGAAGGA**AGGTGGGAAGCCTTGGGCAGGTGCGGAGAATCTGACC
TGCTGGATTTCATGACGTGGATTTCTTGAGCTGCAGCTGGGCGGTAGGCCCGGGGGCCCCCGCGG
ACGTCCAGTACGACCTGTACTTGAACGTTGCCAACAGGCGTCAACAGTACGAGTGTCTTCACTA
CAAAACGGATGCTCAGGGAACACGTATCGGGTGTGTTTTCGATGACATCTCTCGACTCTCCAGC 10
 GGTTCTCAAAGTTCCACATCCTGGTGGGGGCAGGAGCGCAGCCTTCGGTATCCCCTGCACAG
 ATAAGTTTGTGCTCTTTTCACAGATTGAGATATTAACCTCCACCCAACATGACTGCAAAGTGTA
 TAAGACACATTCCTTTATGCACTGGAAAATGAGAAGTCATTTCAATCGCAAATTTTCGCTATGAG
 CTTTACAGATACAAAGAGAATGCAGCCTGTAATCACAGAACAGGTGAGAGACAGAACCTCCTTCC
 AGCTACTCAATCCTGGAACGTACACAGTACAAATAAGAGCCCGGGAAAGAGTGTATGAATTCTT
 GAGCGCCTGGAGCACCCCCCAGCGCTTCGAGTGCAGCAGGAGGAGGGCGCAAACACACGTGCC
 TGGCGGACGTCGCTGCTGATCGCGCTGGGGACGCTGCTGGCCCTGGTCTGTGTCTTCGTGATCT
 GCAGAAGGTATCTGGTGATGCAGAGACTCTTTCCCCGCATCCCTCACATGAAAAGACCCCATCGG
 TGACAGCTTCCAAAACGACAAGCTGGTGGTCTGGGAGGCGGGCAAAGCCGGCCCTGGAGGAGTGT
 CTGGTGACTGAAGTACAGGTCGTGCAGAAAACCTTGAGACTGGGGTTCAGGGCTTGTGGGGTCT
 GCCTCAATCTCCCTGGCCGGGCCAGGCGCCTGCACAGACTGGCTGCTGGACCTGCGCACGCAGC 20
 CCAGGAATGGACATTCCTAACGGGTGGTGGGCATGGGAGATGCCTGTGTAATTTTCGTCCGAAGC
 TGCCAGGAAGAAGAACAGAACCTTTGTGTGTTATTTTCATGATAAAGTGATTTTTTTTTTTTAA
 CCAAAA

10

20

(配列番号 7 0 0)

【 0 1 5 8 】

追加の C D 1 2 3 アイソフォーム (N M _ 0 0 2 1 8 3 . 4) c D N A は、以下として
提供される。

30

40

50

【化 5】

CTTCGGTTTTCTCTTCGGGGAAAGCTGCTTTTCAGCGCACACGGGAAAGATATCAGAAACATCCTAG
 GATCAGGACACCCAGATCTTCTCAACTGGAACCACGAAGGCTGTTTCTTCCACACAGTACTTT
 GATCTCCATTTAAGCAGGCACCTCTGTCTCGCTTCCGGAGCTGCGTTCCCGATGGTCCTCCTT
 TGGCTCACGCTGCTCCTGATCGCCCTGCCCTGTCTCCTGCAAACGAAGGAAGATCCAAACCCAC
 CAATCACGAACCTAAGGATGAAAGCAAAGGCTCAGCAGTTGACCTGGGACCTAACAGAAATGT
 GACCGATATCGAGTGTGTTAAAGACGCCGACTATTCTATGCCGGCAGTGAACAATAGCTATTGC
 CAGTTTGGAGCAATTTCTTATGTGAAGTGACCAACTACACCGTCCGAGTGGCCAACCCACCAT
 TCTCCACGTGGATCCTCTTCCCTGAGAACAGTGGGAAGCCTTGGGCAGGTGCGGAGAATCTGAC
 CTGCTGGATTTCATGACGTGGATTTCTTGAGCTGCAGCTGGGCGGTAGGCCCGGGGGCCCCGCG
 GACGTCCAGTACGACCTGTACTTGAACGTGCCAACAGGCGTCAACAGTACGAGTGTCTTCACT
 ACAAACGGATGCTCAGGGAACACGTATCGGGTGTCTGTTTCGATGACATCTCTCGACTCTCCAG
 CGGTTCTCAAAGTCCCACATCCTGGTGCGGGGCAGGAGCGCAGCCTTCGGTATCCCCTGCACA
 GATAAGTTTGTCTCTTTTACAGATTGAGATATTAACCCACCAACATGACTGCAAAGTGTA
 ATAAGACACATTCCTTTATGCACTGGAAAATGAGAAGTCATTTCAATCGCAAATTTGCTATGA
 GCTTCAGATACAAAAGAGAATGCAGCCTGTAATCACAGAACAGGTGAGAGACAGAACCCTCCTTC
 CAGCTACTCAATCCTGGAACGTACACAGTACAAATAAGAGCCCCGGGAAAGAGTGTATGAATTCT
 TGAGCGCCTGGAGCACCCCCAGCGCTTCGAGTGCAGACCAGGAGGAGGGCGCAAACACACGTGC
 CTGGCGGACGTCGCTGCTGATCGCGCTGGGGACGCTGCTGGCCCTGGTCTGTGTCTTCGTGATC
 TGCAGAAGGTATCTGGTGTGATGCAGAGACTCTTCCCGCATCCCTCACATGAAAGACCCCATCG
 GTGACAGCTTCCAAAACGACAAGCTGGTGGTCTGGGAGGCGGGCAAAGCCGGCCTGGAGGAGTG
 TCTGGTACTGAAGTACAGGTTCGTGCAGAAAACCTTGAGACTGGGGTTCAGGGCTTGTGGGGGTC
 TGCCTCAATCTCCCTGGCCGGGCCAGGCGCCTGCACAGACTGGCTGCTGGACCTGCGCACGCGAG
 CCCAGGAATGGACATTCCTAACGGGTGGTGGGCATGGGAGATGCCTGTGTAATTTGCTCCGAAG
 CTGCCAGGAAGAAGAACAAGAACTTTGTGTGTTTATTTTCATGATAAAGTGATTTTTTTTTTTTA
 ACCCA

10

20

(配列番号 701)

【0159】

下線は、gRNA D1 (又はその逆補鎖) に対して相補的な領域を示す。

【0160】

CD327 (Siglec-6) を標的とする gRNA

30

本開示は、エンドヌクレアーゼを Siglec-6 としても知られるヒト CD327 に
 標的化することができる多数の有用な gRNA を提供する。いくつかの実施形態では、同
 等の RNA 標的化ドメイン配列 (DNA ヌクレオチドの代わりに RNA ヌクレオチドを含
 む) を含み得る、好適な gRNA によって標的化され得る標的ドメイン配列は、約 16 ~
 約 30 ヌクレオチドのヒト CD327 アイソフォームを含み、例えば、CD327 (EN
 SG00000105492) アイソフォーム ENST00000425629.8、E
 NST00000346477.7、ENST00000359982.8、ENST0
 0000343300.8、ENST00000436458.5、ENST00000
 391797.3、ENST00000474054.1、ENST000004964
 22.5、又は ENST00000489837.1 の核酸及びアミノ酸配列を有する。

40

【0161】

CD312 (EMR2) を標的とする gRNA

本開示は、エンドヌクレアーゼを CD312 としても知られるヒト EMR2 に標的化す
 ることができる多数の有用な gRNA を提供する。以下の表 18 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 EMR2 内の標的ドメインを例証する。いく
 つかの実施形態では、同等の RNA 標的化ドメイン配列 (DNA ヌクレオチドの代わりに
 RNA ヌクレオチドを含む) を含み得る、好適な gRNA によって標的化され得る標的ド
 メイン配列は、約 16 ~ 約 30 ヌクレオチドのヒト CD312 (EMR2) アイソフォー
 ムを含み、例えば、完全長 EMR2 (ENSG00000127507) アイソフォー
 M ENST00000315576.8 (表 19) の核酸及びアミノ酸配列を有する。

50

【表 18】

ABE ガイド	スペーサー配列 (すなわち、標的ドメイン配列)	配列番号	PAM	逆 相補鎖	配列番号
EMR2 ABE sg25	CCTTACCTGTGCAGAGCTT	2005	CGG	AAGCTCTGCACAGGTAGAGG	2012
EMR2 ABE sg26	CTCTACCTGTGCAGAGCTTC	2006	GGG	GAAGCTCTGCACAGGTAGAG	2013
EMR2 ABE sg27	CCTTACCTGGATGGTGTAT	2007	TGG	ATAACACCCATCCAGGTAAGG	2014
EMR2 ABE sg29	TGTACCGTCACAAGTCTCCA	2008	TGG	TGGAGACTTGTGACGGTACA	2015
EMR2 ABE sDex13	AGCACTCACACGGTGGGAGA	2009	AGG	TCTCCCACCGTGTGAGTGCT	2016
EMR2 ABE sDex18	ATCTTACCTTGTGTCCGGA	2010	GGG	TCCGGAACACAAAGGTAAGAT	2017
EMR2 ABE sDex19	GTGGTACCTGCTGGCTGAGG	2011	AGG	CCTCAGCCAGCAGGTACCAC	2018

表18.

10

20

30

40

50

表19. 使用される完全長EMR2 (ENSG00000127507) アイソフォームの例示的なミノ酸配列及び核酸配列は、転写物である:
ENST00000315576. 8

識別子 (配列番号)	配列
EMR2 アミノ酸配列 (配列番号 2019)	MGRVFLVFLAFVCWLTLPGEATQDSRGCARWCPQDSSCVNATAFCRNPGFSSFSEIITPMECTDDINECATLSKVSQCGKFS DCWNTEGSDYDVCVSPGYEPVSGAKTFKNESENCTQDVDECOQNPRLCKSYGTCVNTLGSYTCQCLPGFKLPKPEDPKLCTDVNE CTSGQNPCHSSTHCLNNVGSYQCRCPGWQPIPGSPGNPNVCEDEVDECSGQHQCDSSTVCFNTVGSYSCRCRPGWKPRHG IPNNQKDTVCEDMTFSTWTPPPVHQSQTLRSFFDKVQDLGRDYKPLANNITIQSILQALDELLEAPGDLETLPRLOQHCVASH LLDGLDVLRLGSLKNSLGNLNFSPAGTELSLEVQKQVDRSVTLRQNAVMQLDWNQAKSGDPPSPVVLVSIPIGMGKLLA EAPLVEPEKQMLLHETHQGLLQDQSPILLSDVI SAFLSNNDTQNLSSPVTFFSHRSVIPRQKVLQVFWHEHGQNGCGHWATT GCSTIGTRDTSICRCHLSSFAVLMHYDVQEEEDPVLVITYMGLSVLLCLLLAALFLCKAIQNTSTSLHLQLSLCLFL AHLFLVAIDQTHKVLCSIIAGLHLYLYLATLWMLLEALYFLTARNLTVNYSINFRMKMLMFPVGYGVPVAVIASAA SRPHLYGTPSRCWLQPEKCFIWGFLGPVCAIFSVNLVFLVFLWILKNRLLSNSEVSLRNTRMLAFKATAQLFILGCTWCL GILQVGPAAARVMAYLFTIINSLQGVFIFLVYCLLSQQVREQYKWSKGRKLRKTESEMHTLSSSAKADTSKPSIVN
EMR2 cDNA 配列 (配列番号 2020)	AGAAGACAGAAAAGATCCGGGGGTCTGCTGTGCGGTGAAGCTTCTCTTTGGCACTGCTGGCATCGGAAGAGGGCC CCTTCTCCCTCCCTGGGCTTTATGTGGACACTGTAATGCCCTCAGTTTTCTTTCTTTCTTTTGTGTTTGTGACAGGTTCTCA CTCATACCCAAAGCTGGAGTGGAGTGGACCACTTAGCTACCCGAGCCTCAAACCTCCAGCTCGGGTGAATCTTCTCTGC CTCAGCCTCCTGAGTAGCAGCTGGGACACAGACGCTGCCACCAAGCCAGCTGCCAGCCAGTCCCGGGAGGGCCCT GGGCCAGGGCTGTCCGCCCTCTTTATAAAGTCTGGCTCGGACAGCCGACAGCTGCCAGCTGCCAGCTGCCGAGACGG GACGCCCTGTCCACTCACITTTCCCTGCTCTCTCCGCGCAGCTCAGCTGGAACTGGAGGCGCGCTTCTCTCGT CTTTCTCGCATTTCTGTGTGGTGAATGCTGCGGGAGCTGAAACCCAGGACTCCAGGGGCTGTGCCCGGTGCTCCCTCAGG ACTTCTCGTGTCAATGCCACCCCTGTGCTGCAATCCAGGTTTCACTCTTTTCTGAGATCATCACCCCTCATTGGAG ACTTGACGACATCAACGAGTGTCAACACTGTGAAAGTGTATCGGAAAATTTCTGGACTGTGGAACACAGAGGGGAG CTACGACTGCGTGTGACGCCAGGATAGCCCTGTTTCTGGGCAAAAACATTCAGAAATGAGAGCGAACAACCGTGTCAAG ATGTGGACGAAATGTACAGCAGAACCCAAAGCTCTGTAAAAGCTACGGCACCTGCTCAACACCTCGGCAGTACACGTGCCAG TGCTGCTGGCTTCAAGCTCAAACCTGAGGACCCGAAAGCTGTGACACAGATGTGAATGAAATGACACCTCCGGACAAAACCCATG CCACAGTCCACCCACTGCCCTCAAACAGTGGCAGCTATAGTGCCGCTGCCCGGGCTGGCAACCGATCCCGGGGTCCC CCAATGGCCCAACAATAACCGTCTGTGAAGATGTGGACGAGTGCAGCTCCGGGCGCATCAGTGTGACAGCTCCACCCGCTTGC TTCAACACCGTGGTTCAACAGCTGCCGCTGCCGCCAGGCTGGAAGCCAGACACCGAAATCCCGAAATAACCAAAAAGGACAC TGTCTGTGAAGATATGACITTTCTCACCTGGACCCCGCCCTGGAGTCCACAGCCAGAGCTTTCCCGATTTCTTCGACAAAAG TCCAGGACCTGGGCGAGAGACTACAAGCCAGGCTTGGCCCAATAACACCATCCAGAGCATCTTACAGGCGCTGGAATGAGCTGTG

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

識別子 (配列番号)	配列
	<p>GAGGCCCTGGGACCTGGAGACCCCTGCCCCGCTTACAGCAGCACACTGTGTGGCCAGTCACTGTCTGGATGGCCCTAGAGGATGT CCTCAGAGGCCCTGAGCAAGAACCTTTCCAAATGGGCTGTGAACCTTTCAGTTATCTCGCAGGCACAGAAATGTCCCTGGAGGTGC AGAAGCAAGTAGACAGGAGTGTCACTTGGACAGAAACAGGCAGTGTGACGCTCGACTGGAATCAGGCACAGAAATCTGGT GACCCAGGCCCTTCTGTGGTGGCCCTTGTCTCCATCCAGGATGGCAAGTGGTGGCTGAGGCCCTCTGGTCTCTGGAACC TGAGAAAGCAGATGCTTCTGATGAGACACACCAGGGTGTCTGACGAGCGCTCCCACTCTGCTCTCAGATGTGATCTCTG CCTTCTGAGCAACAGCACCCCAAAACCTCAGTCCCAAGTACCTTACCTTCTCCACCGTTCAGTGATCCCGAGACAG AAGGTGCTCTGTGTCTTCTGGGAGCATGGCCAGATGGATGGTCACTGGGCCACCAAGCTGCAGCAAAATAGGCCACAG AGACACAGCACCCTCTGCGGTTGCACCCCTGAGAGCTTTGCCGCTCTCAGTGGCCCACTACGATGTGCAGGAGGAGATC CCGTGCTGACTGTCATACCTACATGGGCTGAGCGTCTCTGTGTGCTCCCTCGGCGCCCTCACTTTTCTCCTGTGT AAAGCCATCCAGAACACAGCACCCTCACTGTCATCTGAGCTCTGCTCTGCTCTCTGCCCCACCTCTCTCTCTGCTGGC AATTGATCAAAACCGGACACAAGGTGTGTGTCTCCATCATGCCCCGTACCTTGGCACTATCTTACCTGGCCACCTTGCCTGGA TGGTGTGGAGGCCCTGTACTCTTCTCACTGACCGAACTGACGGTGTCAACTACTCAAGCATCAACAGATTCATGAAG AAGTCAATGTTCCCTGTGGCTACGGAGTCCAGCTGTGACAGTGGCCATTTCTGACGCTCCAGGCCCTCCAGGCCCTACCTTTATGGAAC ACCTTCCCGCTGCTGGCTCCAAACAGAAAGGATTTATATGGGCTTCTTGGACCTGTCTGCGCCATCTTCTCTGTGAATT TAGTTCTTTTCTGGTGACTCTGTGGATTTTGAACACAGACTCTCTCCCTCAATAGTGAAGTGTCCACCTCCCGGAACACA AGGATGTGGCATTTAAAGCAGACTCAGCTGTTCATCTCTGGCTGCACTGGTGTCTGGGCACTTTGGAGGTGGTCCGGC TGCCCGGTCAAGGCCCTACTCTTACCCTCACTCAACAGCTGACGGTGTCTCACTTCTGGTGTACTGCTCTCTCAGCC AGCAGGTCCGGGACAAATATGGGAAATGGTCCAAAGGATCAGAAATTTGAAACTGAGTCTGAGATGCACACACTCTCCAGC AGTGTAAAGGTGACACCTCCAAACCCAGCACCGGTTAACTAGAAAATCTTCTGAATAAGATCTTCCCTCTTTGCCCCGTGGAA AATCTGAACAACTCTTTGAGCATCTAGAGGGGAAAGAAAGACTTTGTCTGTGTGTTTCAAGAAATTCACCATGTGAGCAAT ATGAAGGATGTTATGGAGGGTGTAGGCAATTCATCTCTGAGAAACCGGAAATCTTCCATGCCCTGCAATGTGCTCAITCA AACTCTAGCATAAGGACGGCCAGCTGTGGCCCACTCTTGGTCACTCTGAGCACAATAATTTAAGACTATAGAACGTTAA GACCTTTTCAAGCCTCTCTTCTCAAAAGACTCTCCAAATCTTAAATGAAGCAGAAACCGAGCCCTAAGAGGACTTTT ATACCGACAACATCTGAAGGACTAGAAATGTTCAACACGACTGTGGATTTCTTAAATTTTGTGTTTTGTTTTGTTCTC TAGTCTACGGGTTTTGATTAATTTAGTCAATGTGAAAATATTTGATTACTCACAATAGATCAAGAGAGACCGGCTCCTGCCTT CATGGAGCTTTTAGGGGAAATGAAGTGGCTCTTGGAGCTAGAGTTGACTCAGAACCCGAAATTCCTAGAAATCAGGTTTTCTA CTGCTAGGCAATGAAGTATAAATTTTATAACACTGTCTTCTTTCGCTTCAACCCAAACATGCAGAAAAGTTTTCTAATC TCAGATCGGGGATGTGCACAAAATCCATTTCAAAGGAAATGACCTGCAAAACCTCTAAATATTCCAAAGCAATGCCCTTAACC CTGTCTGTTATCTGCTTTCTTGAACAGAAATTTACATGACCATAAAAACCTCGAAAGATGGGTATGGCACAGTTCAATGCCCTG TAACTCTAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGGATGGCTCAAGCCAGGATTTGAGACCAAGTGTGGGCAACAGAGTGAGAA</p>

10

20

30

40

50

識別子 (配列番号)	配列
	<p>CCATCTACCCAAAAAATAAAAAATAGCCAAGCATGGTATGATATAGGAGTTAAGGAGAAATCATTTAGGCAAAATA GCAAGGGTAGGAAGTCCCTAGTAAGGTTTTCCATTTAATGAAAAGCAGCCCCCAAAAATCATTTTCTTAAACAAAAGAACAG CCTGTAAAAATCGAGCTGCAGACATAGACAAGCAAGCTGGAAGCTTCCACGGGTGAATGCCGGCAGCTGTGCCAATAGGAAAAA GCTACCTAGACTAGGCAATGCCAAAAATGGGGCTCCAAAGTTCCCTTCTTTTCCAGCCATGTGTACAGTAAAAAAGCAGGCCAA CATAGTGCAGCCAAAGCTCATTTGCATAATAAAGATTAGGTGGGTGGCCAGCTCACATAGGGGTAGGCCCTTAGGTAATACTA GACACGGCTTCTCAAGCCTGTCTATAAAAAATCTGGTACACTATGACGAGGGTCAGATTTCCCATTCAGACGCCCTCTCCCAT GCAAGAGAAAAGAGCTGTTCCCTTCTTCTTTTGGCTATTAAACCTCTGCTCTGGCCAGGCACAGTGGCTCACGCCATAT AATCCAGCAGCTTTGGGAGGCTGAGGTGGTCAGATAGCTAAGTCAAGGATTCGAAGCCAGCTGGTCAACATGGTGAATC TTGTCTCTAGTAAAAATACAAAAATATGAAATCTCACATAGATGATAATTAAGTTCCAAAAGCAACTCAACCTGGTAGA TTCTAAATTTTTTTGAGCCAGGCTTGGCTTTGTCCACCAATGCTGGAGTCAATGGCACAAACACTGCTCACTGCAGCCTCGA CCTCCCAAGGCCTAAGCAATCCCTGCTGCTCAGTCCCTCCAGTATTTGAAACTACAGGTGTGACCAACACACCCGGGCTA ATTTTGTATTTTTTTGAGAGAGCTGGGTCTCACTATGTCGCCAGGCTCAGGTCTTAATCTCCTGAGCTCAGGCAATCCGCA GGCTCAGCCTCCCTAAGTGGGGGATACAGGCTTGAGCCACTGCACCTAGCCTCTATTTTGTTTTACAAAAGAGAAAATTTGAG ATCTGAAATGTTAAGTACTTGGCTGAGGCCATCCCACCTAACAGGACCAGGTTAGGATTCAAACCCCATCCAACTGGTCCC AGACTGGAGCTTCTTGCACCTGCCCTACACTACCTACCTCCATCTCCATCTCTGGGCACCTTTTTTAAAGAACCAAAACATTA GAGCATTTGTTGTCACCTCAGCTGGGAACATTTCCAGTGCACACTCATTTTTCACTGCTCTGTGGCTGTCCGTTAATAGCT CAATGAGTATTGATTTAGGGGCTTTGGAGAACTTTGAATGCTACCCCCCAAGTAAACCATTTGTTGGCAACCTGGTACCTCTACT TTTAGCCATTTCTCCTTCTATAAATAGTGCAGAGTAAACCCTTGGTAAACAGGCATCCTTGGCAAGCTCCACCCTAGG TCAGTGTAAAGAAATTAAGAAACAGGAAAGAAACACAAAAGTGGCTTGTATGGTTAAGCAGGTTTTATTTAGAGAAAACACAC CTGAGAGGGGCTGCTGGCTGAAATAGGTTAGAGTCTTTTTCTACAGACTAAGAGTGTTTAAGGATTTAGGGTGGGAGAGTTTTCT TAGAGGCTTGGACTGCTTCTGTGTTTTTTTTTGTGTGCTTATAGGGAGGAGAGTGGTGTGTTTTGCTTTTATACATTTTTCT GCAGCTGAGGCATACCCCCCAAGTCTGCTTTTAGCTTCCCTATTTTAGTGCACCTGGAGGAAAGGAATGTCTTATTAAGG CCCACGTTTTTACTGGGGCCCATGTATGAGGGTGAAGTTTGGCAGTTACCAAGAGACTTTTTCCCTCCACTTCCCTCTGTGCC CGAGCTGTTTTTATCTGCAATTTACTGTCTGCTTTTTTTTTGGCTGCTTATAGTTTTTAAAAAAGTAAATTTCTTAAATCCAGAAG GCTAAAAATGAAGCTGAAACTTAAAGTGGCGGTGTTTGTCCAAAATAACGGGGCTCCTGCTGTGCCAGTCACTACCCTCAAGT CACTCCTGATCCTCAACCTCCATGCCTAAGGCTGGTTCAAGAGACCACATAATATCTGCCTTTTTATACATACATGATGGGTG CATGGGATTTCTGGGTGCCCTTGGCTTGTATATAGACTGCTAAGGTGAGATGGGAAATACAGAGTCACTGCTGTGAGGAAAG CAGAACACACAGCTGGAGGCTTGGAAACATGTGGTCCCTATGAGTGTAGAGCCCATATCCCCATAGAGTCTACCTAGAGCAGG GGTCCCAAAATGTTTTCTTAAAGAGCCTGATAGTGTATATGTTAGGCTTTGTGAGCCAGGTATTTACAGCAACTCAATTTCTAC CACTGTGGTATGAAAAACAGCTATAGACAATCATAAAATGAATGATCAATGGCTATGTTTTTAAATAAAAACTTTACAGACACTGAAC</p>

10

20

30

40

50

【表 1 9 - 4】

識別子 (配列番号)	配列
EMR2 ケノムDNA配列	TGAACTTCCATTGTGATATGAAAAACAGCTATAGACAAATCAATAAATGAATGATCAATGGCTATGTTTAAATAAAAACCTTTATGGAC ACTGAGCTTTGAACCTTATATATCAGTCAATGACACAAAATATCATCTCTTTTATTTTTCACCCCAATTTGAAAAAATGT AAAAACTATTTCTTAGCTGTACAGAAAACAGATGGTGGTCAAGATTGACTCACTGCCCATAGTTCCAGACCATGATGTTCCAGG TTCAATGGAAGCACTTCCACTTACACTAAATTTTATTCATCCATCAATACATATGTGATGAGGACATACAGACACACCTCCAGAGA TATTGCAGGCTCCACTCCAGATCACCAATAAATGTGAATATGCAATAAAGCAAGTCAATACATTT
(配列番号 2021)	AGAAAGCCAGAAAGATCCGGGGGTCTGCTCTGTGGGGTGAAGCTTCTCTTTGGCACCTGCCTGGCATCGGAAGAGGGGCC CCTTCTCCCTCCCTGGGCTTTATGTGGACACTGTAAGCTCAGTTTTCTTTCTTTTCTTTTTTTGTTTTGACACAGGGTCTCA CTCTATCACCCCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACCACTTTAGCTCACCGCAGCCTCAAACCTCCAGCTCGGGTGTATTTCTTCIGC CTCAGCCTCTGTAGTAGTAGCAGCTGGGACCCACAGACGTCTGCCACCAAGCCAGGtaattttttttcttttgaagaaacag agcttttggcatgttgccagggtgtctcaaacctcctgagctcaagcgtacctcctggcctggcctcccagaggtgctgggatc acagggtgtggagaaataggaaacgcttttaactgttggaggaaatgtaaatagttcaacctgtggaagatgtggaagatagtgtggtga tttctcaaggatccagaactagaaataccatttgactcagggatccccattgctgggtatataccccaaaggattataaatcaatg ctactataagacatagcacatgtatgtttattgctggtactattcaaatagcaaacctggaaatcaacccccaaatgtccat caatgatagactggttaaagaaagtgtggcacatatacccaaggaaactatgacgtataaaaaaggatgagttcatgtcc tttgcagggacacagatgaaggtgaaaaccatcattctcagcaaaactaacacagaaaacagaaaaacacacacacatgtttctc actcataggtggaaactgagcaatgagaaacacctggacacagggcgggaaacatcacacactggggcctgtcggggggtggg gcctggggagggttgcataggagaaatacctaatgtaaatgacgagttgataggtgcagcaagccaacatggcacatgta tgcctatgtatacaacctgctcgtgtgtgcacatgtacctagaaactaaagtctaaaaaaatataatataatataat aatttaaaaagaaagaaaccgagcttcgcatgttgcacaggtggtctcaaacctctgagctcaagcgtcctcctgc ctcgcctcccagagtgctgggtcacagcgtgagcctctgtacctggcctcagtttccatctggaacacagcagggaa gatactgccagctggacgcaaggctctgccaaactctggcatgccaaagctctggcacaagggtgagccctaccaagtgggag cccagagctatttctgacaaggccccctgcgtgcctgcccagggaagagccaagtggccccagggcagaccgcccccggct gccacaccttccccgcacagcagccagcctggaacacacagagggccagaggttggtcagagccacatggtggaacctccag cagagggatttttaagcaggttgcaactcattctgctgagcagtagcacctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt gtgtgtgcagcgcctgt TGGGCCAGGGGTGTCCGCCCCCTCTTTATAAAGTCTGGCCTCGGACAGCCCGCACAGCTGCCAGCCTGCCGAGACG GGACAGCCCTGTCCACTCCTTTCCCTGTCTCCCTGGCCGAGCTCAGCTGGAACCTGGGAGCCCGCTTTCTCTCG TCTTTCGGtaagtactttggggcccccgctgggggtggtagcagaggaagctccagcgggacccttggatgcgtctgagaaa cgggagggcgcctggtgtctgtggggccggcgtggagaaagccacatggtcaagcagggcaactcacgggcaacacggcgagag gggctggtggtgcttgggcaacccccacacccccggcaggaaactccagggtgctctcggagcctgctaccctgcccgagggtatc

10

20

30

40

50

【表 1 9 - 7】

識別子 (配列番号)	配列
	<p>tcttattccacactgcagctccagcccattgagaaagccagggccccccatgcactctgcttttgcctttctttccagtgaggaaact agtlgggtcgggagggagcttcagacatctgcaagccagatggaaaccagtagcaagtgagcagagaaagggagatlaacac agagtcacagagtggaagggaggtgagcaaaagccaggaatgaagaagctgaggtgagccaggggtcccaggggacatt aaaggggttcagcagacctgcccctgctgtaaagagaaaaagtgccagtgctcctgttcccagcccctgtcccctcctgttctccct gcagtcagtagagcctcccctggtgggagaaagtggagcagagcagaggtgtacgttctgagagcacgcagctgcatagagc ccagcaggggggtggttcacaggggtcccctgtgaaacagatgctacatgctgcacatcttgaccacaaagccagagcct tcccgtgaattagaaaaaggactctccggccaggaagcagctggctcacgctgtaatcccagcttgggagcctgagggcgg gtggatcacctgaggtcagggactcaagaccagctgacaaacatagtgaaccccactctctactaaaaatacaaaaagttag ccagggcatagtgtagcaacctgtaatcccagctactcaggggctgagggcaggaatcacctgaacccagagggcagaggtg gcagtgagccaggtctcaatattgcactccagcctgggtgacagagcaagacttctcaaaaaaaaccccccccccccc aaaaagaaaaagaaaaagaaaaagaaaaagaaaaagcctcctcctccaggtagacacagcccctttggggaa tggagaggtttcagcctctgctcacggcctggctgggcatccatagtgcagcaacctacacaaactgtacgtgggtggctc atgggtcctgtcagtagagcctctgttttagtctatgttgtgctataaagaaatcatgaggtggatcatgataaaa gaaaaagagctgattgggtcatggtctgcaggccatgaagacacatggctccagcatctgcttctggtgagggccttagg gagctccactctggcagacgggaaaggggaaagtgccatcccagagaggaagaaagcaagagagaaagggagagatga ccaggttttccaaacagcttctcatgggaactaaagggcagaaactcactcatgcccaggaagcagccagagatgtt catgagggatctgactcaggaacccaaacacctccacagggctccatctccaaactggggtcacatttcaaogtgagatt tggaggggacaaatatacaaaactgtatcacggcatgcaaggtggtgttataatattgagggaggtgtgttcccagctaga aacagggcagcactggcggggcagtggtcctcctgctaatcctagcacttgggagggcaggggtgggcccgtcaacaaggt cagggatcgagaccatcctggctaacatggtgaaacccctctctactacaaatacaaaaaaatagctgggctggtgggtg ggtgctgtagtcagctaatcagagactgagggcaggaatggcatgaacctgggagggagctgcaagtaagccagagat ggcaccactgactccagcctggaacagagcagagctccgtctccaaaaaaagaaaaagaaagagagagagagagag aaaaagaaagagggccaaactgagagagggggttagtgggtggtgagcagagacacagatgagcaggaatgaagtgggaga gggtctcatggaacccatccgcacagaaacagcctgctagtgcggagcagaccctgctctgaaagcctcagctcaggggaaag gctccgtggggcctgtctgcatccccctccccctcagcattctgtttttttttctacctggtgtcacagggcctcatagg cagggacctggggcactcccagctcctggcccactactccagggcatcacagggcctccaaacacccgtggtcacctg tcgctatccaaacctcaaggttcagaacccctccacaggggtcacttccaaaagctcagaacatccccctgcccactggcat cttattgtttgtttgtttgtttatagtaagatgggggggggtgtctcaccatgttgcagggctggtctcgaaactc ctggcctcaagtgatccggcccgtctcagcctcccaaaagctgggttgcagggcgtgagccaccatgtcccagcctggtatctt atgtacaaaaacaaaaagggggtggcactcagggatattcgatgagctcactgcctggtgcatccagcggcaggtatccattc</p>

10

20

30

40

50

【表 19 - 8】

識別子 (配列番号)	配列
	<p>tctctgctatcatcagcgactgcaaggatgagacagtctccacaagctctgctcacctggaactctctctgatccccagct catcatggaccaggcaacctgtccagaaatgaaggaggaggagatttgaaggcaggccactgtccccagtcgaacctgcc actggccaacaacccccactggagaagatgcctcgtggagccctgacctcttttctgccactcagctctctgtcccccttcaact gagcgagactgcccgaacctcctgatagtttgggtccacctgagtcactggaggatgttggctaacggtgggcaagtcag gacatggactccccacttggaggttggatgaatggaaggcactagtgaggaccatggcaagagaggttaacatcag ggccattgctccaagcctgatcctctccaggaggtcaaccagatccccatggagtggaacctcagaaataggctgtgt ccctgggtggaatgccaagatgacagatacacctcttggccatcagcactctgtgccccctctccagccaactaa accttcaaccaggcccagctcttctcagctatggattctcactacatcctgccattccaagcaccttctcaggatcaaaa aaaggcaacctcacagcctggggcaaccagctgtatgctgggtccccctgtccacctggcctgggcccactgtccagggc agcctggcctatgcagcaccagctcatgctccccgggactggctcagggcccagctcttggctccatgtcctggagctgg gctcagagctagtgtggatggagagcaccatcctgctaggcccaccgggattctgataactcagccagtgagcagctgtc ctggggaatcaaggccaccagaagcagatgctggagcctgcatcttaccagcctcagaaccatgagccaaataaacttc tttcttgaacacaaaacggactaaaccagaggttctcactgagaaggacccatgaccaccatgtacagttgcataggctg ctgactgcatatggatgcccagccaaagggtgagcagaagctgaaaacctgctactctccattcctcaaatatgactgtga ctacttgaaggagatgcttttccaatcacaggaaaggtctgtccttggcccaggactgcccactgggaacccaagacag gtcctacctgggcaagcagctgccccctgcaactgggtcccaagaaaatccccctgaccttgtcctgaatcctcaggtg ggacatccttggcccagctgggagctgcccaggaggcaggggagatggggaggactcagatgcttccagccatctgaaca acagaaggcctgggcccactgctcaccatgggacacctctgtgtggattagaaaaggaggagatggccagggcatggtggct catgctgcaatcccagcacttgggaggccgaggtgggctgactcagaggtcaggagatcaagaccatcctggctaacacgg tgaaccccctctaatactaaaatacaaaaattagccgggcatggggggcctgtgtcctcagctattcgggaggct gaggcaggagaatggcgtgaacccgggaggcggaggtgcaagtgaattgagatcaggcaattgcaactccagcctgggtgacag agcaagactccgtctcaaaaaaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaa gccaagaaacatggcgaccctcagccccgaaagctgctcacagctacgggcatcttccacctctccttcttgcagATG TGGACGAATGTCAGCAGAACCCGAGGCTCTGTAAAAGCTACGGCACCTGCGTCAACACCCCTCGGCAGCTACACGGTGCAGTGC CTGCTGGCTTCAAGTCAACCTGAGGACCCGAGGCTCTGCACAGgt agagggcccagaaagacgctgtgagggctggacggg agctggggatggagctgagtcaggtcctccaaagcagccgaggaggaggagaagatccgcaaggttcccacaaggtcaaggac ctgctaaggccctgctaaggattcacctcccaggaagatcggccacacggcagggaggcggcagggcctcagggcttggg gtgcccctgtgggcccagaccctcacccttctcctcatctgtcagctgcagtggaagaggtgtcacttccagttctaagaa ggggaaacctccacctagtggggaggggagcaggagagagattttagtcagaaagtccagctcccactcagtttccccctt tggttcacctcctataaactggggaccatggctcctgtgtgcccctctggtaggaagaccatcataagatgcttgaagggt</p>

10

20

30

40

50

【表 1 9 - 1 2】

識別子 (配列番号)	配列
	aatggctcacctgttcagaccacatctttaagccttatgtaaatcggacaccgcctacccaagctcatctataaaaacttcgtgc atttcaccacgaaccggaagaccacttggagccctgtctctctgcaggagaggagttatctcttttcccttttttttt tttttgagacggagtcgtgctgtgtccgcgactcagtgcaaggcgcatctcggctcactgcaagctccgctccggg gtcacgccattctcctgctcagcctccggagtgcctgggactacaggccaccaccacatgcccagctaatttttttgtatt tttagtagagacgggtttcacctgttaccaggttggctcgtctcctgacctgctgatcctcctgacctgatcctccgcctcagcctccaa agtgcctgggattacagggtagccactgcgccagagctattcttttttttttttttttttttttttttttttttttttt actaaactcttatgtgtccacatcctcaattccctgggtgaaacagtgaacctgggtatlttaccacctcactagtgag atgatacctcatttgggtttgatttgcccttccctgataaactaatgatgtttaacctttttcattgttttgcaccattt gcatgtcatttttggagaaatgtctaatcaactccttgcctatttttaattgtcctgtttgtccttgggtgtccagttgta agcattctttaaacttctgatagatcatctgagatgaatgattgcaaaatatttctcccttctctgagattgtcttt tcatttcttgtcttcaacttaatgaatagaattttaaacttgaagacatttttttctaattttcttttgttgca tgtgcaattgggtgtcatatttaagaattcattgacaggggtgggtgcctcagcctgtaatcccagcacttggagggccaat gtggcggtcacctgaggtcaggagtttgagaccagcctggccaacaggcgaaccctgtccttactaaaaataaaaaataa aaataataaaccagatgttggcacatgactgtaatcctagctactcaggaggctgagcaggagaattgcttgaacctggg acacggaggttgcagtgagctgagattgtgccactacactccagcctggatgacagagcaagactctgtcccaaaaataaaaa taaaaaagaattcattaccgcatccaagaccaggaagattaccctgttccctcctaaagtgtctagtttttagcttctaaag cttaggtcactggcttatttgagttaatttttgttgggtgagggtaggggttaaaaacttccctatttttcatgttactat ccagtaatcccagcactattgttgaagagattattcttcccccttctgatagcttggcacccttgttgagaatcaactg accataagatggatgggttattcctggactctcaattctattctgtgtccttaccagctattactgtcagtttgtagt aagttttggaatcaggtagtgtaattctccaaccttcttcttcaagattgttttgggtatttggattccttcaaa caccatagaatttaagatgaactttcttattctgaaagtaataataggctaaaatattgataggattgcatlgagtct ctagaccactttggggagttattgttattcttaacaatagaagttctccaatccatgaacataggtgtcttccatttagag agggccttttattcttcaaacactttttagggccagaaagcagtggtcagcccaatattgtcagagggcccaaggtggg agaattgcttgagcccaggagttcaagcccagccttgaaatatactgaaacatgatctccacaaaaatttaaaaattagct ggctgtggtagtgagcacctagtgccagctacttgggaggtgaggtggaaggattgggtgagcccaggagactgcagtga gctatgatcatgccactgactctagcctgaccacaggtgagaatttgcctcaaaaaaaaaaaactcaaaaaacttcc tataagtcttgagctcctcgtaaaatgtattcctaacattttgtgtaaaattttgtcatctatgtccataagaaatattg gtctataattttattttctgtgatgtcttcatctgggtttgttatcagagcaaatatagactcataaaattacttaaatagt gtttccctccttcccatattttaaaaaggtaaaagattcatgttcatcttcttaagctattggtagaactcaccagtgaa gtcatctggtctgggctgtagttttgagaggttttgattactgatttaatctgttatagggtctgttcagatcttctatttct

10

20

30

40

50

【表 1 9 - 1 3】

識別子 (配列番号)	配列
	<p>tcttgagttgatttcagtggttgggtgtgtcactaggaatgtgtccatcttcatctaggttaacctactttgtagatatacagttg ctcacactattctctccgatatttggtaacttcagactataatgatatagatatataatgaagtcacagatataatgaagtcacaccca ctgcaggcaacgattcctaaccctaacccttattgtaattcccacaactcatagAATTGTCCTGGAGGTGCAGAAAGCAAGTA GACAGGAGTGTCACTTGAGACAGAAICAGGCAGTGAIGAGCTCGACTGGAAICAGGCACAGAAAATCTGGTGACCCAGgtaa tggctgagatggggaggtggtcagtgagcttcatggtgggaaagatgcccagaatgcccagaatgtaaaaaataaaaaattaaagatt aaagggaagtgtgggtgttggagtgggtgttaagagagagatccagctgagggaagggaccttgttggggaccctgag atattaaccgtggccttgcctgaggtgtgacacataagaactaaagattgaaggaaggtgtgggaggggtgaactgaacccaaa ggaaggtagcccatctgagtgaagaagtctgtgcaagccagaggaactctggtgtggaccagagagattcaacctgaactcccaaa ttcaacctggcctcgccctgagGCCCTTCTGTGGTGGGCTGTCTCAITCCAGGGATGGCAAGTTGTCTGGCTGAGGCC CCTTGGTCTTGGAACTGAGAAAGCAGATGCTTCTGATGAGACACACAGGGCTTGTGAGGACGGCTCCCCATCCTGTCT CTCAGATGTGATCTTGCCTTCTGAGCAACAACGACACCCAAAACCTCAGCTCCCCAGTTACCTTCACTTCTCCACCCTG tgagtgtgtgggtgggtgggtggtggtgagtctgagtcggggcatagccttctgctcagctcagcctggggctcaggt ggctctgttatggtaaatatctcccaggaaagtcaagtcctcccaggccttgggtaagcattctgagcatccga cccaccagctcacacctgttcttt tcagctcactgcagctccgctcccaggttcgagcattctcctgcctcagcctccctaatagctgggactacaggtgtgtg ctaccacgccagctaatttttgtatt ggctcaaacctcctgacctcaagtcatccacctgctcagcctcccagctcccaggtgtgggtatcacaggcgtgagccacctgccc gcccacacctgtgttctgttctgtcagTCAGTGTATCCCGACAGAAAGGTGCTCTGTGTCTCTGGAGCATGGCCAGAAATGG ATGTGGTCACTGGGCCACACAGGCTGCAGCAATAAGGCACAGAGACACCCAGCACCCTGCTCCGTTGCACCCACCTGAGCA GCTTTGCCGTCTCAIGGCCACTACGATGTGCAGgtgagaccttaggagggtatgcactctgcattttgcccgtgtaaca aatccccagagcgtagagccttttaaaaaatataatgattatctcacagctctgggtcagcaagctggcatagcaagatg gctttctgtcaggttacaagactgaaatcatcagctcccaggtgctcccaggtgctcccaggtgctcccaggtgctcccaggtgctccc ccttctccaagctcctgtgtgctggcagaattcagtttctgtgtattgtaggtgtaggtgtaggtgtaggtgtaggtgtaggtgtaggt aggcatcacattcagttcctagagccactcatatccctctcacatgacctctggcaaacctctagcattcctatctggag gacaaaggaaaaatttccctcacgcagaatccctcttaagctttgtattagtgcaggttctctagagggacagaactaatgga atagat cagctgattagatggtgcccaccagattaaaggtggtatgcttcccaccactgactcaaatataatatacatatataatagag atataatagagagagatctataatataatagatagatagatagatagatagatagatagatagatagatagatagatagatagat aaggtcccacgataggcctctgcaggctgaggagcaagagagccagctccgagtcagcagcaagcaagcaagcaagcaagcaagcaagca gttcaaggggcaggaagcatccagcacagaggaagatgtaggctggagggtaggccagctctctctttcacattttctgccc</p>

10

20

30

40

50

【表 19 - 15】

識別子 (配列番号)	配列
	CCTCACTGCACGGAAACCTGACGGTGGTCAACTACTCAAGCATCAACAGATTTCATGAAGAAGCTCAATGTTCCCTGTGGGCTACG GAGTCCCAGCTGTGACAGTGGCCATTTCTGCAGCCTCCAGGCCCTACCTTTATGGAACACCTTCCCGgttagtgcaaatctc acaatccttatacttccggcataaacatggccattgtagaacctagatagcattttttagacacctgcttttaattagatc agtagggatttttaggctctattgggtggattacactgcagctccttattcttagctattgagtttatttcaattacatttcaa gctaggcattgtagaagagggttttcggaaattttctgaatgaaataaaggccaagcctttggaaagcacgaataggacaag acactatgtcataatccttagggcatcttctgctagaagattataatgaaggaggctcaggctcagtggtcgcacctg gaatcctgtgctttgggaggctgacacagaggatcactgagcccaggtcttgagaccagctgggcaacacacagcaagac ccttcttaaaaaattaaaaattagcaggccctactggcacacacctgtagtcctagctactcaggaggctgaggtggga ggatccttgagcccaggagtgcgaagtgcagtgagctatgattgaccactgcactccagctcagcaagagagaaagacc ttgtctcaaaaaataaatagttaggataatgcattaaatctgtctcactgaaatagtaagaatgaaatcaaatgagtg ctcaagacagcatttttaaaaaatctaacctactttatctaaatcttttaggatactccaatttttcaaatgaaaaagtagc ctgattgaaataaataaattgatattgtcatagttaaagatttatgagatgcttactttgtccaggtacttttctagct agttgtttgtttgtttgccaattgcaactgctgactggtgaaacctcagggacactgtgactagaaacagcagacaattttgtct tgcctctgacttaggggaaagcattgactctgctcctcaatgtagttagctgaggttttcatagatacccttt ttcaggttaagaaattctttctattcctcatgtgttcggtattttgtagaagaaagaggtttgattttgtcaaatgcttt tccgaaagcataaatttttaattatataaaataatataatggttaaaattatagataatcacaataaataatataatataat tagattattttatgtaattttatataaaataatataatgtaatttatataatataatataaactataaataaattata taacatagctataaaataaattgtaactatgaataaattacataaactagctataaaataaattatgtaactatgaataaattacat aacatagctataaaataaattgtaactatgaataaattacataaactagctataaaataaattatgtaactatgaataaattacata acatagctataaaataaattgtaactatgaataaattacataaactagctataaaataaattatgtaactatgaataaattacata catagctataaaataaattgtaactatgaataaattacataaactagctataaaataaattatgtaactatgaataaactaacatag ctataaaataaattgtaactatgaataaattacataaactagctataaaataaattatgtaactatgaataaattacataaactagc tataaaataaattgtaactatgaataaattacataaactagctataaaataaattatgtaactatgaataaattacataaactagct ataaataaattatataaactataaataaattacataaactagctataaaataaattatgtaactataaataaattatataaactagct taaataaattataaactataaataaattacataaactataaataaattataaaccataaaataaattataaactataaactat aaataaattataaactataaataaattataaactataaataaattataaactataaataaattataaactataaactata taaataaattataaactataaataaattataaactataaataaattataaactataaataaattataaactataaactata atataaattataaactataaataaattataaactataaataaattataaactataaataaattataaactataaactata tctttattttataaactataaataaattataaactataaataaattataaactataaataaattataaactataaactata tatggttataatgatttaattttacctttgagtcctggggaattatataatggttataatggttaattatggttataata

10

20

30

40

50

【表 19 - 18】

識別子 (配列番号)	配列
	ccccccgaccacacccctggctaaatctttgtatcttttttagtagagagaccagggtttaccactgttggcggtggtctcgaact cctgacctcaggtgatctgcctgcctggcccccaaaagtctgggattacaggcatgagccaccctggcccaaccctcaggtgg cattctactgtgggctatagtgacagtaaatatctaagctgaccacagcccagctctgagaaatcatctacaggggagggca ggggactccatgggacagatgaaatagccttgattctctttctctgggtgcatcaccagcctcctttcttactcaatccagG ATGCTGGCATTAAAGCGACAGCTCAGCTGTTCAATCCGGGTGCACGTGGTGTTCAGTCTTCCAGGTGGTCCGGCTGC CCGGGTCAATGGCCTACCTCTCACCATCATCAACAGCCTGAGGGTGTCTTCACTTCCCTGGTGTACTGCCTCCAGCCAGC AGgtaccactgcccactcccaccaggactcttccctgctcctcactgctcctgctgagctgagccagctacacactttggcctt gcagTCCGGGAGCAATATGGGAAATGGTCCAAAGGGATCAGGAAATGAAAACTGAGTCTGAGATGCACACACTCTCCAGCA GTGCTAAGGCTGACACTCCAAACCCAGCACGGtaagtcaagcattgctccagaggcactcaactaacccgacccccctgagga gcatgtgcctatcacacaaggaaacctgggaatcacagcagcaatgcccagcctgcctagaaaaggctcgcatctgagtagccttga ttaaccattagcaatgatctcagtttaaatgttttttttaatacagtcagtcagcctgcatagcctgcatcccagcactcactgtc atctgggagggcctaggcaaggatcacctgagggccagggatgcaagatgacccctgggcaacatagcaagatcccactctctac aaaaaataaaaataaaatagccagacatggtggcatacaactgtagtcccagctactcctcgggagggctgaggtgggacaa tcaactgagccccagtgggtgaggtgtagtggccatgatgccactgcaactccagcccaggcaacagagtgagacccta tccccaaaaataaaaaaatccttggctcttactccttaggaaactgtgcttagttgactctcacacacacaaaca ctcctatggacacctactatgtccatgcatggttaactaaatgagcaggaattgatctgaagcagtgatgcacattctacc tagaagcatttacctatcccttctctacatacaagtctatctcacagtcacttggcaccaccaccacaataaggcaagcat gggaggaatgctgtacatattatgaataaacagaaataagtgtaactgggattttaggcttcttaacaagtctgcctct accactaccacttagtgggtagtggcagtgccctctactcagcaccctctaccactgcaaaactcagaaagaaaaagca gtaatggggccagcaggtgggtcctgcctgtaatcccagcacttaggaggctgagggaggaacaactgcttggggcccaaga gttcaagactagcctgagcaacccagtgacacctgctcctataaagcatttaaaaaattagctgaggggtggttgtgtgcatct gtagtcccagcaactcaggaagctgaggtgagggatcacttggcccagggttggggtgaggtgagctatgattgtgccc actgcatttcagcctggtgacagcaagacctcttctctgaaaaataatacaaaatacaaaataaaatggttttaaa aacacactgggcaacctgggaatcagcgggtgatgccctagaggggttcacatttggcagactccttgaacttaaccat gcaatgatctcagtttaaatgctttttataaatcagcccaggaaacagtggttcaagcttftaatcccagcactctgggagggcc aaagcaggaagatcacttggcccgggacaacttggggatcacttgaagccatattatcctatgcctcaatggcatgggat ttcatgacattgatgactaataccaacatttataatgtagacatacaaaagtctgttatttttctcacctctctcca tcttctccagattatgtgtaattctaacccttctcagcagaaagtgaagcacttggatttgggtcaaatgtaca gagctcgggcccagcagtgactcatgcctgtaatcccagcacttgggagggccaggggtggatcacaaagtccagga tcgagaccatcctggctaacacgggtgaaaccccatctctactaaaaatcaaaaaaaatagccagggctggtgggt

10

20

30

40

50

【表 1 9 - 1 9】

識別子 (配列番号)	配列
	<p>ggcgcactgtagtcccagctactcgggaggctgtggcaggagaagtgtgtgaaccaggaggcagagctggcagtgagccgag atcgcgccaatgcactccagcctggcacaacagacgagactctgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagtacagag tctcttcagccagtgagatttagcctcttgagcttgccttcaatttaagagccctcaggccagccacccgtgctcat acctaatcttagcacttcaggaggccaaaggcaagcaaatcacctgagccaggagttagagaccagcctggccaacatggc aaaaactccatcttactaaaaatcacataaattagccaggcatggtggtgcacacctataatcccagctactcaggaggctgag gcacaagaattgcttgaccgggaggtaaaagtgtggtgagccaagatgccccctgactgactccacctgggcaac acagcaatactctgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaacgctctcagcctgggcaatgaacgagacccccctctctataaaa aagtttataaaaatcgtggcgtggtggcaactcctgtagtcccagctactgggaggcagaggtcgttgggcccaggy agttggagaccacctgtgcaacatggcaaaatccccctctacacaaaaataaaaaactagctgggatggtggtgcctgctc tataatcccagctgctgggaggctgagccaggagatcaactgagcccaggagtcaaggccacggtgagctacgattatgc cactgcactacagcctgggtgacagagcaagacccttgtgtaagtaaatcaataaataaataaataaataaataaataa agaagccccacctgctgcaaggcacttttccacatttctcattaccttttcttttttcttttttcttttttctttttt ttttttttgagcggagttcgctcttatacccaggctggagtaaatggtgctatctcagctcaccgcaacctccgctcc tgggttaagcgttctcctgctccacctcccaagtagctgggatcacaggcatgtgccaacagcctggtcaattttgtat tttactagagacgggatttctccatgttggtaggttgggtctcaaatcccagcctcaggtgatctgcccgcctcagcctcc caaaagtactaggattacaagctgagccaccacacctggcctcattaccttttccatccacctgcacaatccctggttccaa cacaggatcttctatttcttttctgttctcactaaatgcootcaccacctatgtcacacacacacacacacacacacacac tccatcatgatgacacattgtaacctccatgctctcaatcaatacaacaaacatgacctccacctccacattcccatat tgactgtccatcctcttttttttttttagacagagctcactcgtctgtcaccaggtggagtgcagtgacacctctgg gctcactgcaaacctcctgctccagggtcaagtgattctcgtgctcagcctcccagtagctaggattacaggccaccgcca ccacgcctggctaattttgtatttttagtagagacaggggttccacctgtggcagggtagtcttgaactcctggcctcaa gccatctgcccgcctggcctccaaagtgtgggtacagacgtgagccactggcaccagctccatccctgtctttgactct cctacagccttcatacttataaagaccttgatgattacatgggttccacaagcaatccagggcaatttcccatctcaag atccttttcataaccgtatctacaaagtctctttctccatgtaggtacattacaggttctggggttagggatgtgaacc tctttggggggtcattattctgctctcataccatagtttgggttacctattgtagaatcatcaaacctgcctcatat ttagatatttgcataaaatattatcacctttcccccacacagccactagaaatgatatatcacattgaagaaaggaaac atgtacttttgtagggaattagagttaggttaggttaggttaggttaggttaggttaggttaggttaggttaggttaggt ttctaccagctactgacaaaggacaaagaaatccatgcatctacttaattcttttctctctctctctctctctctctctct ttatctctggtgtttgaaaatgtatgtgcttggccggacacgctggctcacacctgtaatcccacactttgggaggccaa ggcgggcagagcacttgaggtcaggagttcgagaccagcctggccaacatggcaagaccccaacctctactaaaaacacacaa</p>

10

20

30

40

50

【表 1 9 - 2 0】

識別子 (配列番号)	配列
	<p> tagccaggcatggtggtggatgcttgttaattccagctacttggaggctgagggcacaagaatcactcgaacccaggaggcaga ggttgcagtaaagccaagatcgagccactgactccagcctgggtgacagagtgagactatgtctcaaaaaaaaaaaaaa gaaaagaaaagaaaagaaaatgtgtcttgccttattctgcagctctctgccatggcttctgcagctcttgcattataa caaaatgtcttgcagcactactgaataatctcctgaagcacaatattattaatctcttgagcacatataaattatgcatta aactactaatataagcaagtgaagctgacctctcgaacctatgaaattacactgagttcctatgaacctaggaataaat aactcatattggagatgaaaagatagaaaagaaatcaggctgggcagtggtcacgctgtgtaacccagcactt ggaggccgagggcagagatcactttagctcaggactcaagaccagcctgggtaacctggcaaaaatccggttctacaaa agtataaaaattagccaggcatggtggtgcatgctctagctccagctaccgggagctaaagattggagtattgcttggccc aggaggtcaagtatccagtgagctatgatccccactgcaactccagcctgggacaaaagcaagaccctgtctcaggggaa aaaaaggaaattcagtgcttttctttaaactctatggttaacaatagataaacactctaacacttcatataattccccac ctggctctttatgactccacattaaagcaacattacacaaacctggagctccgaggtcaagacatcatttggaaacag atagatcttttaaatgttttaattgatccataatagaogtacatagttctaggtaactgtgatcatttgcactacat ataagcaaatcaggttaactaagatatactacacttaaatcttcttcttcttactaataaacattcaaatattctct tctagctagttgaaatgtatggtagattaatggttaactataatcacctacttcagatacaactttttttttttttgag aggagtttactctgtcgccagactggagtacagtgaccatcttggctcactgtgacccccacctccagattcaagcg attctcctgectcagcctccgagtagctgggactacagggcctgccaccaagcccagctaatgattattattactac tgtattctagttagacaggttccacctgttggcaggctggtctcaactcctgacctcaagtgtctgcccgcctcggc ctcccaagtgctgggtacaggtgtgagtcaccacacccctggccagatagatacttactgcaacacatttacttctctt aacttggtaacttgggttaggaggtacaaaagtgggctctcgagaaagacaggtggagcaaaaatgaaagctgata tggcctttgatgttggcctgacaaatcactatggttaagaaaaccttattgattaaagactcttggccagctggtggctca cacctagaattccagcatttgggaggtgagatggaggatcactgagcccagaagttcaacagcagcttgggctataca gtgagacccatctctcaaaaaatataaataaaaaatgagacaggtggtggcacatgctgtagtgcagctactcggg aggctgagggcagggatcactgaaacctgggagttggaagttgcagtgagcagagatggtgccactgcaactccagactgggt gacagagcaagccctgtctcaaaaagaaaaaaagacttcttaaatcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt tacacacaattgaggttaacctgaagttatgggtacatagataataaaaatggttactatgtgaagcaaaat atatctatcatctcacatagttacttcttctatagttccttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt tcaaaatggaaattatagggttcttctatagttccttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt tataataattctaaatataagataataaatactataattctaaataatagataataaatactataattctaaat atctataatttctaaatatactataattctaaataatctataattctaaataatctataattctataattctaa tatctataatttctaaatatactataattctaaataatctataattctaaataatataatttagaaatatactatgtatt </p>

10

20

30

40

50

識別子 (配列番号)	配列
	ctaaaatctatatatttctaataatctataacttctaataatctatatgtttctaataatatttagaataatataatatt tcaggccagctcagtggtcacacctgtaatcccagcaactttgggaggtgagcagcagatcacctgaggtcagggattca aggccagcctggcctacgtggtgaaacctgtctctactaaaaatacaaaaatagccgggtgtggtggcaatgcctctaact ctggctactctggaggtgagacaggaatgcttgaacctgggagggggttacagtgagtcgaggtcgccattgca ctccagccaggaacaagagtgaaactctgtctcaacaacaataacatacatatataatattcagtttaactagaaaaa tcttctgaataaagatcttccctcttggccgtgaaaaatcgaacattcttggccatctagaggggaaagaaaagactttg ttctgtgtgtttcaagaaattccatgtcagcaatataagagattgtaaggattgtaaggccgtgtaggcattcaattctctgcagaa accgaaaattcttccatgcccctgcaatgtgctcatcaaacctctttcagacctctttcagacctccttccacaaagactctccaaaacttt ctgaagcacaaattttatgaagctatagaacgtttaagacctttcagacctcctttcagacctccttccacaaagactctccaaaacttt aaaaatgaagcagaaaacgagcctaaagagactttcataccgacaacatctgaaaaggactagaaatggttcacaccacgactctgg atttcttaattttttgtttttgtttgtttctctagtctacgggtttgattattttagtcagtgaataatattgattac tcacacatagatcaagagagacacggctcctgacctctatggagcttttagggaaaaatgaagtggtctttggagctagagttg actcagaagccgaaattcctagaaatcaggttttctactgtaggcaattgaagtataaacatttttataaacactgtctttctt tctgtttcacaccacatgcagaaaagtttctaatctcagatcggggatgtcaacaaaattccatttcaaaaggaaatgacctgc aaaaactcctaaattttccaagcraatgccccttaacctgtctgtttatctgttttcttgaacagaaaattctacatgaccataa aacctcgaagatgggtatggcacagttcatgcccctgtaatcctagcactttgggaggtgagccagggatggtcacaagccc aggagtttgagaccagtggtggcaacagagtgagaacctctaccraaaaaaaaattaaaaattagccaagcatggtgat gatataggagtttaggagaaatcatttaggcaaatagcaaggttaggactctcagtaaggttttccattttaaataagaaagca gccccaaaatcatttttcttaaaaagacagcctgtaaaatcgagctgcagacatagacaagcaagctggaagcttcc acgggtgaaatgccccagctgtgccaaatagaaaaagctacctagctaggcatgtccaaaatggcggctccaagttcccccttc tctttgccagccatgtgtacagtaaaaagcagcaacatagtgctcagccaaaagctcattttgcataataagattagggttgggt gcccagctcacataggggtaggcccttaggtaaaatcagacacccgcttctcaagcctgtctataaaaatcgtggtacactatgacg agggtcagatttcccattcagacgcccctctcccattgcaagagaaagctgtctcctttctctttcttttggcctattaaaac ctctgtctctggccagccagtggtgctcacgctataatcccagcactttgggaggtgaggtggtcagatcacctaaaggtca ggagttcaagaccagcctggtcaacatggtgaaaatcttgtctctagtataaaaatacaaaaaataatgaaaatctacatagatga taatattagttccaaaagcaactcaacctggtagattctaaattttttttagggcagggctttgcttttgcacccaatgctgga gtacaaatggcacaacactgctcactgcagcctcgacctcccagcctaaagcaatcctcctgcctcagtcctccctccaggt tttgaaactacaggtgtgtaccaccacacccggctaaatttttgtattttttgtagagacgtgggtctcacatgctgcccag cttaggtcttaattctctgagctcaggaatccgacggcctcagcctcccctaaagtgggggattacaggtttgagccactgca cctagcctctattttgtttttacaaaagagaaaattgagatcctgaaatggttaagtactttgcctgagggcctaccactaacaggag

10

20

30

40

50

【表 1 9 - 2 2】

識別子 (配列番号)	配列
	CCAGGGTTAGGATTCAAACCCCATCCAACCTGGTCCCAGAGCTGGAGCTTCTTGCACCTGCCCTACACTACCACATCTCCATC CTCTGGGCACCTTTTATAAGAACCAAAAACATACAGAGCAATGCTTTGTCAACTCAGCTGGGAACATTTCCAGTGGCAACTC ACATTTTCACTGCTGTGGCTGTCCGTATAAGCTCAATGAGTATGATTTAGGGCTTTGGAGAACTTTGAAATGCTACCCC CCAAGTAACCAATGTTGGCAACCTGGTACCTCTACTTTAGCCATTTCTCTATAAATAGTCAGAACTAACCCACTT GGTAACAGGCAICCTTGGCAAGCTCCACCACCTAGGTCAGTGTAGAAATAAAGAAAGAGGAAAGAAACACAAAAGTGGCTT GATGGTTAAGACAGGTTTATTTAGAGAAAACACACCTGAGAGGGTGTGGTGAATTAGGTTAGAGTCTTTTCTACAGAC TAAGAGTGTTTAAGGATTTAGGTTGGAGAGTCTTTAGAGGCTTGGACTGCTTCTGTGTTTTTTTGGTTGCTTATATGGG AGGGAGAGTGGTGTGTTTTGCTTTTATACATTTTTCTGCAGCTGTAGGCAACCCCAAGTCTGCTTTTAGCTTCCCTATTTT AGTGCACCTGGAGGAAAGGAATGTGCTTATAAGGCCACTGTTTTACTGGGGCCCAATGTATGAGGGTGAAGTTTGGCAGT TACCCAAGAGACTTTCCICCCACTTCTGTGCCGAGCTTTTTATCTGCAATTTACTGTCTGCTTTTTTTTGGCTGCTTA TAGTTTTTAAAAAGTAAATTTCCCTTAAATCCAGAGGCTAAAAATGAACTTAAAGTGGCGGTGTTGTCCAAAATA ACGGGGCTCCTGCTCGCCAGTCACTCCCTCAAGTCACTCCTGATCCTCAACTCCATGCCATAAGGCTGGTTCAGAGACCA CATAAATCTGCCTTTTTATACATACATGATGGTGCATGGGATTTCTGGTGGCTTTTGGTTGATATAGACTGCTAAGGTGAG ATGGGGAATATCAGAGTCAAGTCTGCTTGGAGAACACACACAGCTGGAGGCTTGGAACTGTTGGGTCCTATGAGTGT AGAGCCCATATCCCCATAGAGTCTACAGCAGGGGTCCGCAATTTTTCTTAAAGAGCTGATAGTATATGTTAGGC TTTTGAGCCAGGTAATTTACAGCAACTCAATTTACCACTGTGGTATGAAAACAGCTATAGACAAATCATAAATGAATGATCAT GGCTATGTTTTTAAATAAACCTTACAGACACTGAACTTGAACCTTCCATTGTGATATGAAAACAGCTATAGCAATCATAAAATGA ATGATCATGGCTATGTTTTTAAATAAACCTTATGGACACTGAGCTTGAACCTTCAATATATCAGTCAATGACACAAAATATCAT CTTCTTTTATTTGTTTTTCCCAATTTGAAAATGTAATAACTATTTAGCTGTACAGAAACAGATGGTGGTCCAGATTTGA CTCAGTCCCATAGTTTTCCAGACCAATGATGTTTCCAGGTTTCCAGGTTTCCAGGTTTCCAGCTTACACTAATTTTATTCATCCATTCATCA CATATGATGAGCACATACAGACACACCTCAGAGATATTTGCAGGGTCCACTCCAGATCACCACAATAATGTAATATTTGCCAA TAAAGCAAGTCAATACACATTT

10

20

30

40

【 0 1 6 2】

二重及び多重 g R N A 組成物並びにその使用

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の g R N A (例えば、表 1 ~ 1 9 の g R N A) は、例えば、ヌクレアーゼをゲノム内の 1 つ以上の部位に標的化するために、1 つ以上の g R N A と組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の多重 g R N A (例えば、表 1 ~ 1 9 の 2 つ以上の g R N A) は、例えば、ヌクレアーゼをゲノム内の複数の部位に標的化するために、組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の g R N A (例えば、表 1 ~ 1 9 の g R N A) は、例えば、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 g R N A

50

と組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の g R N A (例えば、表 1 ~ 19 の g R N A) は、例えば、ヌクレアーゼをゲノム内の 3 つの部位に標的化するために、第 3 の g R N A と組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の g R N A (例えば、表 1 ~ 19 の g R N A) は、例えば、ヌクレアーゼをゲノム内の 4 つの部位に標的化するために、第 4 の g R N A と組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の g R N A (例えば、表 1 ~ 19 の g R N A) は、例えば、ヌクレアーゼをゲノム内の 5 つの部位に標的化するために、第 5 の g R N A と組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の g R N A (例えば、表 1 ~ 19 の g R N A) は、例えば、ヌクレアーゼをゲノム内の 6 つの部位に標的化するために、第 6 の g R N A と組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の g R N A (例えば、表 1 ~ 19 の g R N A) は、例えば、ヌクレアーゼをゲノム内の 7 つの部位に標的化するために、第 7 の g R N A と組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の g R N A (例えば、表 1 ~ 19 の g R N A) は、例えば、ヌクレアーゼをゲノム内の 8 つの部位に標的化するために、第 8 の g R N A と組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の g R N A (例えば、表 1 ~ 19 の g R N A) は、例えば、ヌクレアーゼをゲノム内の 9 つの部位に標的化するために、第 9 の g R N A と組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の g R N A (例えば、表 1 ~ 19 の g R N A) は、例えば、ヌクレアーゼをゲノム内の 10 個の部位に標的化するために、第 10 の g R N A と組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の g R N A (例えば、表 1 ~ 19 の g R N A) は、例えば、ヌクレアーゼをゲノム内の 10 個超の部位に標的化するために、第 10 超の g R N A と組み合わせて使用することができる。

【0163】

例えば、いくつかの実施形態では、例えば、細胞が第 1 の系統特異的細胞表面抗原を標的とする薬剤、及び第 2 の系統特異的細胞表面抗原を標的とする薬剤の 2 つ薬剤に対して耐性であることができるように、第 1 の系統特異的細胞表面抗原 (例えば、系統特異的細胞表面抗原、例えば、C D 3 3、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 1 9、C D 3 0、C D 5、C D 6、C D 7、C D 3 4、C D 3 8、又は B C M A) 及び第 2 の系統特異的細胞表面抗原 (例えば、系統特異的細胞表面抗原、例えば、C D 3 3、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 1 9、C D 3 0、C D 5、C D 6、C D 7、C D 3 4、C D 3 8、又は B C M A) に対して不足している造血細胞を産生することが望ましい。いくつかの実施形態では、2 つ以上の切断を行い、2 つの切断部位間に欠失を作り出すために、系統特異的細胞表面抗原 (例えば、系統特異的細胞表面抗原、例えば、C D 3 3、C L L - 1、C D 1 2 3、C D 1 9、C D 3 0、C D 5、C D 6、C D 7、C D 3 4、C D 3 8、又は B C M A) の異なる領域を標的とする 2 つ以上の異なる g R N A と細胞を接触させることが望ましい。

【0164】

したがって、本開示は、g R N A 及び関連する C R I S P R 系の様々な組み合わせ、並びに g R N A 及び関連する C R I S P R 系のそのような組み合わせを使用したゲノム編集方法により作られた細胞を提供する。いくつかの実施形態では、第 1 の系統特異的細胞表面抗原 g R N A は、第 2 の g R N A とは異なるヌクレアーゼと結合する。例えば、いくつかの実施形態では、第 1 の系統特異的細胞表面抗原 g R N A は、C a s 9 と結合してもよく、第 2 の g R N A は、C a s 1 2 a に結合してもよく、又はその逆であってもよい。

【0165】

したがって、本開示は、g R N A 及び関連する塩基編集系の様々な組み合わせ、並びに g R N A 及び関連する塩基編集系のそのような組み合わせを使用したゲノム編集方法により作られた細胞を提供する。

【0166】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される 2 つ以上 (例えば、3 つ、4 つ、又はそれ以上) の g R N A が混合される。いくつかの実施形態では、各 g R N A は、別個の容

器中にある。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のキット（例えば、表 1 ~ 19 による 1 つ以上の gRNA を含むキット）はまた、Cas9 分子、又は Cas9 分子をコードする核酸を含む。

【0167】

いくつかの実施形態では、例えば、核酸塩基に複数の化学的变化をもたらすために、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又は CD312 (EMR2) の異なる部位を標的とする 2 つ以上の異なる gRNA と細胞を接触させることが望ましい。いくつかの実施形態では、第 1 及び第 2 の gRNA は、表 1 ~ 19 による gRNA 又はそのバリエーションである。

【0168】

いくつかの実施形態では、例えば、核酸塩基に複数の化学的变化をもたらすために、CD33 の異なる部位を標的とする 2 つ以上の異なる gRNA と細胞を接触させることが望ましい。いくつかの実施形態では、第 1 及び第 2 の gRNA は、表 1 ~ 19 による gRNA 又はそのバリエーションである。

【0169】

いくつかの実施形態では、例えば、核酸塩基に複数の化学的变化をもたらすために、CLL-1 の異なる部位を標的とする 2 つ以上の異なる gRNA と細胞を接触させることが望ましい。いくつかの実施形態では、第 1 及び第 2 の gRNA は、表 1 ~ 19 による gRNA 又はそのバリエーションである。

【0170】

いくつかの実施形態では、例えば、核酸塩基に複数の化学的变化をもたらすために、CD123 の異なる部位を標的とする 2 つ以上の異なる gRNA と細胞を接触させることが望ましい。いくつかの実施形態では、第 1 及び第 2 の gRNA は、表 1 ~ 19 による gRNA 又はそのバリエーションである。

【0171】

いくつかの実施形態では、第 1 の gRNA は、本明細書に記載の CD33 gRNA (例えば、表 1 ~ 5 の gRNA 又はそのバリエーション) であり、第 2 の gRNA は、BCMA、CD19、CD20、CD30、ROR1、B7H6、B7H3、CD23、CD33、CD38、C 型レクチン様分子 - 1 (CLL-1)、CS1、IL-5、L1-CAM、PSCA、PSMA、CD138、CD133、CD70、CD7、CD13、NKG2D、NKG2D リガンド、CLEC12A、CD11、CD123、CD56、CD30、CD34、CD14、CD66b、CD41、CD61、CD62、CD235a、CD146、CD326、LMP2、CD22、CD52、CD10、CD3/TCR、CD79/B220、及び CD26 から選択される系統特異的細胞表面抗原を標的とする。ある特定の実施形態では、第 2 の gRNA は、CLL-1 又は CD123 gRNA である。

【0172】

いくつかの実施形態では、第 1 の gRNA は、本明細書に記載の CD33 gRNA (例えば、表 1 ~ 5 による gRNA 又はそのバリエーション) であり、第 2 の gRNA は、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))、CD52 (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及び悪性黒色腫)、CD3/T 細胞受容体 (TCR) (T 細胞リンパ腫及び白血病)、CD79/B 細胞受容体 (BCR) (B 細胞リンパ腫及び白血病)、CD26 (上皮及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)、RCAS1 (婦人科がん、胆管がん、及び膵管腺がん)、並びに前立腺特異的膜抗原などの特定のタイプのがんと関連する系統特異的細胞表面抗原を標的とする。

【0173】

いくつかの実施形態では、第 1 の gRNA は、本明細書に記載の CD33 gRNA (例えば、表 1 ~ 5 による gRNA 又はそのバリエーション) であり、第 2 の gRNA は、CD

10

20

30

40

50

7、CD13、CD19、CD22、CD20、CD25、CD32、CD38、CD44、CD45、CD47、CD56、96、CD117、CD123、CD135、CD174、CLL-1、葉酸受容体、IL1RAP、MUC1、NKG2D/NKG2DL、TIM-3、又はWT1から選択される系統特異的細胞表面抗原を標的とする。

【0174】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書に記載のCD33 gRNA (例えば、表1~5によるgRNA又はそのパリアント)であり、第2のgRNAは、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8a、CD8b、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD16、CD16b、CD17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32a、CD32b、CD32c、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD45、CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RO、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60a、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64a、CD65、CD65s、CD66a、CD66b、CD66c、CD66F、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD75S、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85A、CD85C、CD85D、CD85E、CD85F、CD85G、CD85H、CD85I、CD85J、CD85K、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD99R、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107a、CD107b、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120a、CD120b、CD121a、CD121b、CD121a、CD121b、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CDw145、CD146、CD147、CD148、CD150、CD152、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156a、CD156b、CD156c、CD157、CD158b1、CD158b2、CD158d、CD158e1/e2、CD158f、CD158g、CD158h、CD158i、CD158j、CD158k、CD159a、CD159c、CD160、CD161、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167a、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172a、CD172b、CD172g、CD173、CD174、CD175、CD175s、CD176、CD177、CD178、CD179a、CD179b、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CDw198、CDw199、CD200、CD201、CD202b、CD203c、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210a、CDw210b、CD212、CD213a1、CD213a2、CD215、CD217、CD218a、CD218b、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235a、CD235b、CD236、CD236R、CD238、CD239

10

20

30

40

50

、CD 2 4 0、CD 2 4 1、CD 2 4 2、CD 2 4 3、CD 2 4 4、CD 2 4 5、CD 2 4 6、CD 2 4 7、CD 2 4 8、CD 2 4 9、CD 2 5 2、CD 2 5 3、CD 2 5 4、CD 2 5 6、CD 2 5 7、CD 2 5 8、CD 2 6 1、CD 2 6 2、CD 2 6 3、CD 2 6 4、CD 2 6 5、CD 2 6 6、CD 2 6 7、CD 2 6 8、CD 2 6 9、CD 2 7 0、CD 2 7 2、CD 2 7 2、CD 2 7 3、CD 2 7 4、CD 2 7 5、CD 2 7 6、CD 2 7 7、CD 2 7 8、CD 2 7 9、CD 2 8 0、CD 2 8 1、CD 2 8 2、CD 2 8 3、CD 2 8 4、CD 2 8 6、CD 2 8 8、CD 2 8 9、CD 2 9 0、CD 2 9 2、CD w 2 9 3、CD 2 9 4、CD 2 9 5、CD 2 9 6、CD 2 9 7、CD 2 9 8、CD 2 9 9、CD 3 0 0 a、CD 3 0 0 c、CD 3 0 0 e、CD 3 0 1、CD 3 0 2、CD 3 0 3、CD 3 0 4、CD 3 0 5、CD 3 0 6、CD 3 0 7 a、CD 3 0 7 b、CD 3 0 7 c、CD 3 0 7 d、CD 3 0 7 e、CD 3 0 9、CD 3 1 2、CD 3 1 4、CD 3 1 5、CD 3 1 6、CD 3 1 7、CD 3 1 8、CD 3 1 9、CD 3 2 0、CD 3 2 1、CD 3 2 2、CD 3 2 4、CD 3 2 5、CD 3 2 6、CD 3 2 7、CD 3 2 8、CD 3 2 9、CD 3 3 1、CD 3 3 2、CD 3 3 3、CD 3 3 4、CD 3 3 5、CD 3 3 6、CD 3 3 7、CD 3 3 8、CD 3 3 9、CD 3 4 0、CD 3 4 4、CD 3 4 9、CD 3 5 0、CD 3 5 1、CD 3 5 2、CD 3 5 3、CD 3 5 4、CD 3 5 5、CD 3 5 7、CD 3 5 8、CD 3 5 9、CD 3 6 0、CD 3 6 1、CD 3 6 2、又はCD 3 6 3 から選択される系統特異的細胞表面抗原を標的とする。

10

【0175】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書に記載のCD33 gRNA (例えば、表1~5によるgRNA又はそのバリエーション)であり、第2のgRNAは、例えば、CD 1 a、CD 1 b、CD 1 c、CD 1 d、CD 1 e、CD 2、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 1 0、CD 1 1 a、CD 1 1 b、CD 1 1 c、CD 1 1 d、CD 1 3、CD 1 4、CD 1 5、CD 1 6 a、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、CD 3 3、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 5 0、CD 5 1、CD 5 2、CD 5 3、CD 5 4、CD 5 5、CD 5 6、CD 5 7、CD 5 8、CD 5 9、CD 6 0 a、CD 6 0 b、CD 6 0 c、CD 6 1、CD 6 2 E、CD 6 2 L、CD 6 2 P、CD 6 3、CD 6 4、CD 6 5 s、CD 6 6 a、CD 6 6 b、CD 6 6 c、CD 6 6 d、CD 6 6 e、CD 6 6 f、CD 6 7、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 b、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 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 2、CD 1 2 3、CD 1 2 4、CD 1 2 5、CD 1 2 6、CD 1 2 7、CD 1 2 8 a、CD 1 2 8 b、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 4、CD 1 4 6、CD 1 4 7、CD 1 4 8、CD 1 5 0、CD 1 5 1、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 a、CD 1 5 8 b 1、CD 1 5 8 b 2

20

30

40

50

、CD158c、CD158d、CD158e1、CD158e2、CD158f、CD158g、CD158h、CD158i、CD158j、CD158k、CD159a、CD159c、CD160、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167a、CD167b、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172a、CD172b、CD172g、CD173、CD174、CD175、CD175s、CD176、CD177、CD178、CD179a、CD179b、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CD198、CD199、CD200、CD201、CD202b、CD203c、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210a、CD210b、CD212、CD213a1、CD213a2、CD215、CD217、CD218a、CD218b、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235a、CD235b、CD236、CD238、CD239、CD240CE、CD240D、CD241、CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD252、CD253、CD254、CD256、CD257、CD258、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD270、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、CD283、CD284、CD286、CD288、CD289、CD290、CD292、CDw293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300a、CD300c、CD300d、CD300e、CD300f、CD300g、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、CD306、CD307a、CD307b、CD307c、CD307d、CD307e、CD309、CD312、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319、CD320、CD321、CD322、CD324、CD325、CD326、CD327、CD328、CD329、CD331、CD332、CD333、CD334、CD335、CD336、CD337、CD338、CD339、CD340、CD344、CD349、CD350、CD351、CD352、CD353、CD354、CD355、CD357、CD358、CD360、CD361、CD362、CD363、CD364、CD365、CD366、CD367、CD368、CD369、CD370、及びCD371から選択される、細胞表面抗原を標的とする。

【0176】

いくつかの実施形態では、第2のgRNAは、PCT公開第WO2017/066760号、同第WO2019/046285号、同第WO2018/160768号、又はBorot et al. PNAS (2019) 116(24): 11978-11987のいずれかに開示されるgRNAであり、それらの各々が、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。

【0177】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書に記載のCD33 gRNA (例えば、表1~5によるgRNA又はそのバリエーション)であり、第2のgRNAは、CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (CD2サブセット1、CRACC、SLAMF7、CD319、及び19A24とも称される); C型レクチン様分子-1 (CLECL1); 上皮成長因子受容体バリエーションIII (EGFRvIII); ガングリオシドG2 (CD2); ガングリオシドGD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlep(1-1)Cer); TNF受容体ファミリーメンバーB細胞成熟 (BCMA)、Tn抗原 ((Tn Ag)又は(GalNAc . アルファ . -Ser/Thr)); 前立腺特異的膜抗原 (PSMA);

受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1 (ROR1); Fms様チロシンキナーゼ3 (FLT3); 腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG72); CD38; CD44v6; がん胎児抗原 (CEA); 上皮細胞接着分子 (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2 (IL-13Ra2又はCD213A2); メソテリン; インターロイキン11受容体アルファ (IL-11Ra); 前立腺幹細胞抗原 (PSCA); タンパク質分解酵素セリン21 (テスチン又はPRSS21); 血管内皮増殖因子受容体2 (VEGFR2); ルイス(Y)抗原; CD24; 血小板由来成長因子受容体ベータ (PDGFR-ベータ); ステージ特異的胚抗原-4 (SSEA-4); CD20; 葉酸受容体アルファ; 受容体チロシン-タンパク質キナーゼERBB2 (Her2/neu); ムチン1、細胞表面関連 (MUC1); 上皮成長因子受容体 (EGFR); 神経細胞接着分子 (NCAM); プロスターゼ; 前立腺酸性ホスファターゼ (PAP); 伸長因子2変異 (ELF2M); エフリンB2; 線維芽細胞活性化タンパク質アルファ (FAP); インスリン様成長因子I受容体 (IGF-I受容体)、炭酸脱水酵素IX (CAIX)、プロテアソーム (Prosome、Macropain) サブユニット、ベータ型9 (LMP2); 糖タンパク質100 (gp100); 限界点クラスター領域 (BCR) 及びエーベルソンマウス白血病ウイルスがん遺伝子相同体1 (Ab1) (bcr-ab1) からなるがん遺伝子融合タンパク質; チロシナーゼ; エフリンA型受容体2 (EphA2); フコシルGM1; シアリルルイス接着分子 (sLe); ガングリオシドGM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); トランスグルタミナーゼ5 (TGS5); 高分子量-メラノーマ関連抗原 (HMWMAA); o-アセチル-GD2ガングリオシド (OAcGD2); 葉酸受容体ベータ; 腫瘍血管内皮マーカー1 (TEM1/CD248); 腫瘍血管内皮マーカー7関連 (TEM7R); クロロイン6 (CLDN6); 甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR); Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5、メンバーD (GPRC5D); 染色体Xオープンリーディングフレーム61 (CXORF61); CD97; CD179a; 未分化リンパ腫キナーゼ (ALK); ポリシアル酸; 胎盤特異的1 (PLAC1); globoH糖セラミド (GloboH) のヘキササッカリド部分; 乳腺分化抗原 (NY-BR-1); ウロプラキン2 (UPK2); A型肝炎ウイルス細胞受容体1 (HAVCR1); アドレナリン受容体ベータ3 (ADRB3); パネキシン3 (PANX3); Gタンパク質共役受容体20 (GPR20); リンパ球抗原6複合体; 遺伝子座K9 (LY6K); 味覚受容体51E2 (OR51E2); TCRガンマ代替リーディングフレームタンパク質 (TARP); ウィルムス腫瘍タンパク質 (WT1); がん/精巢抗原1 (NY-ESO-1); がん/精巢抗原2 (LAGE-1a); メラノーマ関連抗原1 (MAGE-A1)、染色体12pに位置するETS転座バリエーション遺伝子6 (ETV6-AML); 精子タンパク質17 (SPA17); X抗原ファミリー、メンバー1A (XAGE1); アンジオポエチン結合細胞表面受容体2 (Tie2); メラノーマがん精巢抗原-1 (MAD-CT-1); メラノーマがん精巢抗原-2 (MAD-CT-2); Fos関連抗原1; 腫瘍タンパク質p53 (p53); p53変異体; プロステイン; サバイピン; テロメラーゼ; 前立腺がん腫瘍抗原-1 (PCTA-1又はガレクチン8)、T細胞1によって認識されるメラノーマ抗原 (MelanA又はMART1); ラット肉腫 (Ras) 変異体; ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT); 肉腫転座限界点; アポトーシスのメラノーマインヒビター (ML-1AP); ERG (膜貫通型タンパク質分解酵素、セリン2 (TMPRSS2) ETS融合遺伝子); N-アセチルグルコサミニル-トランスフェラーゼV (NA17); 対形成ボックスタンパク質Pax-3 (PAX3); アンドロゲン受容体; サイクリンB1; v-myctリ骨髄細胞腫瘍ウイルスがん遺伝子ニューロブラストーマ由来相同体 (MYCN); Ras相同体ファミリーメンバーC (RhoC); チロシナーゼ関連タンパク質2 (TRP-2); チトクロムP450 1B1 (CYP1B1); CCCC結合因子 (ジnkフィンガータンパク質) 様 (インプリント部位の制御因子のBORIS又は同類)、T細胞3によって認識される扁平上皮がん抗原 (SART3); 対形成ボックスタンパク質Pax-5 (PAX

10

20

30

40

50

5) ; プロアクトシン結合タンパク質 s p 3 2 (O Y - T E S 1) ; リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ (L C K) ; Aキナーゼアンカータンパク質4 (A K A P - 4) ; 滑膜肉腫、X限界点2 (S S X 2) ; 終末糖化産物の受容体 (R A G E - 1) ; 腎ユビキタス1 (R U 1) ; 腎ユビキタス2 (R U 2) ; レグマイン ; ヒトパピローマウイルス E 6 (H P V E 6) ; ヒトパピローマウイルス E 7 (H P V E 7) ; 腸カルボキシエステラーゼ ; 熱ショックタンパク質70-2変異 (m u t h s p 7 0 - 2) ; C D 7 9 a ; C D 7 9 b ; C D 7 2 ; 白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (L A I R 1) ; I g A受容体のFc断片 (F C A R 又は C D 8 9) ; 白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2 (L I L R A 2) ; C D 3 0 0分子様ファミリーメンバーf (C D 3 0 0 L F) ; C型レクチンドメインファミリー12メンバーA (C L E C 1 2 A) ; 骨髄間質細胞抗原2 (B S T 2) ; ムチン様ホルモン受容体様2 (E M R 2) を含有する E G F様モジュール、リンパ球抗原75 (L Y 7 5) ; グリピカン-3 (G P C 3) ; Fc受容体様5 (F C R L 5) ; 並びに免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1 (I G L L 1) から選択される系統特異的細胞表面抗原を標的とする。

10

【0178】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書に記載のCD33 gRNA (例えば、表1~5によるgRNA又はそのバリエーション)であり、第2のgRNAは、CD11a、CD18、CD19、CD20、CD31、CD33、CD34、CD44、CD45、CD47、CD51、CD58、CD59、CD63、CD97、CD99、CD100、CD102、CD123、CD127、CD133、CD135、CD157、CD172b、CD217、CD300a、CD305、CD317、CD321、及びCLL-1から選択される系統特異的細胞表面抗原を標的とする。

20

【0179】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書に記載のCD33 gRNA (例えば、表1~5によるgRNA又はそのバリエーション)であり、第2のgRNAは、CD123、CLL-1、CD38、CD135 (FLT3)、CD56 (NCAM1)、CD117 (c-KIT)、FR (FOLR2)、CD47、CD82、TNFRSF1B (CD120B)、CD191、CD96、PTPRJ (CD148)、CD70、LILRB2 (CD85D)、CD25 (IL2Rアルファ)、CD44、CD96、NKG2Dリガンド、CD45、CD7、CD15、CD19、CD20、CD22、CD37、及びCD82から選択される系統特異的細胞表面抗原を標的とする。

30

【0180】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書に記載のCD33 gRNA (例えば、表1~5によるgRNA又はそのバリエーション)であり、第2のgRNAは、CD7、CD11a、CD15、CD18、CD19、CD20、CD22、CD25、CD31、CD34、CD37、CD38、CD44、CD45、CD47、CD51、CD56、CD58、CD59、CD63、CD70、CD82、CD85D、CD96、CD97、CD99、CD100、CD102、CD117、CD120B、CD123、CD127、CD133、CD135、CD148、CD157、CD172b、CD191、CD217、CD300a、CD305、CD317、CD321、CLL-1、FR (FOLR2)、又はNKG2Dリガンドから選択される系統特異的細胞表面抗原を標的とする。

40

【0181】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書に記載のCD33 gRNA (例えば、表1~5によるgRNA又はそのバリエーション)であり、第2のgRNAは、CLL-1を標的とする。

【0182】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書に記載のCD33 gRNA (例えば、表1~5によるgRNA又はそのバリエーション)であり、第2のgRNAは、CD123を標的とする。

50

【0183】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書に記載のCD33 gRNA (例えば、表1~5によるgRNA又はそのバリエーション)であり、第2のgRNAは、表1~19の配列を含む。

【0184】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、標的化ドメインを含むCD33 gRNAであり、標的化ドメインは、表1~5の配列を含み、第2のgRNAは、表1~19の配列に対応する標的化ドメインを含む。

【0185】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、本明細書に記載のCD33 gRNA (例えば、表1~sによるgRNA又はそのバリエーション)であり、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、又はそれ以上のgRNAは、表1~19の配列を含む。 10

【0186】

いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、標的化ドメインを含むCD33 gRNAであり、標的化ドメインは、表1~5の配列を含み、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、又はそれ以上のgRNAは、表1~19の配列に対応する標的化ドメインを含む。

【0187】

いくつかの実施形態では、第2のgRNAは、WO2017/066760、WO2019/046285、WO/2018/160768、又はBorot et al. PNAS June 11, 2019 116(24)11978-11987のいずれかに開示されるgRNAである。 20

【0188】

核酸塩基への2つ以上の化学的変化を含む細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の操作された細胞は、核酸塩基に対して2つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上)の化学的変化を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された細胞は、2つ以上の変異(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上)を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の操作された細胞は、CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)中の核酸塩基に対して2つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上)の化学的変化を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の操作された細胞は、核酸塩基に対して2つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上)の化学的変化を含み、核酸塩基に対する第1の化学的変化はCD33にあり、核酸塩基に対する第2の化学的変化は第2の系統特異的細胞表面抗原にある。このような細胞は、いくつかの実施形態では、2つの抗原：抗CD33剤及び第2の系統特異的細胞表面抗原を標的とする薬剤に耐性であり得る。いくつかの実施形態では、このような細胞は、本明細書に記載される2つ以上のgRNA、例えば、表1~19のgRNA及び第2のgRNAを使用して産生することができる。いくつかの実施形態では、このような細胞は、本明細書に記載される2つ以上のgRNA、例えば、表1~19のgRNA及び第2のgRNAを使用して産生することができる。いくつかの実施形態では、このような細胞は、本明細書に記載される2つ以上のgRNA、例えば、表1~19のgRNA及び第2のgRNAを使用して産生することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、例えば、ZFN又はTALENを使用して産生することができる。本開示は、本明細書に記載される細胞を含む集団も提供する。 30 40

【0189】

いくつかの実施形態では、核酸塩基に対する第2の化学的変化は、系統特異的細胞表面抗原、例えば、前述のセクションに列挙されるものをコードする遺伝子にある。いくつかの実施形態では、第2の変異は、表1~19に列挙される部位にある。

【0190】

典型的には、本明細書に提供される方法及び組成物によってもたらされる変異、例えば、標的遺伝子、例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)、並びに/又は本開示に言及される任意の他の標的遺伝子などにおける変異は、標的遺伝子によってコードされる遺伝子産物の機能喪失をもたらす、例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 遺伝子における変異の場合、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) タンパク質の機能喪失をもたらす。いくつかの実施形態では、機能の喪失は、遺伝子産物の発現のレベルの低減、例えば、より低いレベルの発現への低減、又は遺伝子産物の発現の完全な無効化である。いくつかの実施形態では、変異は、遺伝子産物の非機能的バリエーションの発現をもたらす。例えば、コード配列、短縮遺伝子産物において未成熟終止コドンを生じる変異の場合、又はナンセンス若しくはミスセンス変異を生じる変異の場合、遺伝子産物を非機能的にする改変されたアミノ酸配列によって特徴付けられる遺伝子産物。いくつかの実施形態では、遺伝子産物の機能は、結合パートナーを結合又は認識するものである。いくつかの実施形態では、遺伝子産物、例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) の遺伝子産物、第2の系統特異的細胞表面抗原の遺伝子産物、又は両方の遺伝子産物の発現の低減は、野生型又は操作されていない対応物細胞におけるレベルの50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、2%以下、又は1%以下である。

【0191】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される方法によって、及び/又は組成物を使用して生成される細胞の集団におけるCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 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%、又は少なくとも95%のコピーが、変異を有する。いくつかの実施形態では、細胞の集団における第2の系統特異的細胞表面抗原の少なくとも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%、又は少なくとも95%のコピーが、変異を有する。いくつかの実施形態では、細胞の集団におけるCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 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%、又は少なくとも95%のコピー並びに第2の系統特異的細胞表面抗原のものが、変異を有する。いくつかの実施形態では、集団は、1つ以上の野生型細胞を含む。いくつかの実施形態では、集団は、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) の1つの野生型コピーを含む1つ以上の細胞を含む。いくつかの実施形態では、集団は、第2の系統特異的細胞表面抗原の1つの野生型コピーを含む1つ以上の細胞を含む。

【0192】

細胞

本開示のいくつかの態様は、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2) の発現、又はCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2) を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2) のバリエーション形態の発現の喪失をもたらすそれら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。そのような

修飾は、塩基編集事象を介して導入され得る。そのような塩基編集事象は、核酸塩基への化学的变化を含み得るが、これに限定されない。特定の実施形態では、編集事象は、シトシンの脱アミノ化を含み得る。いくつかの実施形態では、編集事象は、アデニンの脱アミノ化を含み得る。特定の実施形態では、編集事象は、核酸塩基転移を含み得る。特定の実施形態では、編集事象は、核酸塩基転換を含み得る。特定の実施形態では、編集事象は、シトシン - グアニン (C - G) 塩基対を、標的核酸分子内のチミン - アデニン (T - A) 塩基対に変換することを含み得る。特定の実施形態では、編集事象は、チミン - アデニン (T - A) 塩基対を、標的核酸分子内のシトシン - グアニン (C - G) 塩基対に変換することを含み得る。特定の実施形態では、編集事象は、標的核酸分子内に未成熟終止コドンを導入することを含み得る。特定の実施形態では、編集事象は、標的核酸分子内にスプライス部位を導入することを含み得る。特定の実施形態では、編集事象は、標的核酸分子内のスプライス部位を破壊することを含み得る。したがって、本開示のいくつかの態様では、CD33 (Siglec - 3)、CLL - 1、CD123、CD327 (Siglec - 6)、及び/若しくはCD312 (EMR2) の発現、又はCD33 (Siglec - 3)、CLL - 1、CD123、CD327 (Siglec - 6)、及び/若しくはCD312 (EMR2) を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD33 (Siglec - 3)、CLL - 1、CD123、CD327 (Siglec - 6)、及び/若しくはCD312 (EMR2) のパリアント形態の発現の喪失をもたらすそれらのゲノムにおける複数の修飾を含む遺伝子操作された細胞を提供する。

10

【0193】

20

例えば、本開示のいくつかの態様は、例えば、内因性CD33 (Siglec - 3)、CLL - 1、CD123、CD327 (Siglec - 6)、及び/又はCD312 (EMR2) 遺伝子において修飾 (例えば、終止コドン又は変異スプライス部位) を有する新規細胞を提供する。特に、複数の遺伝子操作された造血幹細胞又は前駆細胞を含む細胞集団が本明細書に提供されており、細胞の少なくとも一部分は、(i) 編集されたCD33 (Siglec - 3) 遺伝子、(ii) 編集されたCLL - 1 遺伝子、(iii) 編集されたCD123 遺伝子、(iv) 編集されたCD327 (Siglec - 6) 遺伝子、(v) 編集されたCD312 (EMR2) 遺伝子、(vi) 編集されたCD33 (Siglec - 3) 遺伝子及び編集されたCLL - 1 遺伝子、(vii) 編集されたCD33 (Siglec - 3) 遺伝子及び編集されたCD123 遺伝子、(viii) 編集されたCD33 (Siglec - 3) 遺伝子及び編集されたCD327 (Siglec - 6) 遺伝子、(ix) 編集されたCD33 (Siglec - 3) 遺伝子及び編集されたCD312 (EMR2) 遺伝子、(x) 編集されたCD33 (Siglec - 3) 遺伝子、編集されたCLL - 1 遺伝子、及び編集されたCD123 遺伝子、(xi) 編集されたCD33 (Siglec - 3) 遺伝子、編集されたCLL - 1 遺伝子、編集されたCD123 遺伝子、及び編集されたCD327 (Siglec - 6) 遺伝子、(xii) 編集されたCD33 (Siglec - 3) 遺伝子、編集されたCLL - 1 遺伝子、編集されたCD123 遺伝子、編集されたCD327 (Siglec - 6) 遺伝子、及び編集されたCD312 (EMR2) 遺伝子、又は(xiii) 編集されたCD33 (Siglec - 3) 遺伝子、編集されたCLL - 1 遺伝子、編集されたCD123 遺伝子、編集されたCD327 (Siglec - 6) 遺伝子、及び/若しくは編集されたCD312 (EMR2) 遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、CD33 (Siglec - 3)、CLL - 1、CD123、CD327 (Siglec - 6)、及び/又はCD312 (EMR2) の修飾を有する細胞 (例えば、HSC又はHPC) は、本明細書に記載のヌクレアーゼ及び/又はgRNAを使用して作製される。いくつかの実施形態では、CD33 (Siglec - 3)、CLL - 1、CD123、CD327 (Siglec - 6)、及び/又はCD312 (EMR2) の修飾並びに第2の系統特異的細胞表面抗原の修飾を有する細胞 (例えば、HSC又はHPC) は、本明細書に記載のヌクレアーゼ及び/又はgRNAを使用して作製される。いくつかの実施形態では、細胞のゲノムにおける修飾は、CD33 (Siglec - 3)、CLL - 1、CD123、CD327 (Siglec - 6)、及び/又はCD312

30

40

50

(EMR2)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ヌクレアーゼ及び本明細書で提供されるCD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)標的部位を標的とするgRNAを使用する、又は本明細書で提供される標的化ドメイン配列を含む、ゲノム編集を介して、影響を受ける。細胞は、細胞自体をヌクレアーゼ及び/若しくはgRNAと接触させることによって作製され得るか、又は細胞は、ヌクレアーゼ及び/若しくはgRNAと接触させた細胞の娘細胞であり得ることが理解される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞(例えば、HSC)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、本明細書に記載の細胞(例えば、HSC)は、ヒト対象に生着すること、骨髄系細胞を産生すること、及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。

10

【0194】

本明細書に提供される組成物、方法、戦略、及び治療モダリティは、任意の細胞又は細胞型に適用され得る一方で、本開示の態様に従ったCD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)遺伝子中のゲノム修飾のために特に好適である、一部の例示的な細胞及び細胞型が、本明細書により詳細に記載されている。当業者は、しかし、そのような例の提供は、一部の特定の実施形態を例証する目的のためであり、追加の好適な細胞及び細胞型が、本開示に基づいて当業者に明らかであるが、それは、この点において限定されない。

【0195】

20

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞は、CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)のエクソンに変異を有するヒト細胞である。

【0196】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞は、CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)のイントロンに変異を有するヒト細胞である。

【0197】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞は、CD33のエクソン1、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、及び/又はエクソン7に変異を有するヒト細胞である。

30

【0198】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞は、CD312(EMR2)のエクソン1、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン10、エクソン11、エクソン12、エクソン13、エクソン14、エクソン15、エクソン16、エクソン17、エクソン18、エクソン19、エクソン20、及び/又はエクソン21に変異を有するヒト細胞である。

【0199】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞は、CLL-1及び/又はCD123のエクソン2に変異を有するヒト細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞は、CLL-1のエクソン4及び/又はCD123の5に変異を有するヒト細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞は、CD123のエクソン6に変異を有するヒト細胞である。

40

【0200】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞の集団は、造血幹細胞(HSC)、造血前駆細胞(HPC)、又は両方(HSPC)を含む。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

50

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、又は組織特異的幹細胞である。

【0201】

いくつかの実施形態では、細胞は、1つの遺伝子修飾のみを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）遺伝子座でのみ遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、細胞は、第2の遺伝子座で遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、細胞は、トランスジェニックタンパク質を含まず、例えば、CARを含まない。

10

【0202】

本開示のいくつかの態様は、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/若しくはCD312（EMR2）の発現、又はCD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/若しくはCD312（EMR2）を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/若しくはCD312（EMR2）のパリアント形態の発現の喪失をもたらすそれら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、本明細書に記載の修飾細胞は、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）タンパク質を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の修飾細胞は、野生型CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）タンパク質を実質的に含まないが、変異体CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、変異体CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）タンパク質は、治療目的のためにCD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）を標的とする薬剤によって結合されない。いくつかの実施形態では、それらのゲノムにおいて修飾を含む遺伝子操作された細胞は、例えば、同じ細胞型のものであるが、ゲノム修飾を含まない造血細胞（例えば、HSC）と比較して、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/若しくはCD312（EMR2）の低減された細胞表面発現、並びに/又はCD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/若しくはCD312（EMR2）を標的とする免疫療法剤による低減された結合をもたらす。

20

30

【0203】

いくつかの実施形態では、細胞は、造血細胞、例えば、造血幹細胞、造血前駆細胞（HPC）、造血幹又は前駆細胞である。造血幹細胞（HSC）は、多能性、自己再生性、並びに/又はそれぞれ、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）及びリンパ系細胞（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞）を更に生じさせる骨髄及びリンパ系前駆細胞の両方を含む、造血系の全ての系統を生成及び/若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の同定及び/又は単離に使用され得る、1つ以上の細胞表面マーカー、例えば、CD34（例えば、CD34+）の発現、並びに細胞系統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同定若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、又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パリアント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

40

50

全ての系統を生成及び/又は再構成することができる。

【0204】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞集団は、複数の造血幹細胞を含み、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞集団は、複数の造血前駆細胞を含み、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の細胞集団は、複数の造血幹細胞及び複数の造血前駆細胞を含む。

【0205】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される遺伝子操作された細胞は、2つ以上のゲノム修飾、例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)の発現、又はCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)のバリエーション形態の発現の喪失をもたらすゲノム修飾に加えて、1つ以上のゲノム修飾を含む。

【0206】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される遺伝子操作された細胞は、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)の発現、又はCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)のバリエーション形態の発現の喪失をもたらすゲノム修飾を含み、キメラ抗原受容体をコードする発現構築物を更に含み、例えば、細胞のゲノムに組み込まれたCARをコードする発現構築物の形態である、キメラ抗原受容体をコードする発現構築物を更に含む。いくつかの実施形態では、CARは、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)と結合する結合ドメイン、例えば、抗体断片を含む。

【0207】

本開示のいくつかの態様は、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)の発現、又はCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)を標的とする免疫療法剤によって認識されないCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)のバリエーション形態の発現の喪失をもたらすそれら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 (NKT)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、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)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、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)を標的とするCARを発現しない。

10

20

30

40

50

【0208】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される遺伝子操作された細胞は、実質的にCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) タンパク質を発現せず、例えば、免疫染色方法などの好適な方法によって測定され得るCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) タンパク質を発現しない。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される遺伝子操作された細胞は、野生型CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) タンパク質を実質的に発現しないが、変異体CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) タンパク質バリエーション、例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) を標的とする免疫療法剤、例えば、CAR-T細胞治療剤、又は抗CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2) 抗体、抗体断片、又は抗体-薬剤コンジュゲート (ADC) によって認識されないバリエーションを発現する。

10

【0209】

いくつかの実施形態では、HSCは、ヒト対象などの、対象から得られる。HSCを得る方法は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、PCT/US2016/057339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、マウス若しくはラット)、ウシ、ブタ、ウマ、又は家畜である。いくつかの実施形態では、HSCは、ヒト対象、例えば、造血悪性腫瘍を有するヒト対象などから得られる。いくつかの実施形態では、HSCは、健康なドナーから得られる。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その後投与される対象から得られる。細胞が得られた同じ対象に投与されるHSCは、自己細胞として言及されるのに対し、細胞が投与される対象ではない対象から得られたHSCは、同種細胞として言及される。

20

【0210】

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CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 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におけるCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 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%、又は少なくとも95%のコピーが、変異を有する。いくつかの実施形態では、遺伝子操作された細胞の集団におけるCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 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%、又は少なくとも95%のコピーが、本明細書に記載のゲノム編集アプローチにより、例えば、本明細書に提供されるgRNAを使用したCRISPR/Casシステムにより影響される変異を有する。一例として、集団は、複数の異なるCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 変異を含むことができ、複数の各変異は、変異を有する細胞集団におけるCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) のコピーの割合に寄与する。

30

40

【0211】

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CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312

50

(EMR2)の発現は、天然に存在する造血細胞(例えば、野生型対応物)上のCD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)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CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)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%、又は少なくとも99%のCD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)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、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、又は1%未満のCD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)を発現する。

10

【0212】

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)上の野生型CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)の発現レベルと比較して、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%、又は少なくとも99%の野生型CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)の発現レベルの低減をもたらす。すなわち、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、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、又は1%未満のCD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)を発現する。

20

30

【0213】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作は、好適な対照(例えば、細胞又は複数の細胞)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%、又は少なくとも99%の野生型系統特異的細胞表面抗原(例えば、CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2))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非操作細胞において測定又は予測される野生型系統特異的な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又は予測される野生型系統特異的な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、健康な個体(例えば、10、20、50、又は100の個体)のプールからの細胞の集団において測定又は予測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、本明細書に記載の治療、例えば、抗CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)療法を必要とする対象において測定又は予測される野生型系統特異的細胞表面抗原のレベルを含み、例

40

50

えば、対象は、がんを有し、がんの細胞は、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)を発現する。

【0214】

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、野生型造血幹又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、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)をコードする遺伝子の2つの機能コピーを含む(例えば、発現する)未編集細胞である。

【0215】

いくつかの実施形態では、方法において使用される細胞は、天然に存在する細胞又は非操作細胞である。

【0216】

いくつかの実施形態では、野生型細胞は、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)を発現するか、又はCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)を発現する細胞株に匹敵するレベル(又はその90%~110%、80%~120%、70%~130%、60~140%、若しくは50%~150%以内)でCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)を

10

20

【0217】

いくつかの実施形態では、野生型細胞は、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)(例えば、抗CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)抗体)と結合するか、又はCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/若しくはCD312 (EMR2)を発現する細胞株への抗体の結合に匹敵するレベル(又はその90%~110%、80%~120%、70%~130%、60~140%、若しくは50%~150%以内)でそのような抗体と結合する更に分化された細胞を生じる。抗体結合は、例えば、フローサイトメトリー又は免疫組織化学によって測定されてもよい。

30

【0218】

作製、治療、及び投与の方法

本開示は、とりわけ、マルチプレックス塩基編集及び遺伝子操作された細胞を生成するための組成物及び方法を提供する。

【0219】

マルチプレックスエンジニアリングは、複数の遺伝子標的が同じ製造プロセスにおいて同じ細胞内で操作される戦略及び方法である。マルチプレックスエンジニアリングは、2つ以上の別個の遺伝子の除去又は修飾を可能にし、したがって、2つ以上の別個の標的に指向された標的化療法を組み合わせ、又は順に使用することを可能にし得、これは、標的発現を下方制御する腫瘍細胞が関与するエスケープ機構を防止するのに特に有益であり得る。

40

【0220】

特に、本開示は、マルチプレックス塩基編集のための方法を提供し、これは、特定のDNA塩基を標的化ゲノム遺伝子座で別の塩基に変換することを含む。そのため、塩基編集は切断を必要とせず、転座エラーのリスクを低減する。本明細書に提供される方法は、例えば、単一の塩基編集ステップを使用して、造血幹細胞(HSC)並びに/又は造血幹細胞及び前駆細胞(HSPC)から、細胞表面標的などの複数のゲノム標的の発現を効率的にノックアウトするために使用され得る。

50

【 0 2 2 1 】

特に、本開示は、造血幹細胞（HSC）並びに/又は造血幹細胞及び前駆細胞（HSPC）を遺伝子修飾して、表面標的を除去し、次いで、これらの細胞を造血幹細胞移植（HSC-T）として患者に提供する、マルチプレックス塩基編集のための方法を提供する。これらの細胞が骨髄に生着すると、患者の健康な細胞は、例えば、表面標的をもはや発現せず、がん細胞のみを曝露したままにするため、標的化免疫療法の負のオンターゲットオフ腫瘍効果から保護され得る。したがって、いくつかの実施形態では、本開示は、とりわけ、健康な細胞を温存しながらがん細胞を選択的に破壊するための標的化療法のための組成物及び方法を提供する。結果として、本明細書に記載される操作された細胞は、これらの標的化療法に関連するオンターゲット毒性を制限し、それによって、それらの有用性を強化し、それらの適用性を広げるように設計され得る。ある特定の実施形態では、遺伝子操作された細胞は、細胞表面タンパク質を標的とするように設計されたキメラ抗原受容体（「CAR」）-T療法、二重特異性抗体、及び抗体-薬剤コンジュゲートなどの標的化治療剤と組み合わせて投与され得る。

10

【 0 2 2 2 】

理論によって拘束されることを望むものではないが、マルチプレックスアプローチは、少なくとも2つの領域において利点を提供し得る。第一に、がんの状況において、標的発現は、腫瘍不均一性として知られる現象である、同じ患者からの腫瘍細胞において変化し得る。多重特異性CAR-Tなどの療法を適用することは、その懸念を低減し得る。第二に、腫瘍エスケープとして知られる現象である、死滅を回避するために腫瘍細胞が標的の発現を下方制御することが理論的に可能である。再び、複数の標的を同時に追跡することは、腫瘍エスケープ機構の有効性を低減し得る。

20

【 0 2 2 3 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される有効な数のCD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）修飾細胞は、抗CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）療法、例えば、抗CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）がん療法と組み合わせて対象に投与される。

【 0 2 2 4 】

いくつかの実施形態では、修飾されたCD33及び修飾された第2の系統特異的細胞表面抗原を含む有効な数の細胞は、抗CD33療法、例えば、抗CD33がん療法と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、抗CD33療法は、抗体、二重特異性T細胞エンゲージャー、ADC、又はCARを発現する免疫細胞を含む。

30

【 0 2 2 5 】

いくつかの実施形態では、修飾されたCLL-1及び修飾された第2の系統特異的細胞表面抗原を含む有効な数の細胞は、抗CLL-1療法、例えば、抗CLL-1がん療法と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、抗CLL-1療法は、抗体、二重特異性T細胞エンゲージャー、ADC、又はCARを発現する免疫細胞を含む。

【 0 2 2 6 】

いくつかの実施形態では、修飾されたCD123及び修飾された第2の系統特異的細胞表面抗原を含む有効な数の細胞は、抗CD123療法、例えば、抗CD123がん療法と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、抗CD123療法は、抗体、二重特異性T細胞エンゲージャー、ADC、又はCARを発現する免疫細胞を含む。

40

【 0 2 2 7 】

いくつかの実施形態では、修飾されたCD327（Siglec-6）及び修飾された第2の系統特異的細胞表面抗原を含む有効な数の細胞は、抗CD327（Siglec-6）療法、例えば、抗CD327（Siglec-6）がん療法と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、抗CD327（Siglec-6）療法は、抗体、二重特異性T細胞エンゲージャー、ADC、又はCARを発現する免疫細胞を含む。

50

【0228】

いくつかの実施形態では、修飾されたCD312 (EMR2) 及び修飾された第2の系統特異的細胞表面抗原を含む有効な数の細胞は、抗CD312 (EMR2) 療法、例えば、抗CD312 (EMR2) がん療法と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、抗CD312 (EMR2) 療法は、抗体、二重特異性T細胞エンゲージャー、ADC、又はCARを発現する免疫細胞を含む。

【0229】

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、本明細書に提供される、遺伝子操作された細胞の数は、 $10^6 \sim 10^{11}$ の範囲内である。しかし、この例示的な範囲を下回る又は上回る量も、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に提供される遺伝子操作された細胞、例えば、HSC、HPC、又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} 、又は約 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、本明細書に提供される、遺伝子操作された細胞の数は、 $10^6 \sim 10^9$ の範囲内、 $10^6 \sim 10^8$ の範囲内、 $10^7 \sim 10^9$ の範囲内、約 $10^7 \sim 10^{10}$ の範囲内、 $10^8 \sim 10^{10}$ の範囲内、又は $10^9 \sim 10^{11}$ の範囲内である。

【0230】

薬剤 (例えば、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 修飾細胞、並びに抗CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 療法) が組み合わされて投与される場合、薬剤は同時に、又は時間的に近接して異なる時点で投与され得ることが理解される。更に、治療は、混合されてもよいか、又は別個の体積であってもよい。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CD33療法を用いた治療過程における投与を含み、対象は、有効な数のCD33修飾細胞を、抗CD33療法と同時に、又は連続的に、例えば、治療の前、間、若しくは後に投与され得る。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CLL-1療法を用いた治療過程における投与を含み、対象は、有効な数のCLL-1修飾細胞を、抗CLL-1療法と同時に、又は連続的に、例えば、治療の前、間、若しくは後に投与され得る。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CD123療法を用いた治療過程における投与を含み、対象は、有効な数のCD123修飾細胞を、抗CD123療法と同時に、又は連続的に、例えば、治療の前、間、若しくは後に投与され得る。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CD327 (Siglec-6) 療法を用いた治療過程における投与を含み、対象は、有効な数のCD327 (Siglec-6) 修飾細胞を、抗CD327 (Siglec-6) 療法と同時に、又は連続的に、例えば、治療の前、間、若しくは後に投与され得る。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CD312 (EMR2) 療法を用いた治療過程における投与を含み、対象は、有効な数のCD312 (EMR2) 修飾細胞を、抗CD312 (EMR2) 療法と同時に、又は連続的に、例えば、治療の前、間、若しくは後に投与され得る。

【0231】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるCD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) を標的とする薬剤は、キメラ受容体を発現する免疫細胞であり、それは、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) に結合することができる抗原結合断片 (例えば、一本鎖抗体) を含む。免疫細胞は、例えば、T細胞 (例えば、CD4+若しくはCD8+T細胞) 又はNK細胞であり得る。

【0232】

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

10

20

30

40

50

、及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。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、少なくとも1つの共刺激分子、例えば4-1BB（すなわち、CD137）、CD27、及び/又はCD28、又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、CD33（Siglec-3）、CLL-1、CD123、CD327（Siglec-6）、及び/又はCD312（EMR2）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（又はその一部）、定常領域（又はその一部）、又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。

【0233】

10

例示的なCD33 CAR構築物は、例えば、PCT公開第WO2019/178382号に見出され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0234】

例示的なCLL-1 CAR構築物は、例えば、PCT出願第PCT/CN2014/082602号、及び参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国公開第2016/0051651（A1）号に見出される。

【0235】

抗ヒトCLL-1抗体の例示的な重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列及び核酸配列は、以下に提供される。CDR配列は、アミノ酸配列において太字で示されている。

20

抗CLL-1重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号3032）

【化6】

DIQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSAYYWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGRN
NYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTEDTATYYCAKEGDYDVGNYAMDYWGQ
GTSVTVSS

抗CLL-1軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号3033）

【化7】

ENVLTQSPAIMASAPGKVTMTCRASSNVISSYVHWYQQRSGASPKLWIYSTSNLASGV
PARFSGSGSGTSSYSLTISSVEAEDAATYYCQQYSGYPLTFGAGTKLEL

30

【0236】

追加の抗CLL-1配列は、例えば、米国特許第8,536,310号に見出され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0237】

本明細書に記載されるCLL-1を標的とする薬剤の構築において使用するための抗CLL-1抗体結合断片は、配列番号3032及び配列番号3033のものと同じ重鎖及び/又は軽鎖CDR領域を含み得る。このような抗体は、フレームワーク領域のうちの1つ以上におけるアミノ酸残基変動を含んでもよい。いくつかの例では、抗CLL-1抗体断片は、配列番号3032と少なくとも70%の配列同一性（例えば、75%、80%、85%、90%、95%、又はそれ以上）を共有する重鎖可変領域を含んでもよく、かつ/又は配列番号3033と少なくとも70%の配列同一性（例えば、75%、80%、85%、90%、95%、又はそれ以上）を共有する軽鎖可変領域を含んでもよい。

40

【0238】

抗ヒトCD123抗体の例示的な重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列及び核酸配列は、以下に提供される。CDR配列は、アミノ酸配列において太字で示されている。

抗CD123重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号2032）

50

【化 8】

MADYKDIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQNVDSAVAWYQQKPGQSPKALIYSAS
YRYSQVDPDRFTGRGSGTD FTLTISSVQAEDLAVYYCQQYYSTPWTFGGGTKLEIKR

抗 C D 1 2 3 軽鎖可変領域のアミノ酸配列 (配列番号 2 0 3 3)

【化 9】

EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGKALEWLALIRSKADG
YTTEYSASVKGRFTLSRDDSQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDAAAYSSYYSPEGAMD
YWGQGTSVTVSS

10

【 0 2 3 9】

追加の C D 1 2 3 配列は、例えば、P C T 公開第 W O 2 0 1 5 / 1 4 0 2 6 8 (A 1) 号に見出され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 2 4 0】

本明細書に記載される C D 1 2 3 を標的とする薬剤の構築において使用するための抗 C D 1 2 3 抗体結合断片は、配列番号 2 0 3 2 及び配列番号 2 0 3 3 のものと同じ重鎖及び / 又は軽鎖 C D R 領域を含み得る。このような抗体は、フレームワーク領域のうちの 1 つ以上におけるアミノ酸残基変動を含んでもよい。いくつかの例では、抗 C D 1 2 3 抗体断片は、配列番号 2 0 3 2 と少なくとも 7 0 % の配列同一性 (例えば、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又はそれ以上) を共有する重鎖可変領域を含んでもよく、かつ / 又は配列番号 2 0 3 3 と少なくとも 7 0 % の配列同一性 (例えば、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又はそれ以上) を共有する軽鎖可変領域を含んでもよい。

20

【 0 2 4 1】

例示的なキメラ受容体構成要素配列を以下の表 3 に提供する。

30

40

50

【表 3 - 2】

表3: キメラ受容体の例示的な構成要素

キメラ受容体構成要素	アミノ酸配列
抗原結合断片	軽鎖 - GSTSSGSGKPGSGEGSTKG (配列番号 34)- 重鎖
4-1BB 共刺激ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCE (配列番号: 295)
CD28 共刺激ドメイン	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVA FIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYPYAPPRDFAAYRS (配列番号: 35)
ICOS共刺激ドメイン(太字)、 ICOS膜貫通ドメイン(斜体)、 及びICOSの細胞外ドメインの一部(下線)	<u>LSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLK</u> <i>WLPIGCAAFVVVCILGCILICWLT</i> KKKYSSS VHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL (配列番号: 36)
ICOS 共刺激ドメイン	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTA KKSRLTDVTL (配列番号: 37)
ヒンジドメイン(斜体)及びCD28からの 膜貫通ドメイン(太字)を含むCD28/ICOSキメラ (下線で示されるICOS部分)	<i>IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP</i> <i>FPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVA</i> FIIFWVRSKRSRLLHSDYMFMRVNTAKK <u>SRLTDVTL</u> (配列番号: 38)
CD8 α 膜貫通ドメイン(斜体)及び CD8 α の細胞外ドメインの一部(下線)	<u>TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA</u> <u>GGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLS</u> <u>LVITLYC</u> (配列番号: 296)
CD3 ζ 細胞質シグナル伝達ドメイン	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (配列番号: 39)

10

20

30

40

【0242】

いくつかの実施形態では、CARは、4-1BB共刺激ドメイン(例えば、表3に示される)、CD8膜貫通ドメイン及びCD8の細胞外ドメインの一部(例えば、表3に示される)、並びにCD3細胞質シグナル伝達ドメイン(例えば、表3に示される)を含む。

【0243】

哺乳動物(例えば、ヒト)に投与される細胞、例えば、免疫細胞又は造血細胞の典型的な数は、例えば、100万~1,000億個の細胞の範囲内であってもよいが、この例示的な範囲を下回る、又は上回る量も、本開示の範囲内である。

【0244】

50

いくつかの実施形態では、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2)を標的とする薬剤は、抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)である。ADCは、毒素又は薬物分子にコンジュゲートされた抗体又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又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)への毒素又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。

【0245】

CLL-1に結合する好適な抗体及び抗体断片は、当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、抗体-薬剤コンジュゲートの抗原結合断片は、配列番号3032によって提供される重鎖可変領域と同じ重鎖CDR、及び配列番号3033によって提供される軽鎖可変領域と同じ軽鎖CDRを有する。いくつかの実施形態では、抗体-薬剤コンジュゲートの抗原結合断片は、配列番号3032によって提供される重鎖可変領域、及び配列番号3033によって提供される同じ軽鎖可変領域を有する。

10

【0246】

CD123に結合する好適な抗体及び抗体断片は、当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、抗体-薬剤コンジュゲートの抗原結合断片は、配列番号2032によって提供される重鎖可変領域と同じ重鎖CDR、及び配列番号2033によって提供される軽鎖可変領域と同じ軽鎖CDRを有する。いくつかの実施形態では、抗体-薬剤コンジュゲートの抗原結合断片は、配列番号2032によって提供される重鎖可変領域、及び配列番号2033によって提供される同じ軽鎖可変領域を有する。

20

【0247】

抗体-薬物コンジュゲートでの使用に適合する毒素又は薬物は、当該技術分野で既知であり、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。

【0248】

いくつかの実施形態では、抗体-薬物コンジュゲートは、抗体及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)を更に含む得る。

30

【0249】

抗体-薬物コンジュゲートの例としては、限定されないが、ブレンツキシマブベドチン、グレンバツマブベドチン/CDX-011、デパツキズマブマフォドチン/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、エンフォルツマブベドチン/ASG-22ME、AG-15ME、AGS67E、テリソツズマブベドチン/ABBV-399、ABBV-221、ABBV-085、GSK-2857916、ティソツマブベドチン/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フタンシン/IMGN853、コルツキシマブラヴタンシン/SAR3419、ナラツキシマブエムタンシン/IMGN529、インダツキシマブラヴタンシン/BT-062、アネツマブラヴタンシン/BAY94-9343、SAR408701、SAR428926、AMG224、PCA06

40

50

2、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、カンツズマブラヴタンシン/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、BIIB015、MLN2704、AMG172、AMG595、LOP628、パダツキシマブタリリン/SGN-CD123A、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、サシツズマブゴビテカン/IMMU-132、ラベツズマブゴビテカン/IMMU-130、DS-8201a、U3-1402、ミラツズマブドキシソルピシン/IMMU-110/hLL1-DOX、BMS-986148、RC48-ADC/ヘルツズマブ-vc-MMAE、PF-06647020、PF-06650808、PF-06664178/RN927C、ルパルツマブアマドチン/BAY1129980、アブルツマブイクサドチン/BAY1187982、ARX788、AGS62P1、XMT-1522、AbGn-107、MEDI4276、DSTA4637S/RG7861が挙げられる。一例では、抗体-薬剤コンジュゲートは、ゲムツズマブオゾガマイシンである。

10

20

【0250】

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によって、抗体-薬物コンジュゲートの内部移行が誘導されて、薬物(又は毒素)が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によって、毒素又は薬物の内部移行が誘導されて、それによって、毒素又は薬物は、系統特異的タンパク質(標的細胞)を発現する細胞を殺傷することが可能になる。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との抗体-薬物コンジュゲートの結合は、毒素又は薬剤の内部化を誘発し、それによって、毒素又は薬剤は、系統特異的タンパク質(標的細胞)を発現する細胞の活性が調節され得る。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又は薬物の種類は、いかなる特定の種類にも限定されない。

30

40

50

【0251】

CD33(Siglec-3)CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/又はCD312(EMR2)関連疾患及び/又は障害

本開示は、とりわけ、CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/若しくはCD312(EMR2)を発現する細胞に関連する疾患、又はCD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/若しくはCD312(EMR2)を発現する細胞に関連する状態を治療するための組成物及び方法を提供する。いくつかの実施形態では、CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/若しくはCD312(EMR2)の発現に関連する疾患、又はCD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/若しくはCD312(EMR2)を発現する細胞に関連する状態は、例えば、がん若しくは悪性腫瘍(例えば、造血悪性腫瘍)などの増殖性疾患、又は骨髄異形成症候群若しくは前白血病などの前がん状態を含む。いくつかの実施形態では、CD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/若しくはCD312(EMR2)の発現に関連する疾患、又はCD33(Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327(Siglec-6)、及び/若しくはCD312(EMR2)を発現する細胞に関連する状態は、例えば、骨髄増殖性腫瘍(MPN)を含む。いくつかの実施形態では、本開示は、とりわけ、コンディショニング標的として、若しくはコンデ

イシヨニング標的と組み合わせて使用するための、又は例えば、発現プロファイルに基づいて、様々な免疫障害の治療のための組成物及び方法を提供する。

【0252】

いくつかの実施形態では、造血悪性腫瘍又は血液疾患は、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) 発現と関連する。造血器悪性腫瘍は、造血細胞 (例えば、前駆細胞及び幹細胞を含む、血液細胞) が関与する悪性異常として説明されている。造血器悪性腫瘍の例としては、限定されないが、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、白血病、又は多発性骨髄腫が挙げられる。例示的な白血病としては、限定されないが、急性骨髄性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病又は慢性リンパ芽球性白血病、及び慢性リンパ球性白血病が挙げられる。

10

【0253】

いくつかの実施形態では、造血悪性腫瘍に関与する細胞は、悪性腫瘍を治療するために使用される従来の又は標準的な治療薬に対して耐性である。例えば、細胞 (例えば、がん細胞) は、悪性腫瘍を治療するために使用される化学療法剤及び/又はCAR T細胞に耐性であり得る。

【0254】

いくつかの実施形態では、白血病は、急性骨髄性白血病 (AML) である。AMLは、重要な分化経路及び増殖制御経路を破壊する重大な遺伝子変化を徐々に獲得した形質転換細胞を起源とする不均一でクローン性の腫瘍性疾患を特徴とする。(Dohner et al., NEJM, (2015) 373:1136)。理論によって拘束されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) が骨髄性白血病細胞並びに正常な骨髄前駆体及び単球前駆体上で発現されており、AML療法の有望な標的となると考えられている。

20

【0255】

いくつかの事例では、対象は、最初に療法に応答し (例えば、造血悪性腫瘍に対して)、その後再発を経験し得る。本明細書に記載される方法又は遺伝子操作された造血細胞の集団のいずれかを使用して、造血悪性腫瘍の再発を低減又は防止してもよい。あるいは、又は加えて、本明細書に記載の方法のいずれかは、本明細書に記載の遺伝子操作された造血細胞の集団、及び造血悪性腫瘍に関連する細胞を標的とする免疫療法剤 (例えば、細胞傷害剤) のいずれかを投与することと、造血悪性腫瘍が再発したときに1つ以上の追加の免疫療法剤を更に投与することとを含み得る。いくつかの実施形態では、対象は、1つ以上の以前の療法の投与後に造血悪性腫瘍 (例えば、AML) の再発を有するか、又は再発しやすい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象の再発のリスク又は再発の重症度を低減する。

30

【0256】

いくつかの実施形態では、CD33 (Siglec-3)、CLL-1、CD123、CD327 (Siglec-6)、及び/又はCD312 (EMR2) と関連する造血器悪性腫瘍又は血液障害は、骨髄異形成、骨髄異形成症候群、又は前白血病などの前がん状態である。骨髄異形成症候群 (MDS) は、無秩序で無効な造血又は血液産生を特徴とする血液学的状態である。したがって、血液形成細胞の数と質が不可逆的に低下している。MDS患者の一部は重度の貧血を発症し、他の患者は無症候性である。MDSの分類スキームは当該技術分野で既知であり、例えば、骨髄芽球、単球及び赤血球の前駆体など、特定の血液細胞型の比率又は頻度を指定する基準がある。MDSには、難治性の貧血、環状鉄芽球を伴う難治性貧血、過剰な芽球を伴う難治性貧血、形質転換した過剰な芽球を伴う難治性貧血、慢性骨髄単球性白血病 (CML) が含まれる。いくつかの実施形態では、MDSは、急性骨髄性白血病 (AML) に進行する可能性がある。

40

【実施例】

【0257】

50

実施例 1 : 塩基エディターを使用した C D 3 3 / C L L - 1 マルチプレックス編集の評価
 C D 3 3 及び C L L - 1 の効率的なシングルプレックス及びマルチプレックス編集のために、塩基エディターを評価し、RNA の組み合わせを誘導するために、塩基編集戦略を考案した。図 1 A ~ 1 C を参照されたい。シトシン塩基エディター (C B E) 及びアデニン塩基エディター (A B E) の両方を、C D 3 3 又は C L L - 1 のいずれかを標的とするガイド RNA と一緒に試験した。図 2 A ~ 2 C 及び 3 A ~ 3 E を参照されたい。塩基エディターガイドの設計及び優先順位付けは、図 2 A ~ 2 C 及び 3 A ~ 3 E に概説されており、様々な塩基エディター (B E) とともに使用するために設計された様々なガイドが、その中に記載されており、これは、未成熟終止コドン又はスプライス部位破壊の導入を介して塩基エディターを使用して遺伝子ノックアウト (K O) を達成するために使用され得る。図 2 B 並びに表 1、2、及び 6 ~ 8 に記載されるガイドと、図 3 に開示される B E の異なる組み合わせをより詳細に評価した。

10

【 0 2 5 8 】

ガイド RNA を、標的細胞、例えば、固定化されたヒト C D 3 4 + 造血細胞に、それぞれの塩基エディターをコードする m R N A と一緒にエレクトロポレーションした。m R N A をコードすることを、例えば、5 - メトキシウリジン修飾又は N 1 - メチルシュードウリジン修飾を使用して、コードされた塩基エディターの発現を改善するように化学的に修飾した (図 3 B)。C D 3 4 + 細胞は、2 人の異なるドナーから取得され、ガイド RNA 及び B E コード m R N A は、細胞内にエレクトロポレーションされ、細胞をエレクトロポレーション後の異なる時点で、例えば、4 8 時間及び 1 2 0 時間で分析した。分析には、細胞生存率、細胞計数、及び標的タンパク質発現 (例えば、C D 3 3、及び C L L - 1) が含まれた。ゲノム DNA (g D N A) は、例えば、DNA シーケンシングを介して、編集された細胞集団から取得され、ゲノム編集を分析した。

20

【 0 2 5 9 】

図 3 D は、R 3 3 A 置換を含む C B E と組み合わせたガイド 7、8、及び 1 7 を使用する H S P C における高いオンターゲット C D 3 3 塩基編集を示す。観察された編集効率は、N 1 - メチルシュードウリジン修飾 m R N A が、5 - メトキシウリジン修飾 m R N A の送達と比較して細胞に投与された場合により高く、6 マイクログラムの m R N A と比較して 9 マイクログラムの m R N A の送達も、編集効率の改善をもたらした。編集効率は経時的に改善することが観察され、観察された編集効率は、エレクトロポレーション後 4 8 時間と比較して、1 2 0 時間でより高かった。配列分析は、意図しない C から G への変換を含んだ細胞のサブセットを明らかにした。

30

【 0 2 6 0 】

図 3 E は、R 3 3 A 置換を含む C B E と組み合わせたガイド 3、4、及び 1 を使用する H S P C における高いオンターゲット C L L - 1 塩基編集を示す。観察された編集効率は、N 1 - メチルシュードウリジン修飾 m R N A が、5 - メトキシウリジン修飾 m R N A の送達と比較して細胞に投与された場合により高く、6 マイクログラムの m R N A と比較して 9 マイクログラムの m R N A の送達も、編集効率の改善をもたらした。編集効率は経時的に改善することが観察され、観察された編集効率は、エレクトロポレーション後 4 8 時間と比較して、1 2 0 時間でより高かった。配列分析は、意図しない C から G への変換を含んだ細胞のサブセットを明らかにした。

40

【 0 2 6 1 】

異なる C B E、例えば、「W T」及び「R 3 3 A」バリエーションを、改善された塩基編集効率及び意図しない塩基変換の欠如について評価した。更に、A B E 編集戦略も評価した。図 4 は、評価された様々な組み合わせを開示する。図 4 A は、実験設計を示す。図 4 B は、試験された特定の B E 及びガイドの組み合わせを示す。図 4 C は、異なるガイド RNA を使用した C D 3 3 E 1 スプライス部位のシトシン / アデニン塩基編集が、C D 3 3 発現を効率的に破壊することを示す。挿入は、ガイド RNA 1 7 の結果を示す。E P : エレクトロポレーション。理論によって拘束されることを望むものではないが、本明細書に開示される編集の一部は、例えば、C D 3 3 E 1 スプライスドナー部位が、ガイド s g 1 7

50

と組み合わせで C B E / A B E によって破壊されたときに、ナンセンス媒介減衰機構を介して効率的な C D 3 3 ノックアウトをもたらすことが企図される。図 4 D を参照されたい。図 4 E は、様々なガイド R N A を使用した C L L - 1 のシトシン塩基編集が、タンパク質発現を効率的に破壊することを示す。挿入は、ガイド R N A 3 の結果を示す。

【 0 2 6 2 】

異なるガイドと組み合わせた異なる C B E の標的タンパク質 (C D 3 3 又は C L L - 1) ノックアウトを示す細胞の割合として測定される塩基編集効率を、図 4 F に要約する。これらのデータは、例示的な C D 3 3 B E 及びガイドの組み合わせが、H P S C 又は 6 0 % 超において C D 3 3 タンパク質喪失を達成することができ、例示的な C L L - 1 B E 及びガイドの組み合わせが、H P S C において 6 0 % 超の C L L - 1 タンパク質喪失を達成することができることを示す。

10

【 0 2 6 3 】

様々な B E 及びガイド R N A の組み合わせの遺伝子編集効率の異なる特徴付けを行った。結果の概要については図 5 を参照されたい。

【 0 2 6 4 】

実施例 2 : C D 3 3 及び C L L - 1 のマルチプレックス塩基編集

C D 3 3 及び C L L - 1 のマルチプレックス編集を、C L L - 1 ガイド R N A s g 3 と組み合わせ、異なる C D 3 3 ガイド R N A (s g 7、s g 8、又は s g 1 7) を使用して行った。図 6 A は、実験設計を示す。図 6 B は、上位 C L L - 1 ガイドと組み合わせた 3 つの上位 C B E C D 3 3 ガイドを使用した用量滴定マルチプレックス塩基編集を含んだ、この研究の群を示す。図 6 C は、固定化されたヒト C D 3 4 + H P S C における C D 3 3 及び C L L - 1 の両方の効率的なノックアウトを示す。C D 3 3 発現は、編集された H P S C 細胞集団において細胞の 1 0 % 未満に存在し、C L L - 1 発現は、編集された H P S C 細胞集団において細胞の 2 0 % 未満に存在した。図 6 D は、様々なガイドの組み合わせを使用した編集された細胞集団の F A C S データを示す。図 6 E は、実験で使われるガイドの異なる比についての H P S C における C D 3 3 及び C L L - 1 タンパク質 K O データを示す。C D 3 3 g 8 及び C L L - 1 g 3 の F A C S データを右側に示す。C D 3 3 s g 8 の例示的なオフターゲット分析を左下に示し、望ましいオフターゲットプロファイルが示される。F A C S 分析は、マルチプレックス編集細胞の約 8 0 % が C D 3 3 及び C L L - 1 表面タンパク質発現を欠くことを示した (図 6 F)。マルチプレックス編集細胞 (C D 3 3 K O / C L L - 1 K O) をコロニー形成アッセイに供し、データを図 7 に示し、塩基編集細胞がコロニー形成及び分化の可能性に影響を与えなかったことを示す。

20

30

40

50

【表 2 0】

ガイドRNAs	配列
CD33_CBEsg7	5'acaGGCCCAGGACACAGAGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCuuuU3'
CD33_ABEsg17	5'cacUCACCUGCCCACAGCAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCuuuU3'
CD33_CBEsg8	5'gacAACCAGGAGAAGAUCGGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCuuU3'
CLL-1_CBEsg3	5'caaAUCCAUCUCCUUGGACAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCuuuU3'

10

20

【0265】

実施例 3：複合化 - 同時送達シトシン塩基エディター及び A s C p f 1

図 8 A に示されるように、複合化は、シトシン塩基エディター (C B E) 及び C p f 1 ヌクレアーゼの同時送達を使用して、単一送達を可能にし、塩基エディターが二本鎖切断をしないため、転座リスクがない。これらのデータは、塩基エディターと C p f 1 が一緒に送達されたとき、両方の遺伝子座で > 50 % の編集を示す。

【0266】

図 8 B に示されるように、C D 3 4 細胞において同時に C B E 及び A s C p f 1 を送達する場合、生存率及び細胞増殖は影響を受けない。

30

【0267】

実施例 4：例示的な C D 3 3 及び C L L - 1 シトシン塩基エディター (C B E) ガイドを使用した、H S C における同時マルチプレックス塩基編集エンジニアリングプロトコル

C D 3 3 及び C L L - 1 のマルチプレックス編集を、C L L - 1 ガイドRNA s g 3 と組み合わせて、異なる C D 3 3 ガイドRNA (s g 7、s g 8、又は s g 1 7) を使用して行った。図 9 A は、実験設計を示す。インシリコガイド設計後、1 日目に、培養のために m C D 3 4 + 細胞を解凍した。48 時間後、C D 3 3 及び C L L - 1 ガイドを、スクリーニングのために m C D 3 4 + 細胞に導入した。24 時間後、細胞計数及び細胞生存率を評価した。48 時間後、細胞計数及び細胞生存率を再び評価し、細胞を採取した。g D N A を精製し、N G S を介して編集読み出しを得た。更に、骨髄インビトロ分化を設定し、6 日後、細胞を、タンパク質ノックアウト (K O) 読み取りについてフローサイトメトリーによって評価した。図 9 B は、骨髄インビトロ分化後 6 日目のデータを示す。C D 3 3 g 8 及び C L L - 1 g 3 との塩基エディター (B E) の組み合わせは、80 % の二重表面タンパク質 K O を示した。図 9 C は、R h a m p S e q アッセイによって決定された場合、バランスの取れた転座がマルチプレックス塩基編集試料で検出されなかったことを示す。これらのデータは、同時マルチプレックス塩基編集で達成可能な実現可能性及び成功を示す。特に、この実験は、約 80 % の C D 3 3 / C L L - 1 二重 K O 細胞及び 0 % の転座を達成し、すなわち、R h a m p S e q アッセイは、いかなる転座も検出することができなかった。特に、細胞生存率又は細胞増殖への影響はなかった。

40

【0268】

50

実施例 5 : ヒト造血幹細胞及び前駆細胞 (H S P C) におけるマルチプレックス塩基編集は、急性骨髄性白血病 (A M L) 免疫療法における複数の表面抗原の効率的な除去を可能にする

健康なドナー由来の C D 3 4 + 造血幹細胞及び前駆細胞 (H S P C) のマルチプレックス塩基編集を、異なる C D 3 3 及び C L L - 1 ガイド R N A を使用して行った。図 1 0 は、実験設計を示す。C D 3 3 及び C L L - 1 の C B E 4 塩基編集ガイドスクリーンを行い、C D 3 4 + H S P C において高い効率の編集を生成した。図 1 1 A は、C D 3 3 遺伝子座上の C a s 9 誘導インデル頻度と比較して、3 つの異なる C B E 4 m R N A コード構築物を使用して単一のガイド (s g 7、s g 8、又は s g 1 7) を誘導する 3 つの C B E 10 遺伝子ノックアウト (K O) のオンターゲット塩基編集効率を示す。図 1 1 B は、C L L - 1 遺伝子座上の C a s 9 誘導インデル頻度と比較して、3 つの異なる C B E 4 m R N A コード構築物を使用して単一のガイド (s g 3、s g 4) を誘導する 2 つの C B E 遺伝子ノックアウト (K O) のオンターゲット塩基編集効率を示す。図 1 2 は、C D 3 3 及び C L L - 1 の効率的な塩基編集が、C D 3 3 及び C L L - 1 タンパク質表面発現を無効にすることを示す。図 1 3 A 及び 1 3 B は、C D 3 3 及び C L L - 1 遺伝子座のマルチプレックス塩基編集が、効率的なオンターゲット編集並びに C D 3 3 及び C L L - 1 タンパク質表面発現ノックアウトを示すことを示す。図 1 3 B の右パネルは、編集された C D 3 3 + C L L - 1 (すなわち、C D 3 3 - C L L - 1 - 細胞) について 8 0 % の真の二重 K O 集団を示した。図 1 4 は、二重編集 C D 3 4 + H S P C の多系統の可能性が、マルチプレックス塩基編集後に維持されたことを示す。図 1 5 A 及び 1 5 B は、骨髄インビトロ分化 20 が、単球における編集持続性、並びに C D 3 3 及び C L L - 1 マルチプレックス編集細胞のタンパク質 K O 発現を示したことを示す。図 1 6 A 及び 1 6 B は、C D 3 3 + C L L - 1 マルチプレックス塩基編集試料において転座が検出されなかったことを示す。

【 0 2 6 9 】

これらのデータは、同時マルチプレックス塩基編集で達成可能な実現可能性及び成功を示す。特に、これらのデータは、塩基編集ガイドの同時送達、H S P C の健康、増殖、及び幹細胞性を保持することができ、これは、A M L の治療のためなど、治療用途のための細胞のプロセス及び製造を容易にし得ることを示す。更に、このマルチプレックス塩基編集実験は、高い塩基編集効率、堅牢な表面タンパク質 K O を達成し、マルチプレックス塩基編集細胞のバランスの取れた転座の検出は達成されなかった。したがって、これらの 30 データは、1 つ、2 つ、又は複数の表面標的の C D 3 4 + H S P C におけるマルチプレックス塩基編集が、A M L 患者を治療するための次世代移植を操作するための有益、安全、及び有効な代替物を提供することを示す。

【 0 2 7 0 】

実施例 6 : アデニン塩基エディター (A B E) を使用した C D 3 3 / C D 1 2 3 マルチプレックス編集の評価

1 人の健康なドナーからの C D 3 4 + 造血幹細胞及び前駆細胞 (H S P C) を解凍し、維持培地 (S F E M + F l t 3、S C F、T P O) 中で培養した。解凍の 2 日後、C B E 又は A B E 編集を行った。各条件について、 8×10^5 個の細胞を、 $9 \mu\text{g}$ の C B E 又は A B E m R N A 及び $4.7 \mu\text{M}$ のガイド R N A でエレクトロポレーションした。N 1 - メチルシュードウリジン修飾 A B E 8 . 2 0 m m R N A を使用した。追加の対照条件が含まれた。ガイド対照試料は、A B E 酵素を有する非標的化ガイド R N A を受け、エレクトロポレーションを受けた。モックエレクトロポレーション試料は、いかなる酵素もガイド R N A も受けなかったが、エレクトロポレーションを受けた。次いで、全ての条件を、エレクトロポレーション後 5 日間、維持培地 (S F E M + F l t 3、S C F、T P O) 中で培養した。g D N A 用の細胞をエレクトロポレーション後 5 日で採取し、次世代シーケンシング (N G S) を実施して、C B E 及び A B E ガイドの D N A 編集を測定した。フローサイトメトリーは、ガイド編集試料及び対照試料における C D 3 3 の表面タンパク質発現を測定するために、エレクトロポレーション後 5 日で実施した。図 1 7 A は、アデニン塩基エディター (A B E) と、C D 3 3 及び C D 1 2 3 (例えば、それぞれ C D 3 3 g 1 7 40 50

及びCD123g18)を標的とするgRNAとの複合化同時送達が、CD123において約90%のオンターゲット編集効率を可能にすることを示す。ABEを使用したこの実験では、検出可能なバスタンダー編集はなく、グラフ化された全ての標的に対して、オンターゲットプライス部位の破壊のみが意図された(図17A)。本明細書で使用される場合、「バスタンダー編集」は、ABEの標的化された「A」以外のヌクレオチドで編集ウィンドウ(すなわち、ガイドプロトスペーサー)内で発生する編集を指す。

【0271】

図17Bは、CD123g18を用いたアデニン塩基編集のオフターゲットプロファイルを示す。CD123g18オフターゲットプロファイルは、ヒトゲノム中の全ての部位に対するインシリコ予測相同性を使用して、潜在的な標的化部位を概説する。このオフターゲット予測パイプラインは、ガイド配列のミスマッチ及びギャップを考慮し、次いで、相対的なオフターゲットスコア(例えば、スコアが低いほど、潜在的な活性は低い)を与える。これらの部位はマッピングされ、表の「遺伝子座」列に記録される。5つの列挙された部位のうち、1つ目はオンターゲット部位(スコア100)であり、次に続く4つは非常に低い(スコア1)ため、CD123g18に対してより好ましいオフターゲット予測を示す。

10

【0272】

図17Cは、異なるCD33及びCD123ガイドRNAをアデニン塩基エディター(ABE)と組み合わせて使用して実施されたCD33及びCD123のマルチプレックス編集のための実験設計を示す概略図を示す。

20

【0273】

図18A~18Cは、シトシン塩基エディター(CBE)スクリーニングの取り組みからのデータを示す。ここで、各CD33ガイド(例えば、CD33g7、CD33g8、及びCD33g17)標的を、異なる修飾CBE(5-メトキシウリジン(5-mO)、N1-メチルシュウドウリジン(N1)、又は野生型(WT))を用いて単一として編集し、ABE編集及びタンパク質ロックアウトと比較して、オンターゲット編集及びタンパク質ロックアウトに関してCD33ガイド/CBE対を評価した。

【0274】

図18Aは、Cas9対照編集細胞と比較した、CD33に対する単一塩基編集細胞のオンターゲット編集効率を示す。塩基編集は、異なるCD33ガイドRNA(例えば、CD33g7、CD33g8、及びCD33g17)を、アデニン塩基エディター(ABE)又はシトシン塩基エディター(CBE)と組み合わせて使用して実施した。これらのデータは、アデニン塩基エディター(ABE)とCD33g17の組み合わせは、ABEをコードする9µgの5-メトキシウリジン修飾mRNAを有するCD34+HSPCの電極ポレーション後120時間で、約90%のオンターゲット編集効率をもたらした。

30

【0275】

図18Bは、異なるCD33ガイドRNA(例えば、CD33g7、CD33g8、及びCD33g17)を、ABE又はCBEと組み合わせて使用して実施したCD33に対する単一塩基編集細胞のオンターゲット編集効率を示す。これらのデータは、ABEとCD33g17の組み合わせが、ABEをコードする5-メトキシウリジン修飾mRNAを有するCD34+HSPCの電極ポレーション後120時間で、スプライシングを破壊する置換を作り出す全ての編集を実質的にもたらした。

40

【0276】

図18Cは、EP後120時間の編集及び未編集CD34+HSPCにおけるCD33表面タンパク質発現を示す。これらのデータは、ABEとCD33g17の組み合わせが、ABEをコードする9µgの5-メトキシウリジン修飾mRNAを有するCD34+HSPCの電極ポレーション後120時間で、未編集(MockEP)と比較してCD33表面タンパク質発現の強力な喪失をもたらした。

【0277】

50

実施例 7 : A B E C D 3 3 g 1 7 は、第 1 の B E マルチプレックス実験に群として含まれる

1 人の健康なドナーからの C D 3 4 + 造血幹細胞及び前駆細胞 (H S P C) を解凍し、維持培地 (S F E M + F l t 3 、 S C F 、 T P O) 中で培養した。解凍の 2 日後、A B E 編集を行った。各 A B E マルチプレックス編集条件について、8 e 5 個の細胞を、異なる A B E C D 1 2 3 ガイド (例えば、s g 1 7 、 s g 1 8 、及び s g 2 1) と組み合わせた 9 μ g の N 1 - メチルシュードウリジン A B E 8 . 2 0 m 及び 4 . 7 μ M の A B E C D 3 3 g 1 7 ガイド - R N A でエレクトロポレーションし、N 1 - メチルシュードウリジン A B E 8 . 2 0 m が C D 3 3 及び C D 1 2 3 を同時に C D 3 4 + 細胞中でサイレンシングすることができるかどうかを決定した。図 1 9 は、実験設計を示す。この実験は、初めて、細胞における m R N A の安定性を増加させるための N 1 - メチルシュードウリジン化学的修飾を有する A B E m R N A の使用を示す。

10

【 0 2 7 8 】

この実験はまた、C D 3 3 及び C L L 1 の塩基編集マルチプレックス編集と比較するための C a s 9 C D 3 3 g 8 1 1 / C L L 1 g 6 マルチプレックス編集条件を含んでいた。

【 0 2 7 9 】

g D N A 用の細胞をエレクトロポレーション後 5 日で採取し、次世代シーケンシング (N G S) を実施して、アンプリコンシーケンシング標準プロトコルを使用して A B E ガイドの D N A 編集を測定した。フローサイトメトリーは、サイトメーターを使用してガイド編集試料及び対照試料における C D 3 3 及び C D 1 2 3 の表面タンパク質発現を測定するために、エレクトロポレーション後 5 日で実施した。

20

【 0 2 8 0 】

図 1 7 A 及び 2 0 A に示されるように、アデニン塩基エディター (A B E) と、C D 3 3 及び C D 1 2 3 (例えば、それぞれ C D 3 3 g 1 7 及び C D 1 2 3 g 1 8) を標的とする g R N A との複合化同時送達、C D 1 2 3 において約 9 0 % のオンターゲット編集効率を可能にする。図 2 0 B は、ヒト造血幹細胞及び前駆細胞 (H S P C) における塩基編集による骨髄性抗原のマルチプレックス欠失が、急性骨髄性白血病 (A M L) 治療のための次世代移植の可能性を可能にすることを示す。図 2 0 C は、A B E によって誘発されたスプライス部位破壊頻度が、研究の異なる群にわたって一貫して増加したことを示す。

【 0 2 8 1 】

30

実施例 8 : V i i v s 0 4 2 : マルチプレックス塩基編集インビボ研究

図 2 1 A 及び 2 1 B 並びに 2 2 A 及び 2 2 B は、N S G マウスにおける同時に C B E C D 3 3 + C L L 1 及び A B E C D 3 3 + C D 1 2 3 マルチプレックス編集 C D 3 4 + H S P C の編集及び長期再構成の持続性を評価するための実験設計及び条件を示す。

【 0 2 8 2 】

細胞を H S P C 解凍プロトコルに従って解凍し、次いで、培養物中で 4 8 時間休止させる。次いで、A B E 部分について、A B E C D 3 3 g 1 7 は、A B E C D 1 2 3 g 1 8 の各々とのマルチプレックス編集のために対形成される。2 つのガイド及び A B E のカーゴは、M a x c y t e エレクトロポレーションシステムを使用して細胞内にエレクトロポレーションされる。次いで、細胞を 4 8 時間培養した後、マウス投与のために採取する。細胞の一部は、エレクトロポレーション後 1 4 4 時間でのタンパク質ノックアウトのフローを評価するために培養物中にあるままであった。分子分析のための g D N A 用の細胞を、エレクトロポレーション後 4 8 時間及び 1 4 4 時間で収集した。

40

【 0 2 8 3 】

図 2 3 A 及び 2 3 B に示されるように、約 9 0 % の細胞の高い細胞生存率、及び同様の細胞計数を、B E シングルプレックス条件及びマルチプレックス条件の両方が達成された。図 2 4 A 及び 2 4 B に示されるように、投与のためにエレクトロポレーション (E P) の 4 8 時間後に採取された試料における塩基編集効率は、終止コドン増加を有し、かつスプライス部位が破壊された対立遺伝子を含む予想される対立遺伝子を示した。高い総編集はまた、E P 後 4 8 時間 (投与された細胞) で、全試料で確認され、E P 後 1 4 4 時間で

50

わずかに増加した（図 25）。図 26 A 及び 26 B はそれぞれ、200 希釈及び 400 希釈でのコロニー形成単位（CFU）の結果を示す。

【0284】

実施例 9：16 週間の BM データ

16 週の骨髄を採取し、特定の表面タンパク質について細胞を染色して、キメリズム、表面タンパク質ノックアウト、幹細胞及び前駆細胞の系統再構成、CD34 + 亜集団における CD123 ノックアウト、並びにこの実験の CBE 部分の亜集団における CLL1 ノックアウトを評価した。図 27 に示されるように、骨髄（BM）における 16 週間の生着後、編集された群のキメリズムへの影響は観察されなかった。骨髄（BM）における 16 週間の生着後、CD33（図 28 A）、CLL-1（図 28 B）、及び CD123（図 28 C）の非常に効率的なノックアウトが、ABE を用いた編集された群で観察された。編集された群における系統再構成で効果は観察されなかった（図 29 A ~ 29 H）。図 29 A は、編集された群における総系統再構成を示す。図 29 B ~ 29 H は、以下を含む、異なる細胞型にわたる編集された群における系統再構成を示す：Bリンパ球（図 29 B）、Tリンパ球（図 29 C）、単球（図 29 D）、HSPC（図 29 E）、顆粒球（図 29 F）、cDC（図 29 G）、及び pDC（図 29 H）。骨髄（BM）における 16 週間の生着後、単球（図 30 A）、顆粒球（図 30 B）、肥満 / 好塩基球（図 30 C）、cDC（図 30 D）、及び pDC（図 30 E）を含む、異なる細胞型にわたる骨髄亜集団における高レベルの CD123 KO が観察された。しかしながら、以下を含む異なる細胞型にわたって CLL1 KO のレベルが低いため、骨髄亜集団における低レベルの二重 KO が観察された：単球（図 31 A）、顆粒球（図 31 B）、肥満 / 好塩基球（図 31 C）、cDC（図 31 D）、及び pDC（図 31 E）。図 32 に示されるように、研究の異なる群にわたる骨髄材料におけるオンターゲット編集分析は、編集の持続性を確認する。更に、CBE によって誘導される終止コドン頻度は、研究の異なる群にわたって一貫してわずかに減少したが（図 33）、ABE によって誘導されるスプライス部位破壊頻度は、研究の異なる群にわたって一貫して増加した（図 34）。

10

20

【0285】

実施例 10：CBE CD33 / CLL-1 スケールアップ最適化

編集効率が増加するかどうかを見るため、Vivis042（初期の塩基編集インビオ研究）で使用される用量の 2 倍での CD33 g8 + CLL1 g3 を有する CBE を使用して、CD34 + 細胞をマルチプレックス編集する。この実験はまた、異なる細胞数が編集効率に影響を及ぼすかどうかを決定するために、標準的な 12 M 細胞ではなく、元の Vivis042 用量及びその用量の 2 倍で 6 M 細胞のエレクトロポレーションを含んでいた。図 35 ~ 37 は、評価された実験設計及び条件を示す。

30

【0286】

図 38 A 及び 38 B に示されるように、細胞計数及び生存率を示す。細胞増殖は、6 M 細胞、2 倍用量条件でわずかに低減した。図 39、40 A 及び 40 B は、CD33 及び CLL-1 のフローゲーティング戦略及び結果を示す。図 41 は、CD33 及び CLL-1 の二重ノックアウトを示す。

【0287】

図 42 は、2 倍用量が、CBE CD33 g8 の未成熟終止コドン形成をもたらす対立遺伝子のより高い頻度をもたらすことを示し、一方で図 43 は、2 倍用量が、CBE CLL1 g3 の未成熟終止コドン形成をもたらす対立遺伝子のより高い頻度をもたらすことを示す。

40

【0288】

実施例 11：CBE 及び ABE CD33 / EMR2

1 人の CD34 + ドナーを解凍し、維持培地（SFEM + Flt3、SCF、TPO）中で培養した。解凍の 2 日後、ABE 又は CBE 編集を行った。各条件について、1e6 個の細胞を、9ug の ABE（N1-MPU ABE8.20m mRNA）又は CBE（WT PpABOBE C1 mRNA）mRNA のいずれか及び 4.7uM のガイド R

50

NAでエレクトロポレーションした。追加の対照条件が含まれた。ガイド対照試料は、Cas9、ABE、又はCBE酵素を有する非標的化ガイドRNAを受け、エレクトロポレーションを受けた。モックエレクトロポレーション試料は、いかなる酵素もガイドRNAも受けなかったが、エレクトロポレーションを受けた。ノックアウト比較のための2つのリードCas9ガイド条件は、EMR2ガイド-329及びCD33ガイド-811を受け、15ugのSpCas9酵素及び15ugのCas9ガイド-RNAでエレクトロポレーションした。次いで、全ての条件を、エレクトロポレーション後6日間、維持培地(SFEM+Flt3、SCF、TPO)中で培養した。細胞計数及び生存率を、Nexcelom Cellometer及びAOPI染色(1:2希釈)を使用して、エレクトロポレーション後1日、2日、及び6日で測定した。gDNA用の細胞を、エレクトロポレーション後2日及び6日で採取し、rhAmpSeq(NGS)を実施して、ABE、CBE、又はCas9ガイドのDNA編集を測定した。フローサイトメトリーは、サイトメーターを使用してガイド編集試料及び対照試料におけるCD33及びEMR2の表面タンパク質発現を測定するために、エレクトロポレーション後6日で実施した。

【0289】

図44及び46は、実験設計及び条件を示す。CD33及びEMR2ガイドスクリーニングランドスケープを、図45に示す。図47A及び47Bは、それぞれ、EMR2及びCD33のCBE及びABE編集についての細胞生存率及び細胞計数を示す。図48A及び48Bは、それぞれ、EMR2の低減された表面発現を示す。これらのデータは、ABE EMR2ガイドがEPの6日後に強力なタンパク質KOを示すことを示す。図49A及び49Bは、それぞれ、EMR2実験条件が、EPの6日後に様々なレベルのタンパク質KOをもたらしたことを示す。図50A及び50Bは、それぞれ、CD33の低減された表面発現を示す。これらのデータは、ABE CD33ガイドがEPの6日後に強力なタンパク質KOを示すことを示す。図51A及び51Bは、それぞれ、CD33実験条件が、EPの6日後に様々なレベルのタンパク質KOをもたらしたことを示す。図52A及び52Bは、それぞれ、ABEによる総編集効率及び塩基編集効率を示す。HSPCにおけるABEガイドスクリーニングは、CD33及びEMR2遺伝子座の様々な部位で高い編集、及びバイスタンダー編集の低い頻度を示した。全ての実験条件は、MockEP対照と比較して良好な生存率(90%)及び細胞増殖を示した。図53は、ABE CD33 gRNAの編集効率を示す。図54は、ABE及びCBE EMR2 gRNAの編集効率を示す。

【0290】

実施例12: EMR2/CD33マルチプレックスABE塩基編集

1人のCD34+ドナーを解凍し、維持培地(SFEM+Flt3、SCF、TPO)中で培養した。解凍の2日後、ABE編集を行った。各条件について、8e5個の細胞を、9ugのABE(N1-MPU ABE8.20m mRNA)mRNA及び4.7uMのガイドRNAでエレクトロポレーションした。EMR2 ABEガイドRNA及びCD33 ABEガイドRNAを受けたマルチプレックス条件について、8e5個の細胞を、9ugのABE mRNA及び4.7uMの両ガイドでエレクトロポレーションした。追加の対照条件が含まれた。ガイド対照試料は、ABE酵素を有する非標的化ガイドRNAを受け、エレクトロポレーションを受けた。モックエレクトロポレーション試料は、いかなる酵素もガイドRNAも受けなかったが、エレクトロポレーションを受けた。エレクトロポレーション条件は、エレクトロポレーションを受けず、培養のみを受けた。次いで、全ての条件を、エレクトロポレーション後5日間、維持培地(SFEM+Flt3、SCF、TPO)中で培養した。細胞計数及び生存率を、Nexcelom Cellometer及びAOPI染色(1:2希釈)を使用して、エレクトロポレーション後1日、2日、及び5日で測定した。gDNA用の細胞を、エレクトロポレーション後2日及び5日で採取し、rhAmpSeq(NGS)を実施して、ABEガイドのDNA編集を測定した。フローサイトメトリーは、サイトメーターを使用してガイド編集試料及び対照試料におけるCD33及びEMR2の表面タンパク質発現を測定するために、エレクトロポレ

ーション後2日及び5日で実施した。RNAペレットも、エレクトロポレーション後2日及び6日で転写物発現のために処理するために取られた。

【0291】

図55及び56は、実験設計及び条件を示す。図57は、インシリコオフターゲット部位における潜在的なABEガイドを示す。

【0292】

図58A及び58Bは、それぞれ、EMR2及びCD33のABE編集のための細胞計数及び細胞生存率を示す。図59A及び59Bは、それぞれ、ABE EMR2及びCD33 DNA編集頻度を示す。図60A~60Cは、それぞれ、ABE EMR2編集頻度、編集結果、及びベース編集の要約を示す。図61A及び61Bは、それぞれ、CD97におけるEMR2オフターゲット編集の頻度及びその結果を示す。図62A~62Cは、それぞれ、ABE CD33編集頻度、編集結果、及びベース編集の要約を示す。図63及び64は、EMR2表面タンパク質発現を示し、図65及び66は、CD33表面タンパク質発現を示す。

【0293】

実施例13：CD33、CLL1、CD123、及びEMR2のCBEクアドラプレックス塩基編集

CD34+細胞のクアドラプレックス(すなわち、4つのゲノム標的の同時マルチプレックス編集)編集を、CBE及び4つの異なる遺伝子：CD33、CLL1、CD123、及びEMR2を標的とするガイドRNAを使用して行った。図67は、単一編集対照の編集条件(すなわち、使用されるガイドRNA)、並びに遺伝子標的CD33、CLL1、CD123、及びEMR2のクアドラプレックス編集Quad1、Quad2、Quad3、Quad4を示す。図68は、クアドラプレックス実験の実験設計を示す。簡潔に述べると、単一の健康なドナー(ドナー番号SD01000510)から得られた固定化されたCD34+(mCD34+)細胞を、野生型(WT)シトシン塩基エディター(CBE)mRNA構築物(WT CBE-PpAPOBEC1 mRNA N1-メチル-シュードウリジン、並びにCD33、CLL1、CD123、及びEMR2遺伝子を同時に標的とする4つのガイドRNAでエレクトロポレーションした。CD33、CLL1、CD123、及びEMR2ガイドRNAの各々を有する単一標的エレクトロポレーションもまた、対照として実施した。WT CBE構築物は、細胞におけるmRNAの安定性を改善するために、N1-メチル-シュードウリジン化学的修飾を含んでいた。1日目に、培養のためにmCD34+細胞を解凍した。48時間後、CD33、CLL1、CD123、及びEMR2ガイドRNAをmCD34+細胞に導入した。24時間後、細胞計数及び細胞生存率を評価した。48時間後、細胞計数及び細胞生存率を再び評価し、細胞を採取した。gDNAを精製し、NGSを介して編集読み出しを得た。各事例では、9マイクログラムのCBEを4.7uMのsgRNAと複合体化した。エレクトロポレーション(EP)後120時間の細胞のペレットを、次世代シーケンシング(NGS)を介して得られた編集読み出しをシーケンシングするために調製した。シーケンシング結果のコンピュータ分析を使用して、CD33、CLL1、CD123、及びEMR2タンパク質発現のノックアウト(KO)を決定した。図69A及び69Bは、エレクトロポレーション(EP)後24時間、48時間、及び120時間での細胞生存率及び細胞増殖(細胞/mL)を示し、クアドラプレックス編集が細胞生存率又は細胞増殖に著しい影響を与えずに、細胞の健康に影響を与えなかったことを示す。図70は、遺伝子標的CD33、CLL1、CD123、及びEMR2、又はEPのみの対照)について、単一の編集対照及びクアドラプレックス編集Quad1、Quad2、Quad3、Quad4についてNGSを介して測定された総編集のレベルを示す。全体として、オンターゲット編集は、クアドラプレックス条件の各々において各標的について達成された。単一のガイドのオンターゲット編集は、クアドラプレックス条件の各々におけるものと同様であり、わずかに低減された。図71は、様々な編集：遺伝子標的CD33、CLL1、CD123、及びEMR2についての、単一編集対照に対する得られた終止コドン、ミスセンスバリエーション(C>G又

10

20

30

40

50

は C > A)、インデル、又は意図されていない編集、並びにクアドラプレックス編集 Quad 1、Quad 2、Quad 3、Quad 4 に対する編集の割合を示す。塩基編集分布 (終止コドン獲得、ミスセンスバリエーション、インデル、及び意図されていない編集のうち) は、対応するクアドラプレックス条件にあるように、単一の標的と同等であった。これらのデータは、同時クアドラプレックス塩基編集で達成可能な実現可能性及び成功を示す。これらの実験は、クアドラプレックス条件 (約 40%) における CBE EMR 2 g 8 を除いて、約 50% 以上の CD 33 / CLL 1 / CD 123、及び EMR 2 クアドラプレックス編集細胞を達成した。特に、細胞生存率又は細胞増殖への影響はなかった。

【 0294 】

実施例 14 : ABE CD 33 / CD 123 / EMR 2 三重 KO

1 人の CD 34 + ドナーを解凍し、維持培地 (SFEM + Flt 3、SCF、TPO) 中で培養した。解凍の 2 日後、ABE 編集を行った。各条件について、 1×10^6 個の細胞を、 $9 \mu\text{g}$ の ABE (N1 - MPU ABE 8 . 20 m mRNA) mRNA 及び $4.7 \mu\text{M}$ のガイド RNA でエレクトロポレーションした。EMR 2 ABE ガイド RNA 及び CD 33 ABE ガイド RNA 及び CD 123 ABE ガイド RNA を受けたトリプレックス条件については、 1×10^6 個の細胞を、 $9 \mu\text{g}$ の ABE mRNA 及び $4.7 \mu\text{M}$ の 3 つ全てのガイドでエレクトロポレーションした。追加の対照条件が含まれた。ガイド対照試料は、ABE 酵素を有する非標的化ガイド RNA を受け、エレクトロポレーションを受けた。モックエレクトロポレーション試料は、いかなる酵素もガイド RNA も受けなかったが、エレクトロポレーションを受けた。エレクトロポレーション条件は、エレクトロポレーションを受けず、培養のみを受けた。次いで、全ての条件を、エレクトロポレーション後 5 日間、維持培地 (SFEM + Flt 3、SCF、TPO) 中で培養した。細胞計数及び生存率を、Cellometer 及び AOPI 染色 (1 : 2 希釈) を使用して、エレクトロポレーション後 1 日、2 日、及び 5 日で測定した。gDNA 用の細胞を、エレクトロポレーション後 2 日及び 5 日で採取し、rhAmpSeq (NGS) を実施して、ABE ガイドの DNA 編集を測定した。フローサイトメトリーは、サイトメーターを使用してガイド編集試料及び対照試料における CD 33、CD 123、及び EMR 2 の表面タンパク質発現を測定するために、及び三重ノックアウト効率を評価するために、エレクトロポレーション後 2 日及び 5 日で実施した。RNA ベレットも、エレクトロポレーション後 2 日及び 6 日で転写物発現のために処理するために取られた。

【 0295 】

図 7 2 及び 7 3 は、実験設計及び条件を示す。図 7 4 A 及び 7 4 B は、それぞれ、EP 後 2 日目及び 5 日目の DNA 編集頻度を示す。これらのデータは、EP 後 5 日目に、CD 33 g 16 について > 80% の編集、及び CD 123 g 18、EMR 2 s Dex 13、及び EMR 2 s Dex 19 について > 90% の編集を示す。CD 123 g 18、EMR 2 s Dex 13、及び EMR 2 s Dex 19 について、単一及びトリプレックス EP 条件で同様の編集が観察された。単一の EP と比較して、トリプレックスにおける CD 33 g 16 の編集のわずかな減少 (約 5% の減少) も観察された。全てのガイド及び条件にわたって、2 日目と比較して、5 日目でより高い編集が観察された。EMR 2 s Dex 13 及び EMR 2 s Dex 19 に対する CD 97 におけるオフターゲット編集は観察されなかった。図 7 5 A 及び 7 5 B は、それぞれ、EP 後 2 日目及び 5 日目の DNA 編集頻度を示す。これらのデータは、単一及びトリプレックス条件における全てのガイドに対する編集の大部分が、スプライス部位の破壊を引き起こすことを示す。EMR 2 s Dex 13 は、EP 後 2 日目及び 5 日目に約 4% の INDEL 形成を示す。図 7 6 A 及び 7 6 B は、それぞれ、CD 33 s g 16 群及び CD 123 s g 18 群における詳細な置換割合の概要を示す概略図である。図 7 7 A 及び 7 7 B は、それぞれ、EMR 2 s g 13 群及び EMR 2 s g 19 群における詳細な置換割合の概要を示す概略図である。図 7 8 A ~ 7 8 C は、フローサイトメトリーゲーティング戦略を示す概略図である。図 7 9 A 及び 7 9 B は、それぞれ、EMR 2 表面タンパク質発現及び総 gMFI を示す。図 8 0 及び 8 1 は、それぞれ、CD 33 表面タンパク質発現及び総 gMFI を示す。図 8 2 A 及び 8 2

Bは、それぞれ、CD123表面タンパク質発現及び総gMFIを示す。図83A及び83Bは、それぞれ、CD33、CD123、及びEMR2表面タンパク質発現、並びに三重KO表面発現を示す。図84A及び84Bは、それぞれ、CD33、CD123、及びEMR2 DNA編集、並びに三重KO表面タンパク質分析を示す。

【0296】

実施例15：CLL-1 ABEガイドの評価

図85Aに示されるように、SpCas9 NGG PAMを有するCLL-1 ABEガイドを生成した。

【0297】

図85Bに示されるように、不完全なPAM(NG)を有するCLL-1 ABEガイドを生成した。 10

【0298】

図85Cに示されるように、不完全なPAM(NRG)を有するCLL-1 ABEガイドを生成した。

【0299】

図85Dに示されるように、Cpf1 TTTN PAMを有するCLL-1 ABEガイドを生成した。

【0300】

CLL-1遺伝子の概要を図85Eに提供する。

【0301】

以下のg15及びg38の両方は、稀なGTAAスプライドナー部位を破壊して、CLL-1ノックアウトを引き起こす可能性がある。 20

【表21】

ガイド	スペーサー配列	PAM_Seq	dbSNP_計数	OT_スコア	BE_ウィンドウ	編集可能な対立遺伝子計数	BE_配列	コドン	アミノ酸	結果
g15	AAAGGTAAGATTTTGAGTTA	TGG	0	405	aGGTaa	3	gGGTaa gGGTga gGGTgg	AAA/AAG -	K-	稀なGTAAスプライドナー部位を破壊して、CLL-1ノックアウトを引き起こす可能性がある。
g38	AAGGTAATCTTGTATTCTCT	TGG	0	210	GGTaaT	2	GGTgaT GGTggT	-	-	稀なGTAAスプライドナー部位を破壊して、CLL-1ノックアウトを引き起こす可能性がある。

【0302】

実施例16：CD33及びSiglec6の両方を標的とするためのABE CD33 g17の評価 40

シトシン塩基エディター(CBE)及び/又はアデニン塩基エディター(ABE)と組み合わせて、単一のガイドRNA、すなわち、CD33 g17を使用することによる、Siglec-6に対するマルチプレックス塩基編集の影響について分析を行った。CD33 g17のABE及びCBE標的配列のアライメントは、CD33 g17がCD33(「Siglec-3」としても知られる)及びSiglec-6の両方でスプライシングを破壊する可能性が高いことを示す。具体的には、図86に示されるように、Siglec-6のABE標的配列は、CD33のCBE標的配列内に存在するGGG PAMと同様のGGG PAMを含むため、CD33 g17ガイドは、Siglec-6のスプライシングを破壊する可能性が高い。更に、スプライスアクセプター部位のACモチーフは、ABE又はCBEのいずれかの編集ウィンドウ内にある(例えば、Aはガイドの5'末 50

端から6位にあり、Cは7位にある)。BE編集ウィンドウは、ガイドの5'末端からおよそ4~8bpの間である。したがって、AからGへの変換、又はCからTへの変換は、スプライシングの破壊をもたらすと予測された。実際に、図87に示されるように、Siglec-6表面発現は、アデニン塩基エディター(ABE)と組み合わせたCD33g17での編集後に減少した。CD33ノックアウトも観察された。

【0303】

マルチプレックスCBEインビトロ分化(IVD)時間経過実験。

実験の説明：インビトロ分化全体を通して経時的に、タンパク質KO、オンターゲット編集、並びにCD33及びCLL1の転写レベルを評価することによって、マルチプレックス塩基編集CD34+細胞の動態を特定する。

10

【0304】

マルチプレックス塩基編集CD34+細胞の動態を特定するために、タンパク質ノックアウト(KO)、オンターゲット編集、並びにCD33及びCLL1の転写レベルを、インビトロ分化全体を通して経時的に評価した。

【0305】

簡潔に述べると、CD34+細胞を、これらの標的(CD33g8及びCLL1g3、並びにCD33g17及びCLL1g3)についてgRNAを使用して、CD33及びCLL1を標的とするシトシン塩基エディター(CBE)で編集した。比較のために、細胞を、CD33及びCLL1についてCas9及び上位gRNAで編集した。これらの細胞を、インビトロ分化に2週間供した。実験中の様々な時点で、細胞を収集して、フローサイトメリー、オンターゲット編集、並びにCD33及びCLL1の転写物レベルを用いてタンパク質KOを測定する。

20

【0306】

実験は、CBEを使用したCD33及びCLL1のマルチプレックス編集が、単球又は顆粒球への分化に影響を及ぼすかどうかを示す。また、タンパク質発現、転写物レベル、及びオンターゲット編集の変化を観察するための分化中の時点特定のために役立つ。全体として、これらのアッセイを使用して、CD34+細胞における塩基編集の動態を決定する。

【0307】

Siglec6抗体検査。

30

実験の説明：CD33g17で編集されたインビトロ分化(IVD)HSCを、Siglec-6の表面発現について評価した。抗Siglec-6の最適な抗体クローンの選択及び染色条件を、細胞株で評価した。これらの条件を利用して、フローサイトメリーを介してIVD分化eHSC上の表面Siglec-6レベルを収集した。フローデータをFlowJoソフトウェアで分析し、データをPrism GraphPadでプロットした。

【0308】

Siglec6陽性細胞株及び陰性細胞株において、いくつかの抗体を試験し、どれが最良の発現プロファイルを有していたかを決定する。

【0309】

40

均等物及び範囲

当業者は、本明細書に記載される例示的な実施形態の多くの均等物を認識するか、又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いない。

【0310】

「a」、「an」、及び「the」などの冠詞は、反対の指示がない限り、又は文脈から明らかでない限り、1つ又は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「又は」を含む、請求項又は明細書は、反対の指示がない限り、又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、又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「又は」を含む群の開示は、群の正確

50

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、及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、具体的に主張又は否定され得ることが理解されるであろう。

【0311】

本発明は、請求項のうちの1つ以上、又は明細書の1つ以上の関連部分からの1つ以上の制限、要素、節、又は説明用語が、別の請求項に導入される、全ての変形例、組み合わせ、及び順列を包含することを理解されたい。例えば、別の請求項に依存する請求項は、同じ基本請求項に依存する任意の他の請求項において見出される限定のうちの1つ以上を含むように改変され得る。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、又は矛盾若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若しくは使用方法のうちのいずれかによる、又は存在する場合、当技術分野で公知の方法による、組成物を作製若しくは使用方法が含まれることを理解されたい。

10

【0312】

要素が、リストとして提示される場合、要素の全ての可能な個々の要素又は部分群も開示されており、任意の要素又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、特性又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、実施形態が、特定の要素、特徴、又はステップを含むと言及される場合、そのような要素、特徴、若しくはステップからなる、又はそれらから本質的になる実施形態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、具体的に主張又は否定され得ることが理解されるであろう。

20

【0313】

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、又は文脈及び/若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、具体的に主張され又は否認され得ることが理解されよう。また、別段で指示されない限り、又は文脈及び/若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、部分範囲の端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

【0314】

本明細書に記載される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献(例えば、配列データベース参照番号)は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。例えば、本明細書、例えば、本明細書の任意の表において言及される全てのGenBank配列、UniGene配列、及びEntrez配列は、参照により組み込まれる。別段の指定がない限り、本明細書に明記される配列受託番号は、本明細書の任意の表において、2019年8月28日現在のデータベースエントリを指す。1つの遺伝子又はタンパク質が複数の配列受託番号を参照する場合、配列バリエーションの全てが包含される。

40

【0315】

加えて、本開示の任意の特定の実施形態は、任意の1つ以上の請求項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。簡潔にするために、1つ以上の要素、特徴、目的、又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。

50

【 図 面 】

【 図 1 A 】

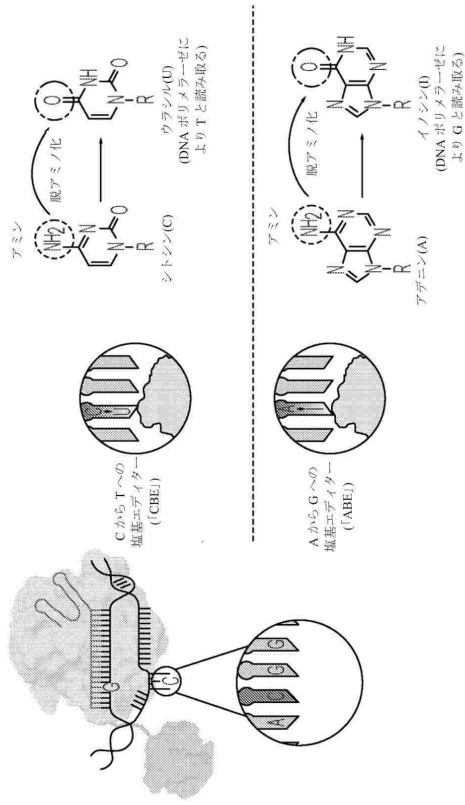


図 1A

【 図 1 C 】

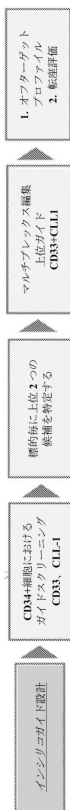


図 1C

【 図 1 B 】

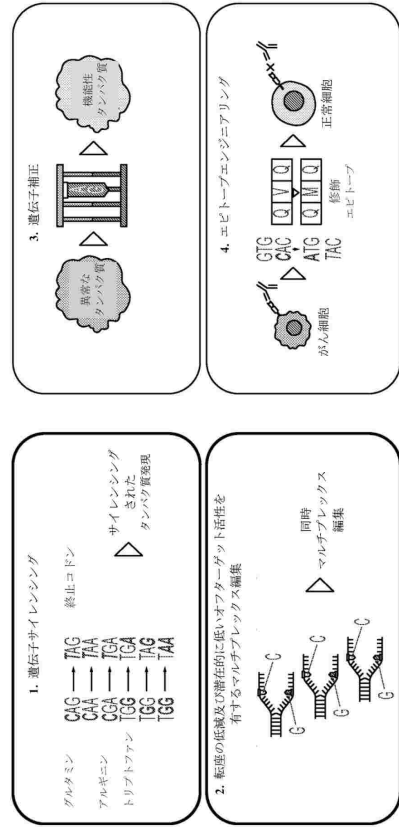


図 1B

10

20

【 図 2 A 】

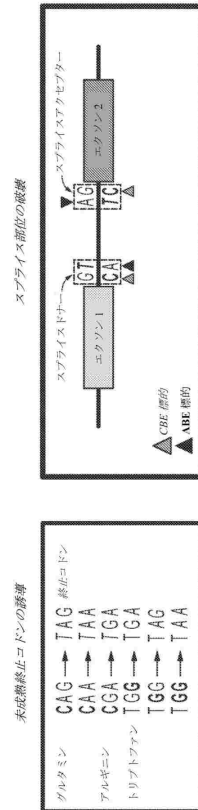


図 2A

30

40

50

【 図 2 B 】

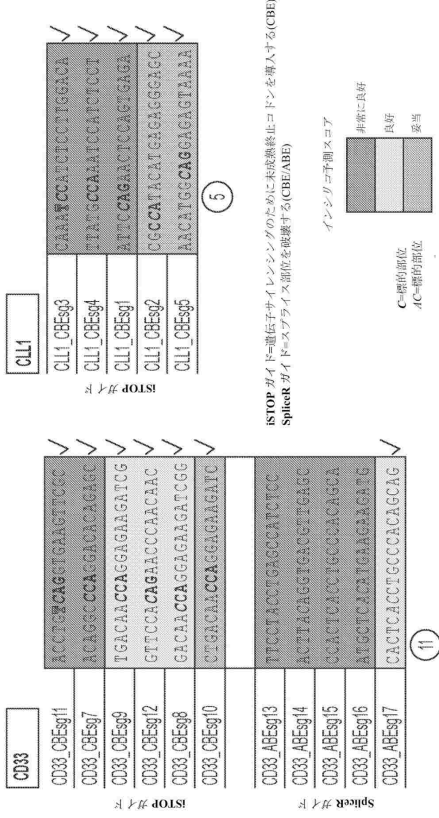


図 2B

【 図 2 C 】

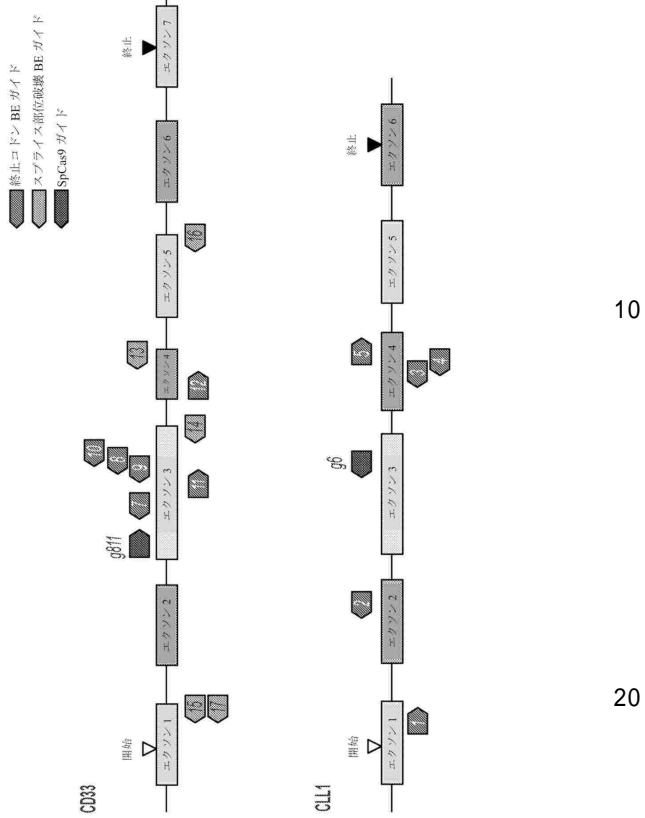


図 2C

【 図 3 A 】

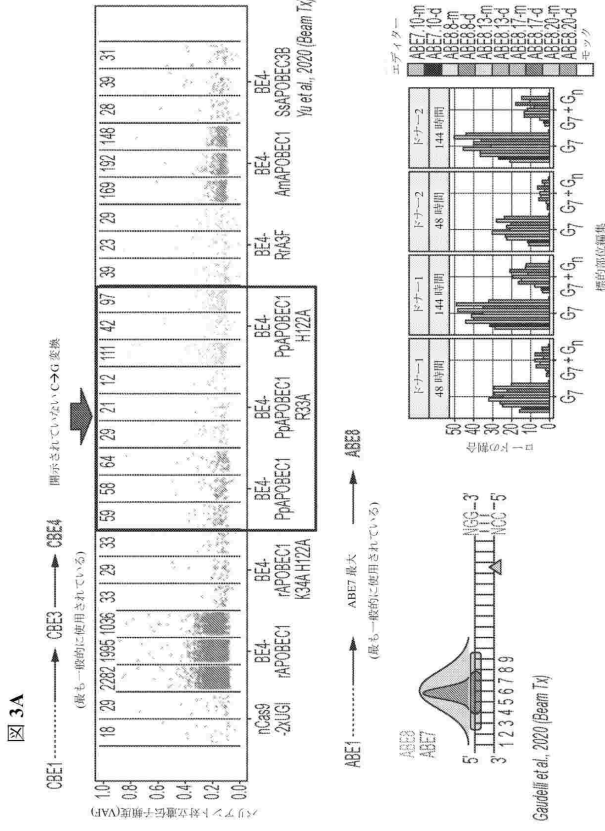


図 3A

【 図 3 B 】

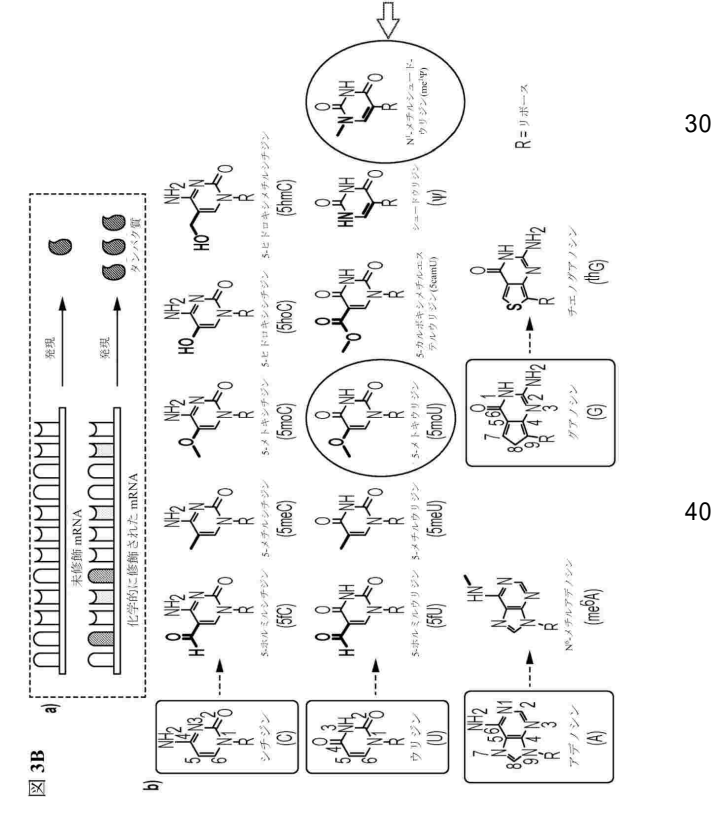


図 3B

10

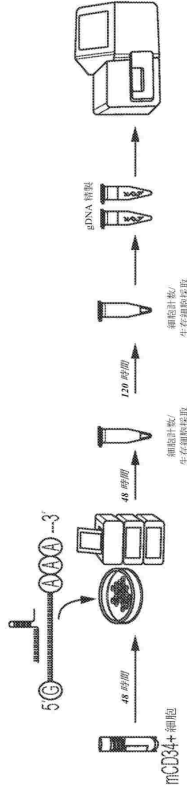
20

30

40

50

【 図 3 C 】



構築物 CBE-PpAOPBECl R3A mRVA NI ジェノード (Think), 例えば, Yu et al., 2020 (Beam Tx) を参照されたい
 ガイド: 合成化学的修飾 sgRNA
 CBE: 6.9ng, srRNA: 4.7nM (Beam Tx 条件), 37°C で回収された細胞
 2人の異なるドナーで実施されるガイドドスクリーニング;

図 3C

【 図 3 D 】

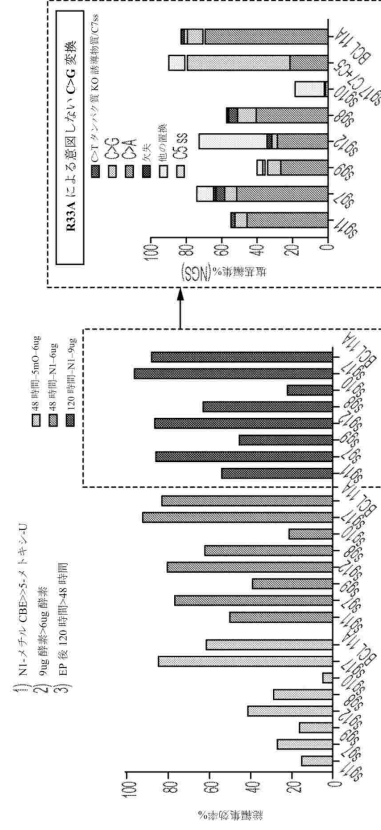


図 3D

- 1) NI-メチル CBE>>5-メトキシ-U
- 2) 9ng 培養-6ng 培養
- 3) EP 後 120時間-48時間

10

20

【 図 3 E 】

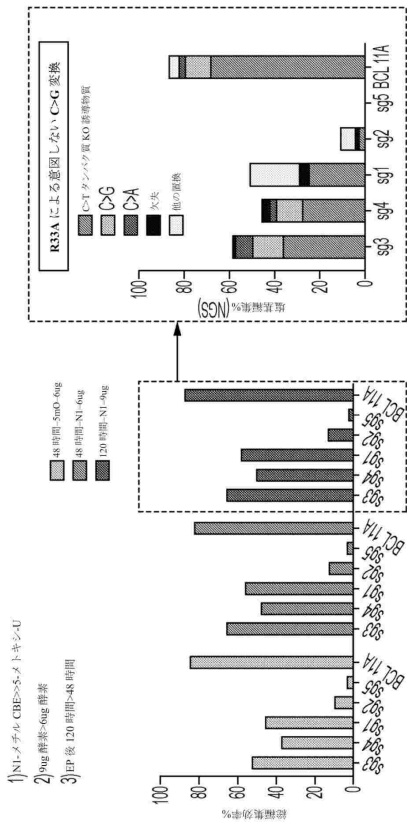


図 3E

- 1) NI-メチル CBE>>5-メトキシ-U
- 2) 9ng 培養-6ng 培養
- 3) EP 後 120時間-48時間

【 図 4 A 】

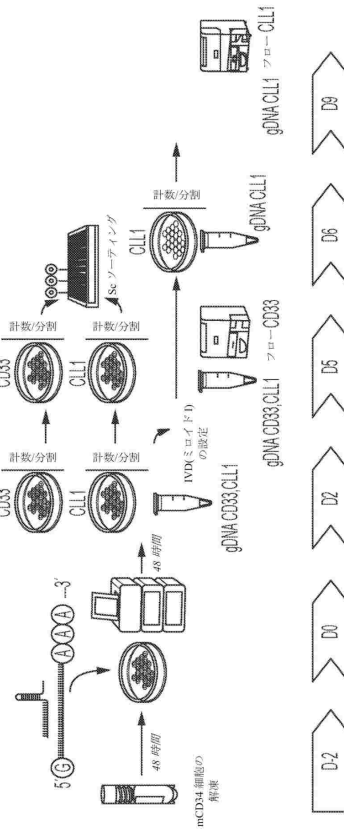


図 4A

30

40

50

【 図 4 B 】

番号	遺伝子名	分子分節	タンパク質 KO	第一種補因子遺伝子
1	CBE_R33A_5MO-CD33sg7		X	
2	CBE_R33A_5MO-CD33sg8		X	
3	CBE_R33A_5MO-CD33sg17		X	
4	CBE_R33A_5MO-CLL1sg3		X	
5	CBE_R33A_5MO-CLL1sg4		X	
6	CBE_R33A_5MO-BC11A		X	
7	ABE8_5MO-CD33sg17		X	X
8	CBE_R33A_NT_CD33sg7		X	
9	CBE_R33A_NT_CD33sg8		X	
10	CBE_R33A_NT_CD33sg17		X	
11	CBE_R33A_NT_CLL1sg3		X	
12	CBE_R33A_NT_CLL1sg4		X	
13	CBE_R33A_NT_BC11A		X	
14	CBE_WT_NT_CD33sg7		X	X
15	CBE_WT_NT_CD33sg8		X	X
16	CBE_WT_NT_CD33sg17		X	X
17	CBE_WT_NT_CLL1sg3		X	X
18	CBE_WT_NT_CLL1sg4		X	X
19	CBE_WT_NT_BC11A		X	X
20	SpCas9 CLL1 g6		X	
21	SpCas9 CD33g811		X	
22	モック EP		X	
23	CBE_WT_NT_BC11A_Ascp11_CD16g3		X	
24	CBE_WT_NT_BC11A_SpCas9_CD33g137		X	

PpABOBEICI R33A-S-メトキシ-U
 ABE8-S-メトキシ-U
 PpABOBEICI R33A-NI-メチルシユードU
 PpABOBEICI WT-NI-メチルシユードU
 Ho ↓ C-G 変換
 SpCas9 対照

図 4B

【 図 4 C 】

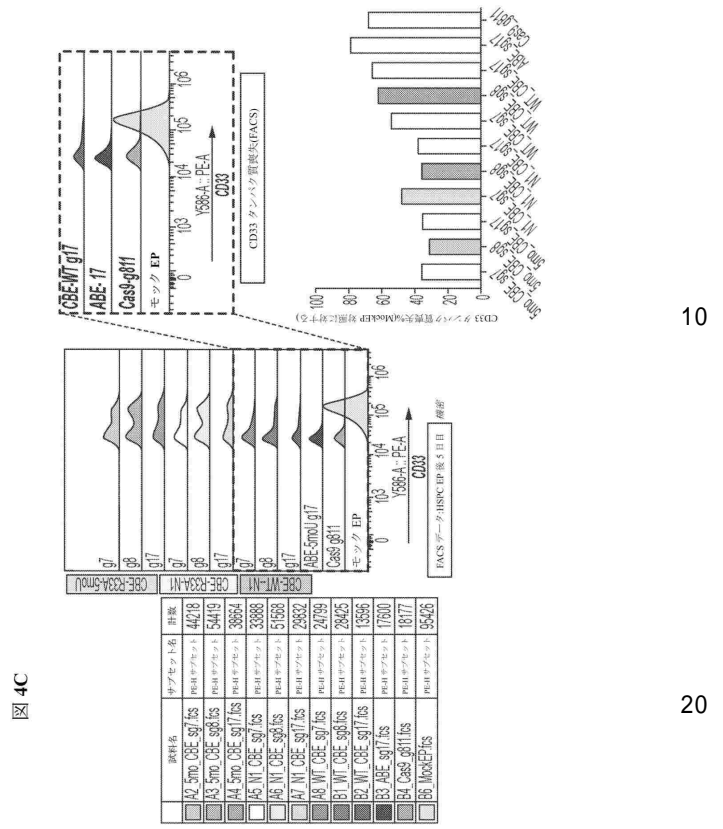


図 4C

【 図 4 D 】

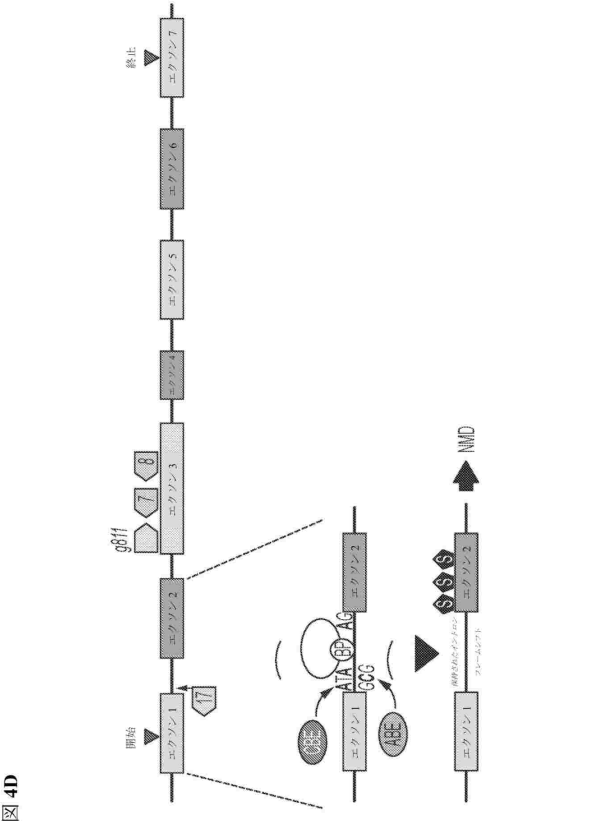


図 4D

【 図 4 E 】

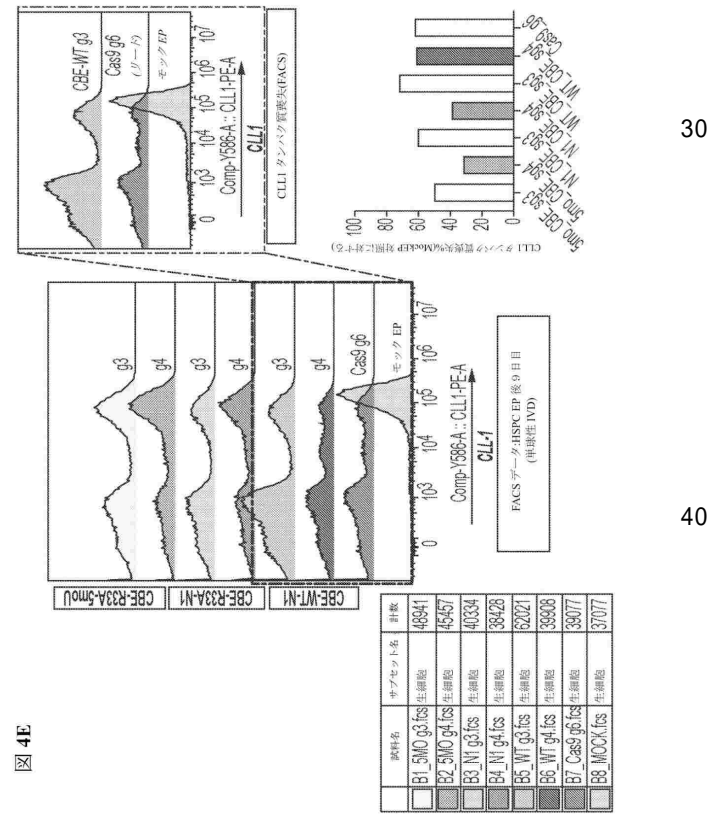


図 4E

10

20

30

40

50

【 図 4 F 】

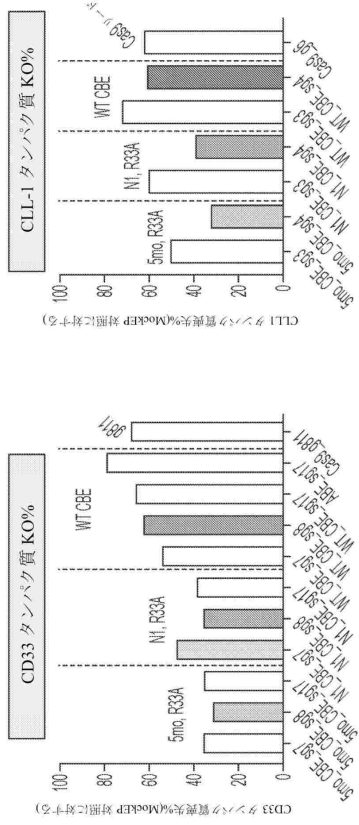


図 4F

【 図 5 B 】

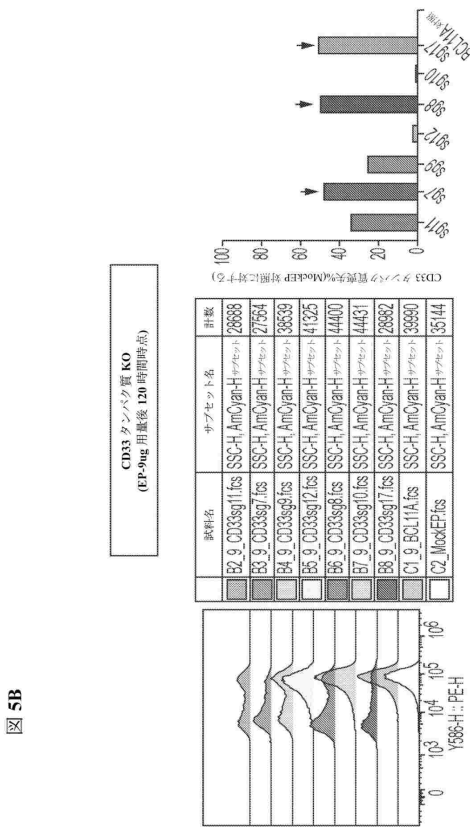


図 5B

【 図 5 A 】

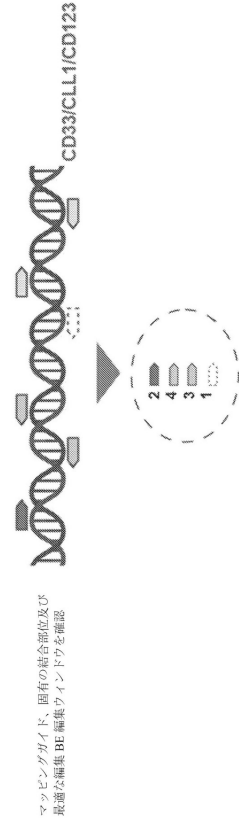


図 5A

【 図 5 C 】

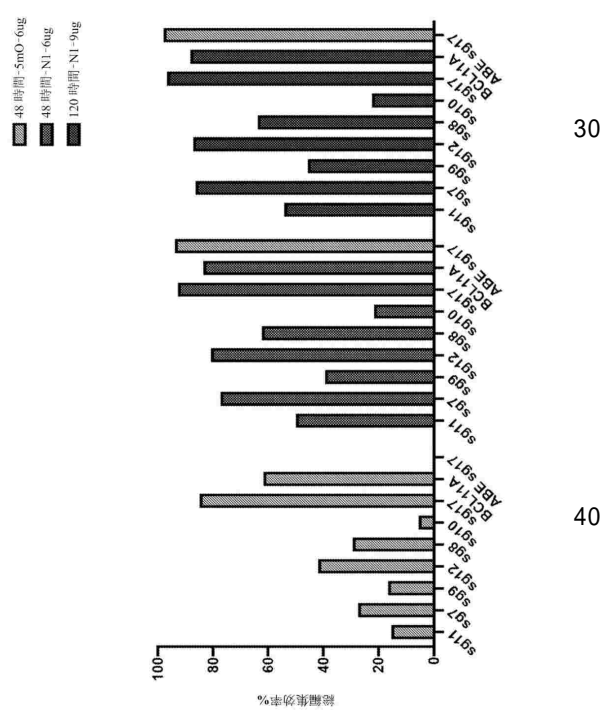


図 5C

10

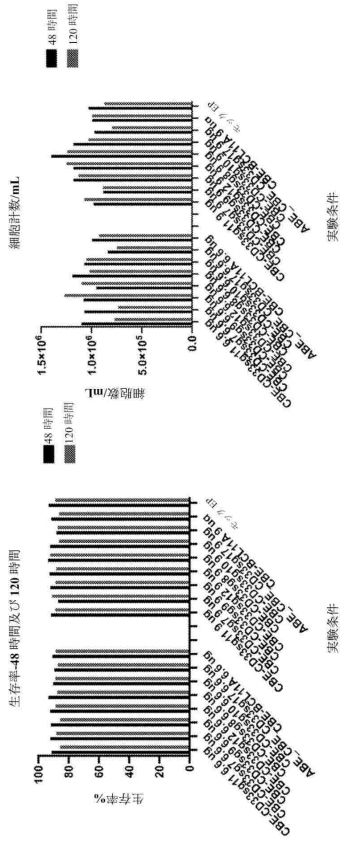
20

30

40

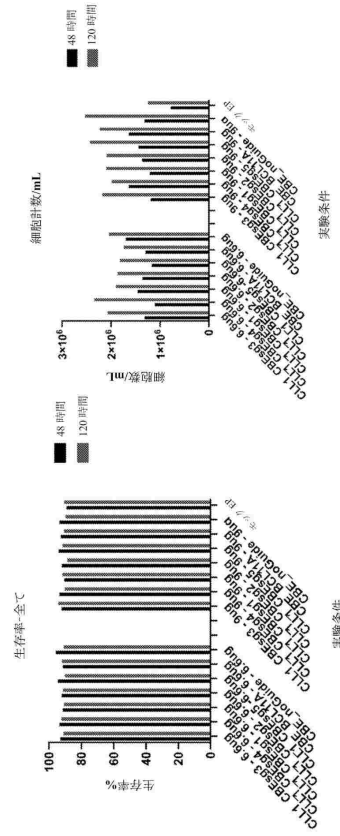
50

【 5 D 】



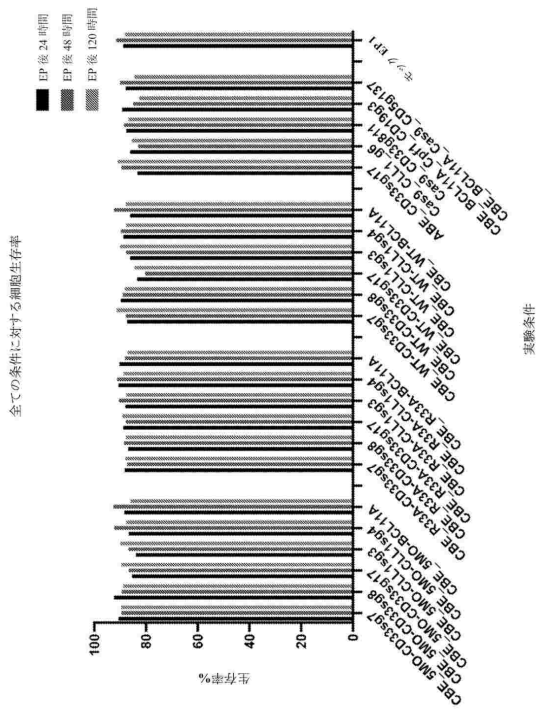
5 D

【 5 E 】



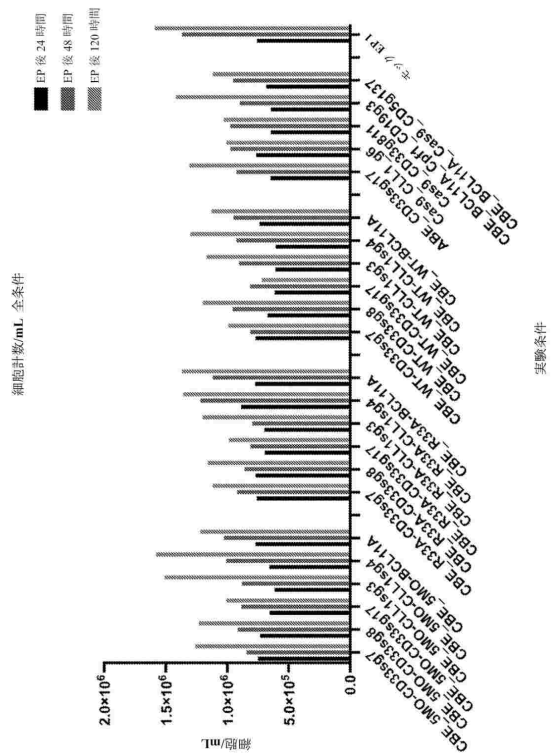
5 E

【 5 F 】



5 F

【 5 G 】



5 G

10

20

30

40

50

【 図 5 H 】

- 5MO-R33A-CLL1_g3
- 5MO-R33A-CLL1_g4
- N1-R33A-CLL1_g3
- N1-R33A-CLL1_g4
- WT-CLL1_g3
- WT-CLL1_g4
- Cas9-CLL1_g6
- モック EP

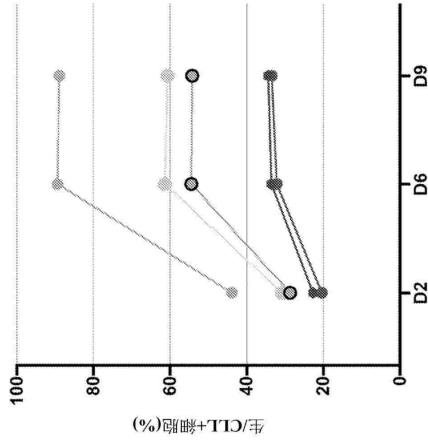


図 5H

【 図 6 B 】

実験条件	DNA	RNA	IVD
CBE_WT-CD33sg17	X	X	
CBE_WT-CD33sg7	X	X	
CBE_WT-CD33sg8	X	X	
CBE_WT-CLL1sg3	X	X	
CBE + CD33g17-CLL1g3 1:1	X	X	X
CBE + CD33g17-CLL1g3 1:2	X	X	X
CBE + CD33g7-CLL1g3 1:1	X	X	X
CBE + CD33g7-CLL1g3 1:2	X	X	X
CBE + CD33g8-CLL1g3 1:1	X	X	X
CBE + CD33g8-CLL1g3 1:2	X	X	X
CBE + BCL11A	X	X	
CBE + B2M	X	X	
CBE + BCL11A + B2M	X	X	
Cas9 + CD33g8 + CLL1g3 Sim.	X	X	
モック EP1	X	X	X

Pp-ABORICI WT N1-メチルシユード U

SpCas9 同時送達参照

図 6B

【 図 6 A 】

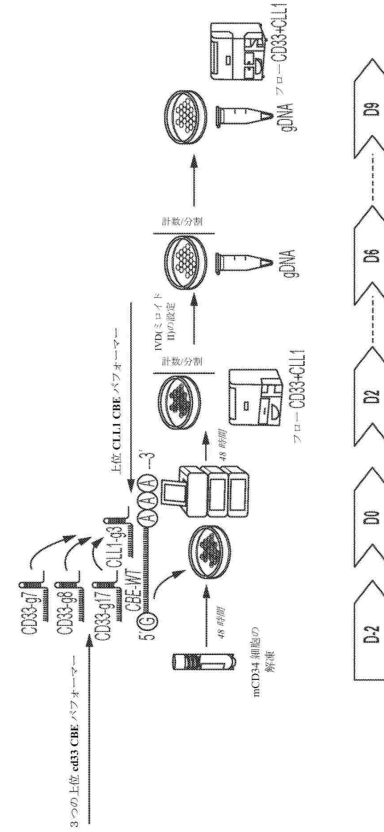


図 6A

【 図 6 C 】

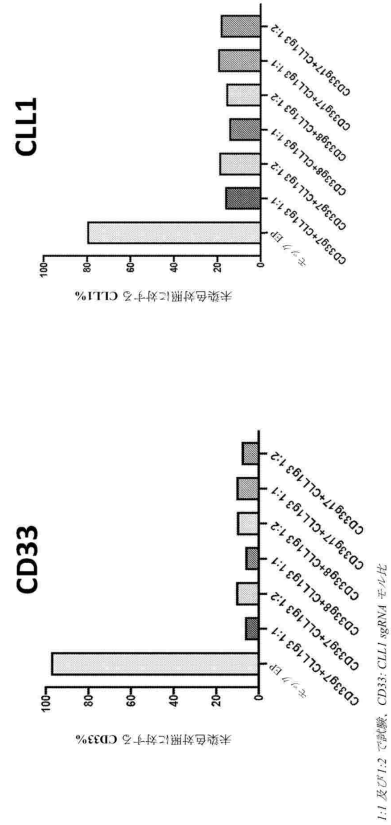


図 6C

10

20

30

40

50

【 図 6 D 】

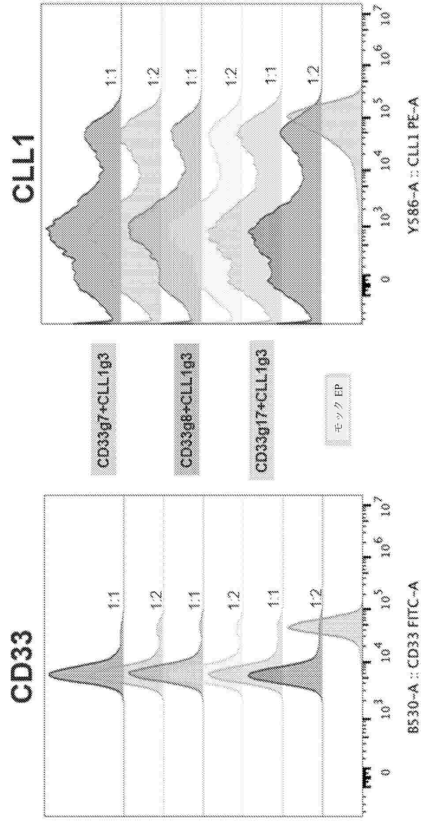


図 6D

【 図 6 E 】

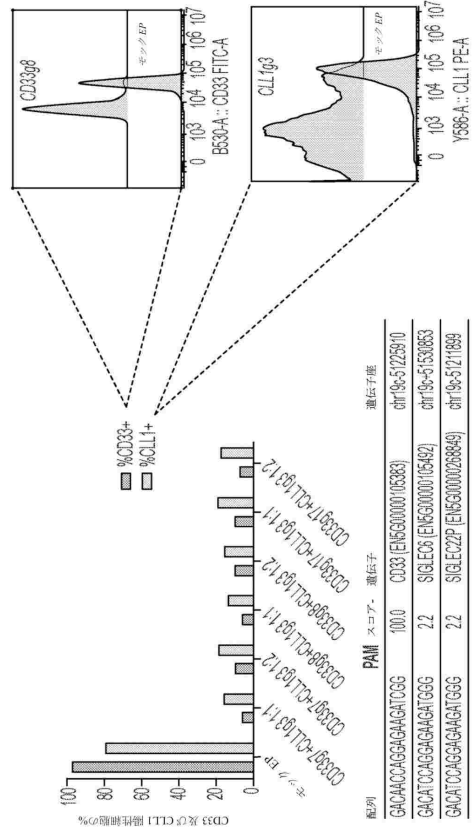


図 6E

【 図 6 F 】

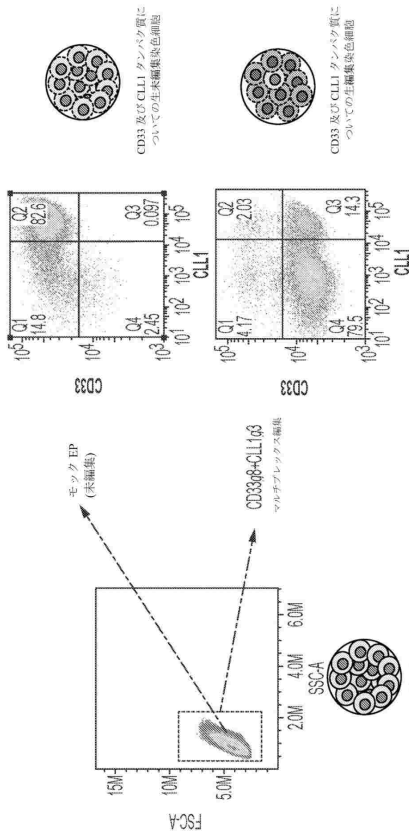


図 6F

【 図 7 】

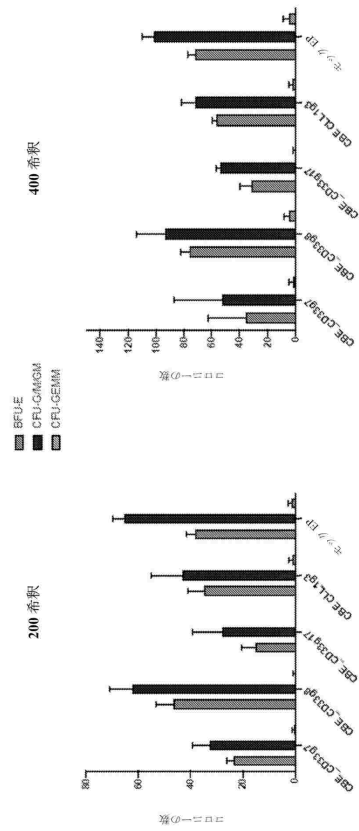


図 7

10

20

30

40

50

【 図 8 A 】

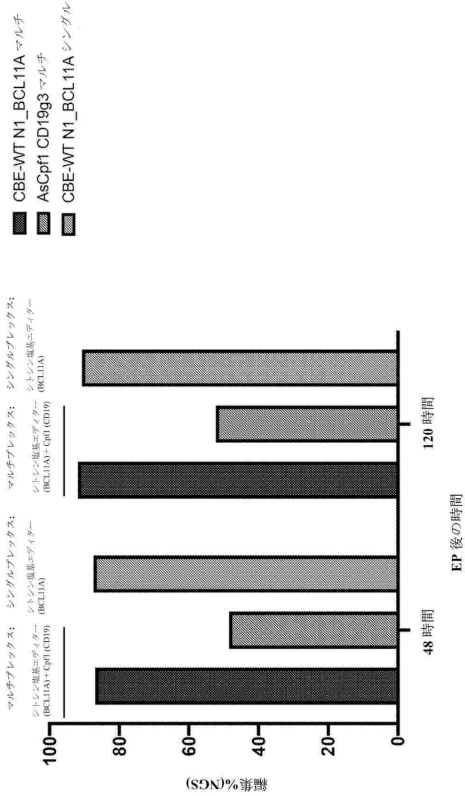


図 8A

【 図 8 B 】

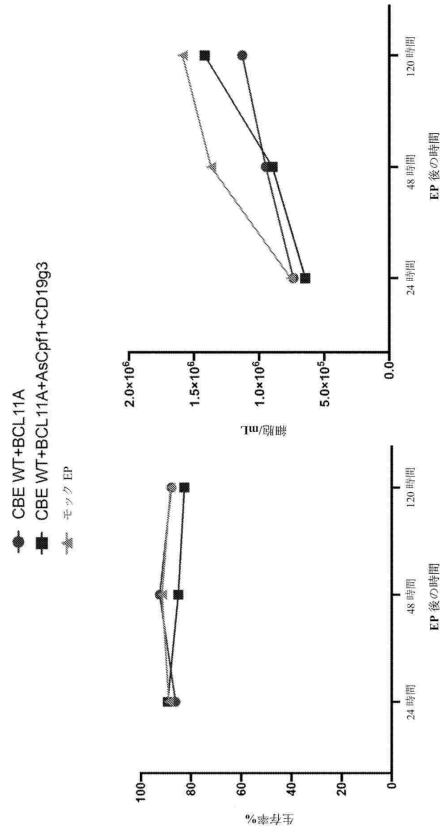


図 8B

【 図 9 A 】

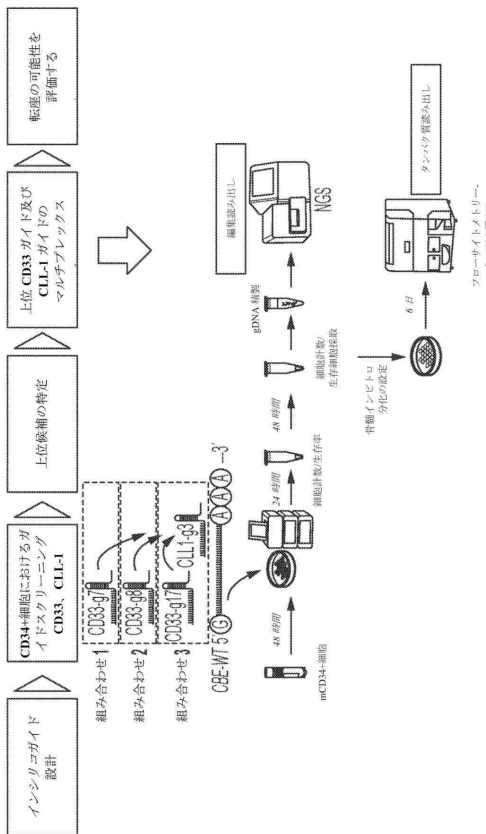


図 9A

【 図 9 B 】

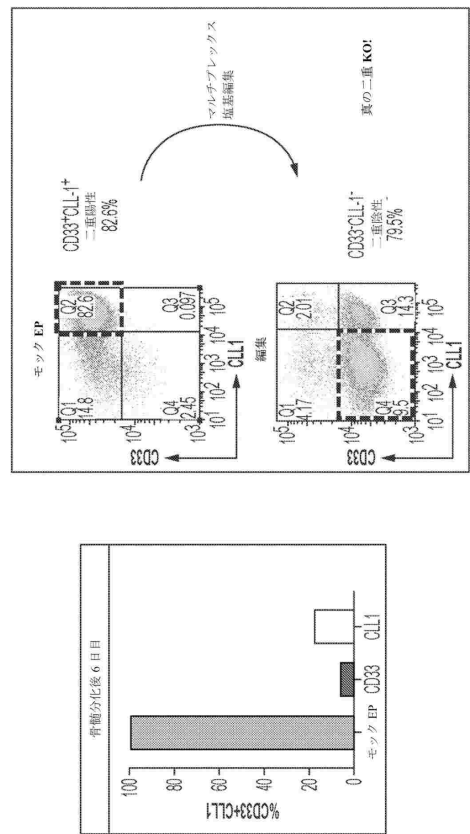


図 9B

10

20

30

40

50

【 図 9 C 】

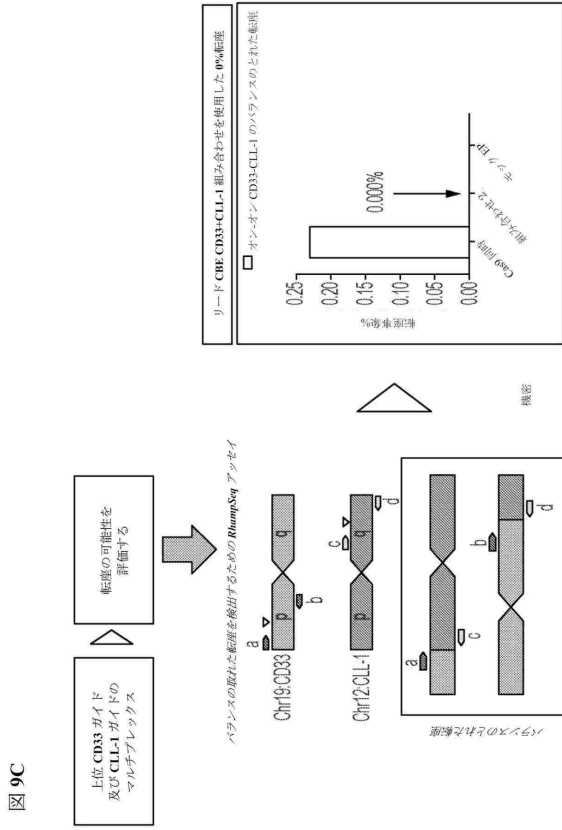


図 9C

【 図 1 1 】

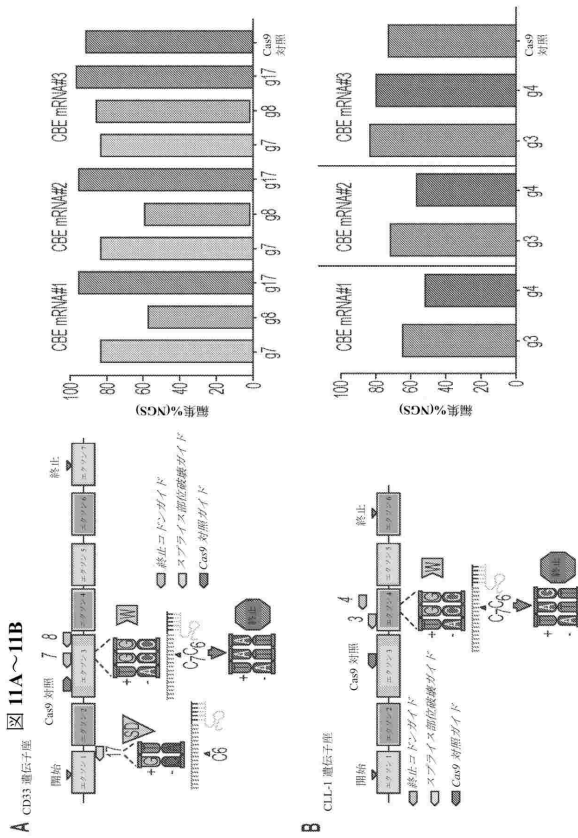


図 11A~11B

【 図 1 0 】

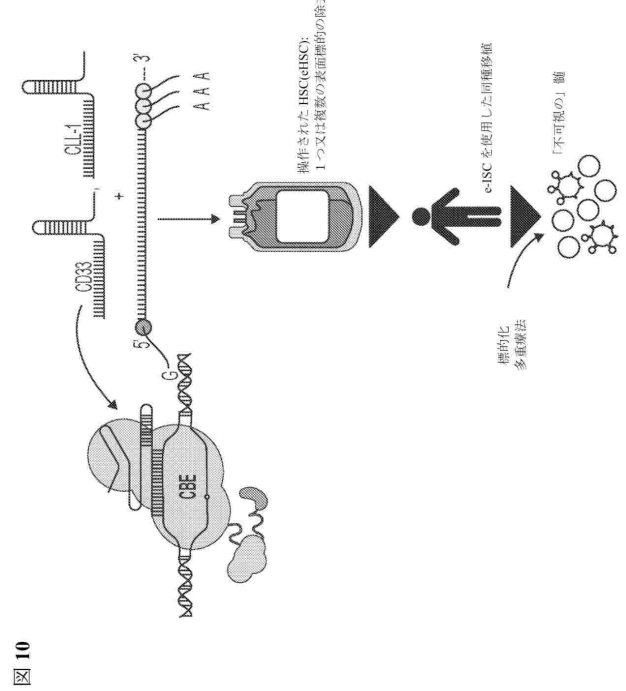


図 10

【 図 1 2 】

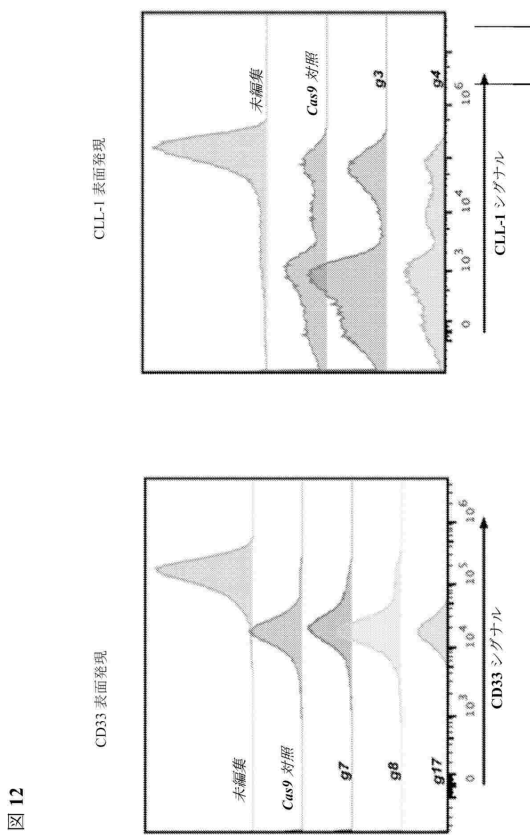


図 12

【 図 1 3 A 】

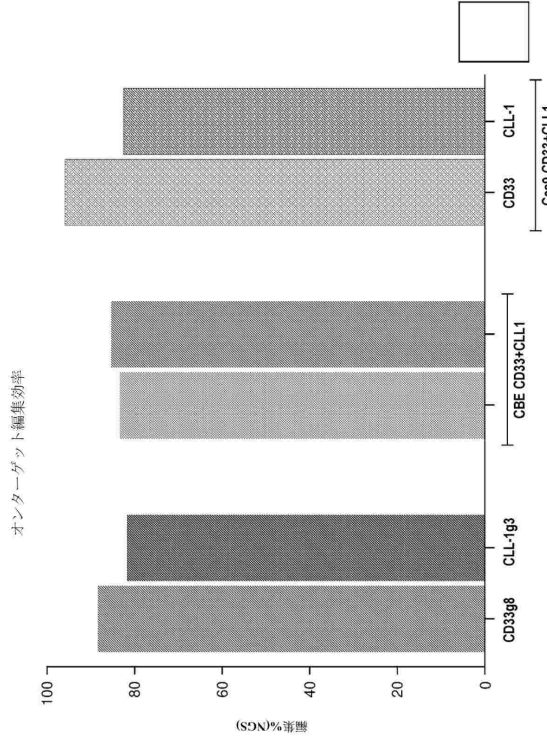


図 13A

【 図 1 3 B 】

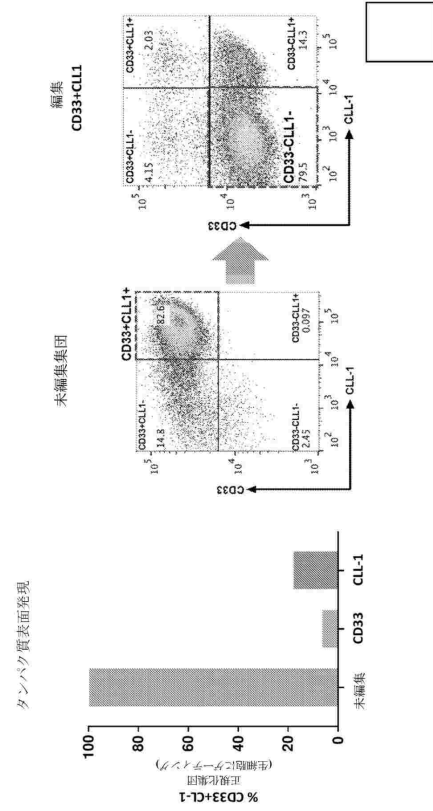


図 13B

【 図 1 4 】

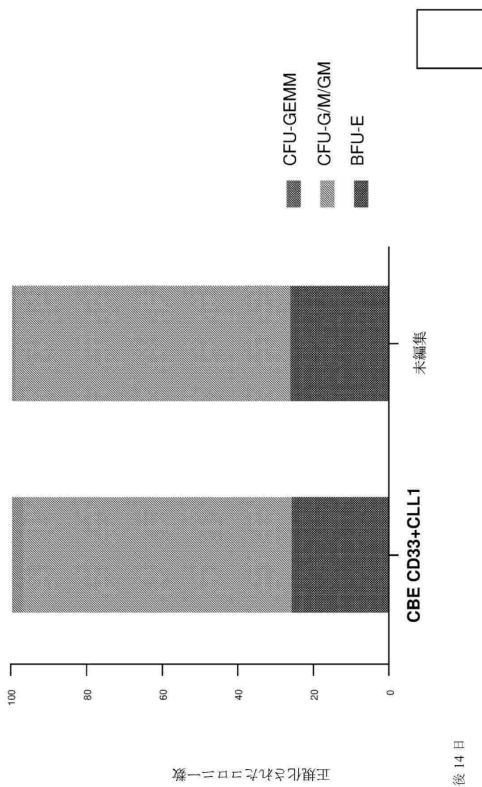


図 14

【 図 1 5 A 】

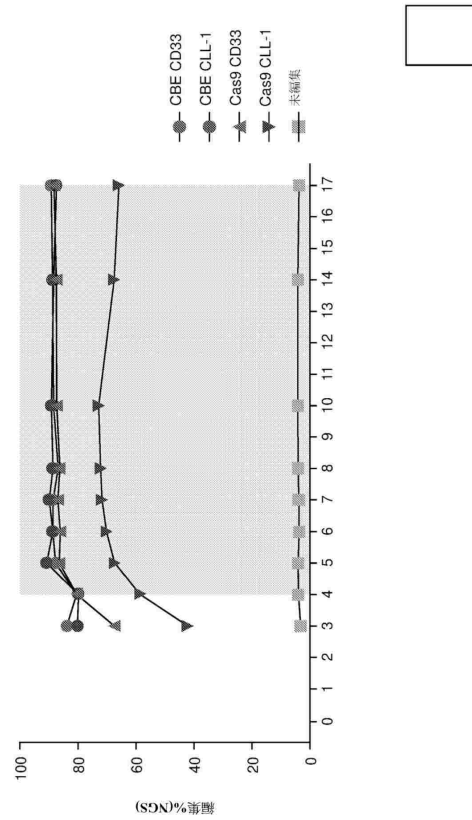


図 15A

10

20

30

40

50

【 図 1 5 B 】

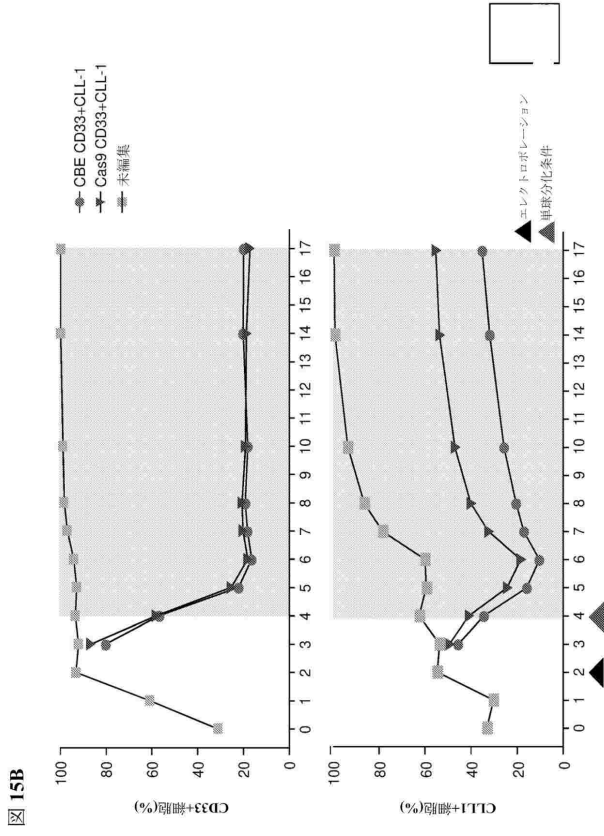


図 15B

【 図 1 6 A 】

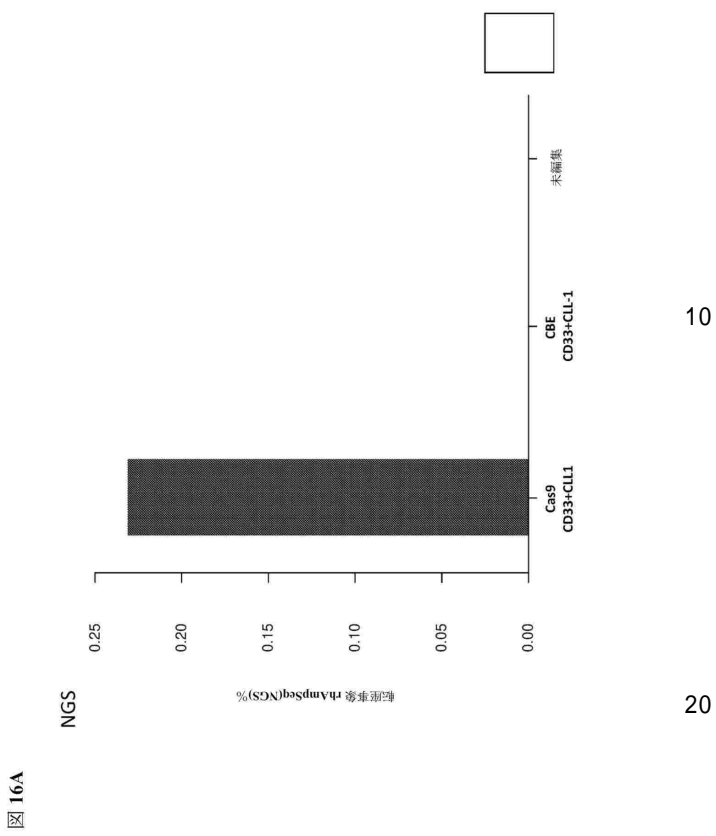


図 16A

【 図 1 6 B 】

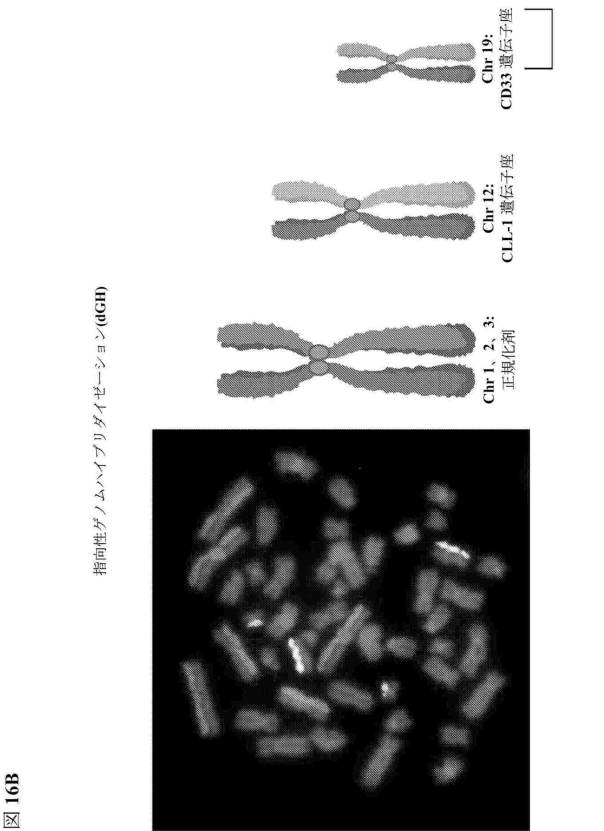


図 16B

【 図 1 7 A 】

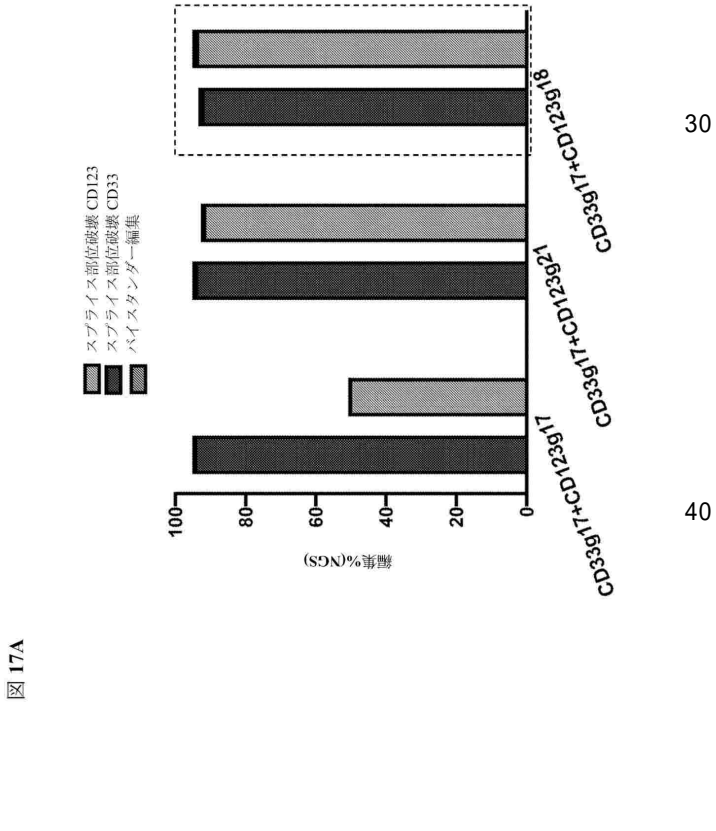


図 17A

10

20

30

40

50

【 図 17 B 】

CD123gR の最良のオフターゲットプロファイル(4mm) → Vitis042

配列	PAM	スコア	遺伝子	遺伝子座
ATTACGGCATAGAAATAGT	CGG	100.0	IL3RA (ENSGG00000186281)	chrX:1345424
TATCTGGCATAGAAATAGT	TGG	1.0		chr6:55097250
ACATACAGCAATAGAAATAGT	AGG	1.0		chr11:239375937
AGTTCAGGCAATAGAAATAGT	AGG	1.0		chr9:36703681
TCTTAGCAGCATAGAAATAGT	AAG	0.9		chr6:18347968

図 17B

【 図 17 C 】

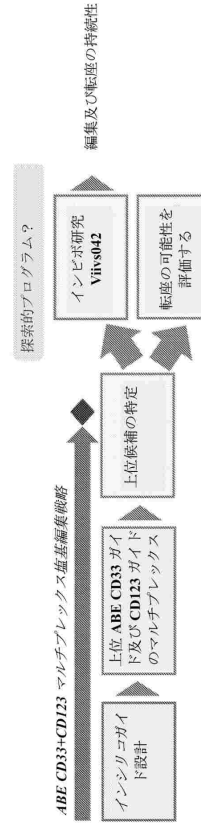


図 17C

【 図 18 A 】

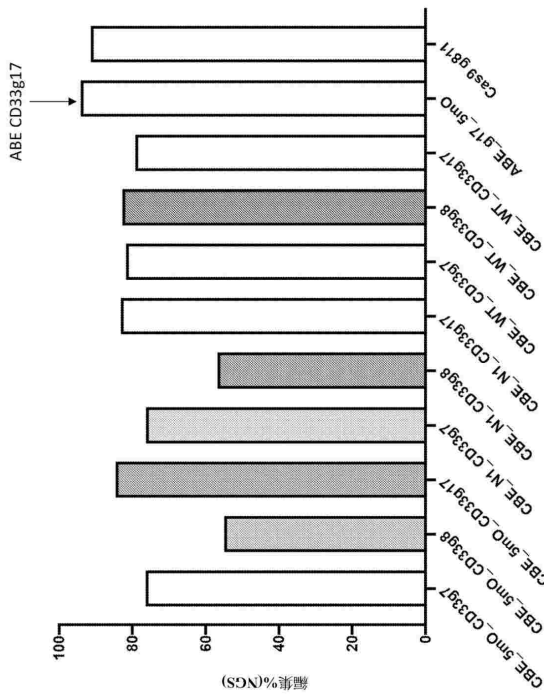


図 18A

【 図 18 B 】

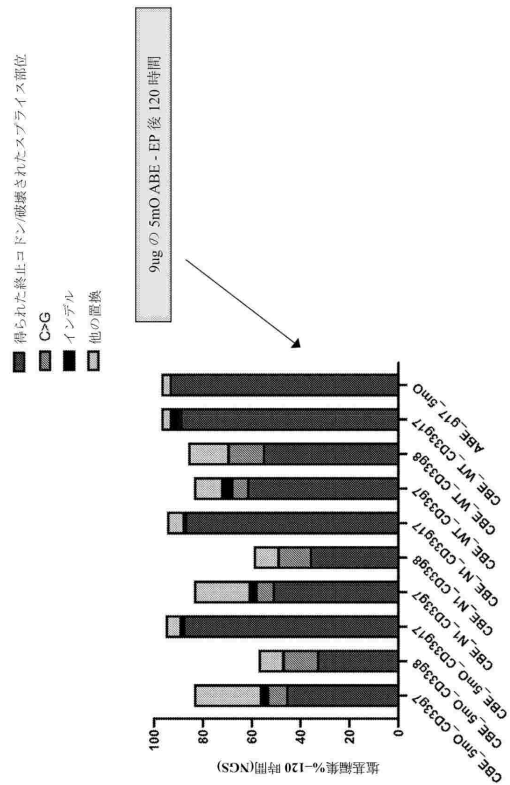


図 18B

10

20

30

40

50

【 図 18 C 】

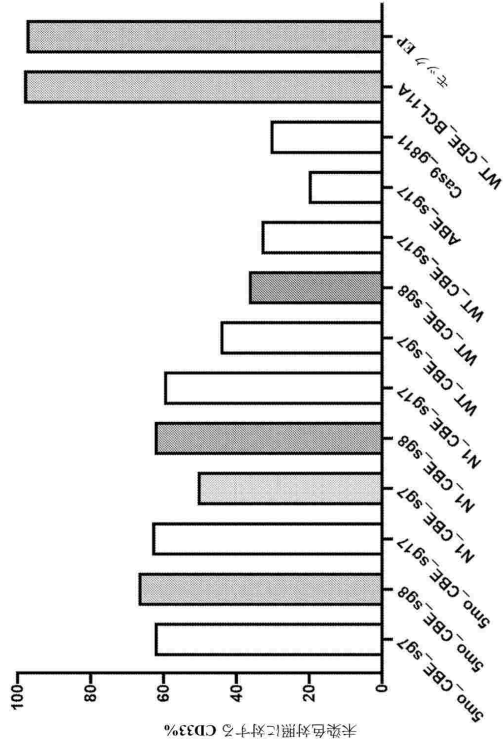


図 18C

【 図 20 A 】

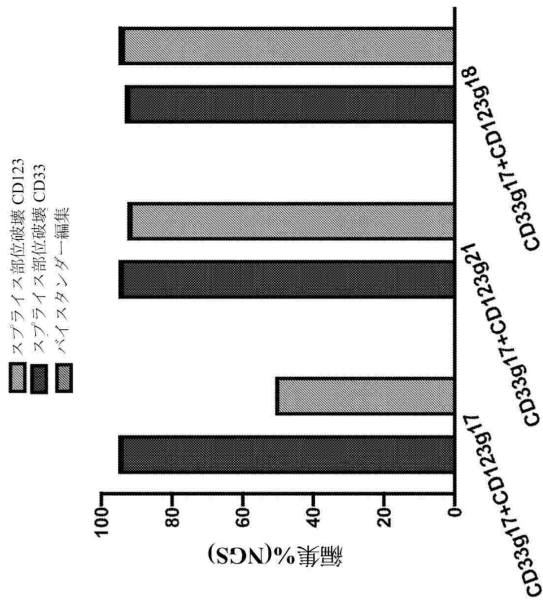


図 20A

【 図 19 】

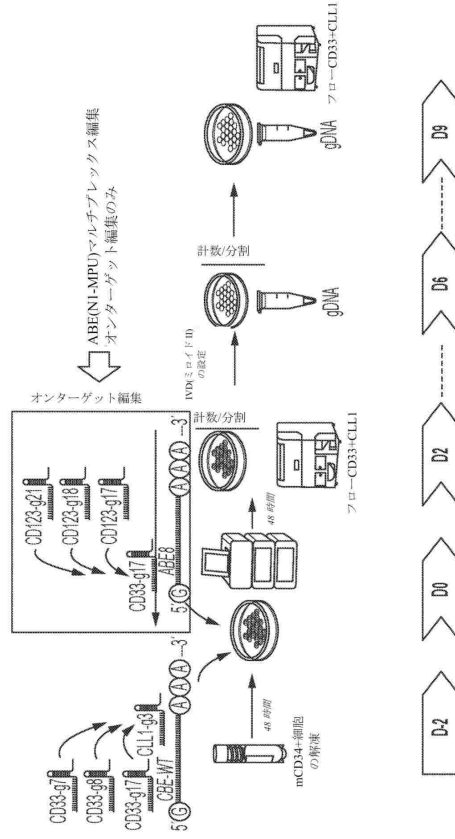


図 19

【 図 20 B 】

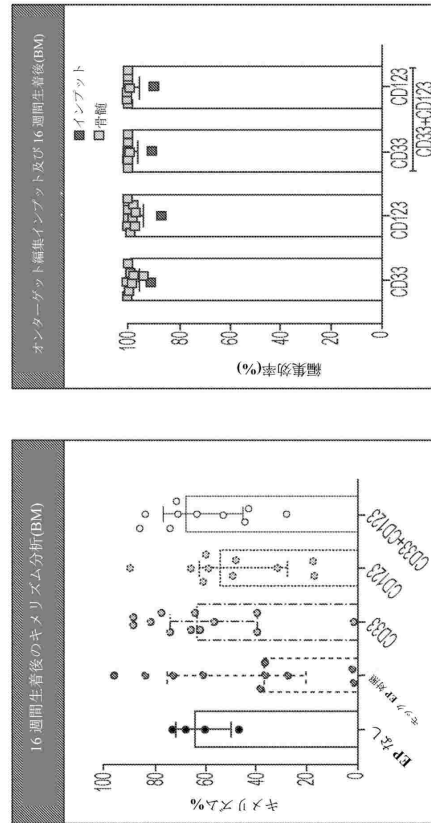


図 20B

10

20

30

40

50

【 図 2 0 C 】

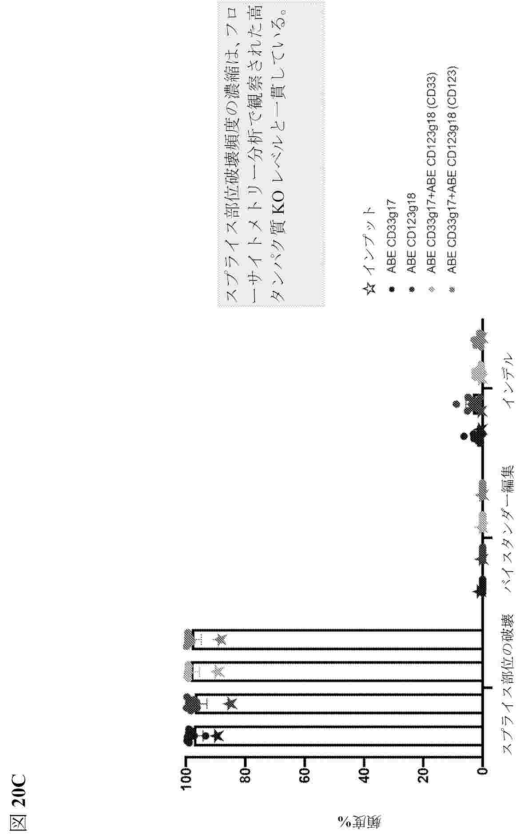


図 20C

【 図 2 1 B 】

群の番号	研究群	投与された動物数	CBE	gRNA1	gRNA2	細胞数	Rad
1	対照	3	-	-	-	-	-
2	培養物のみ	3	-	-	-	5.5M	200cGy
3	CBE_CD33g8	10	9ug	4.7uM	-	12M	200cGy
4	CBE_CLL1g3	10	9ug	4.7uM	-	12M	200cGy
5	CBE_CD33g8+CLL1g3	10	9ug	4.7uM	4.7uM	12M	200cGy
6	モック EP	10	-	-	-	12M	200cGy
7	ABE+CD33g17	10	9ug	4.7uM	-	12M	200cGy
8	ABE + CD123g18	10	9ug	4.7uM	-	12M	200cGy
9	ABE+CD33g17+CD123g18	10	9ug	4.7uM	4.7uM	12M	200cGy
細胞総数						108M	
動物総数		76					

パイロットに含まれる試料

図 21B

【 図 2 1 A 】

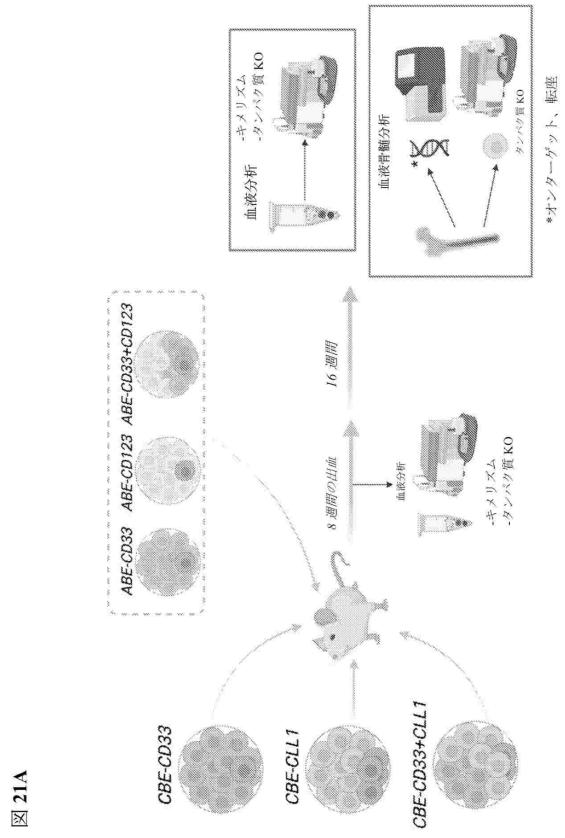


図 21A

【 図 2 2 A 】

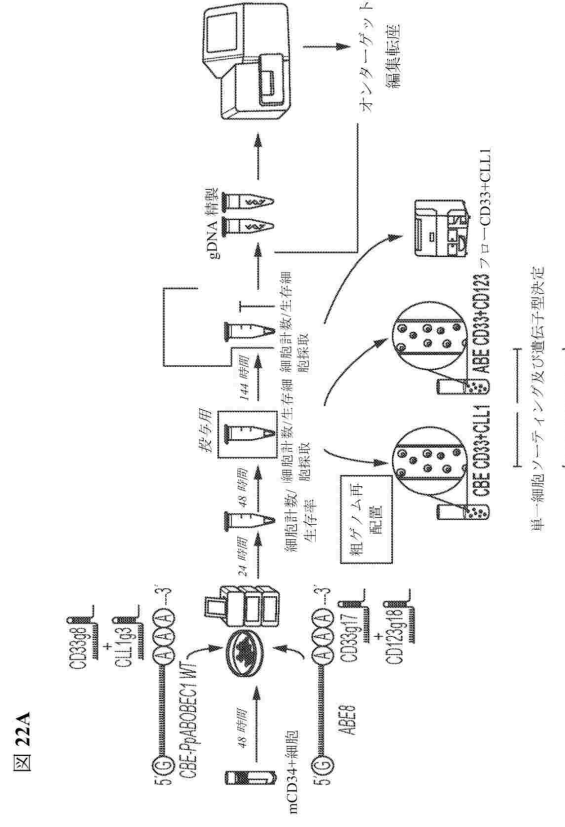


図 22A

【 図 2 2 B 】

塩基編集構築物	9ug の WT CBE-PpAPOBEC1 又は ABE 8.20mmRNA N1-メチル-シユ-ドウリ ジユ
ガイド	4.7nM の CD33g8、 CLL1g3、 CD33g17、 及び CD123g18
培地	StemSpan SFEM1
エレクトロポレーションプログラム	MaxCyte HSC3
エレクトロポレーションされた細胞数	条件当たり 12M
播種密度	条件当たり 12M
対照	12M モック EP(gRNA 又は BE なし)及び 5.5M EP なし(培養物のみ)
ドナー	HemaCare CD34+ D327846

図 22B

【 図 2 3 B 】

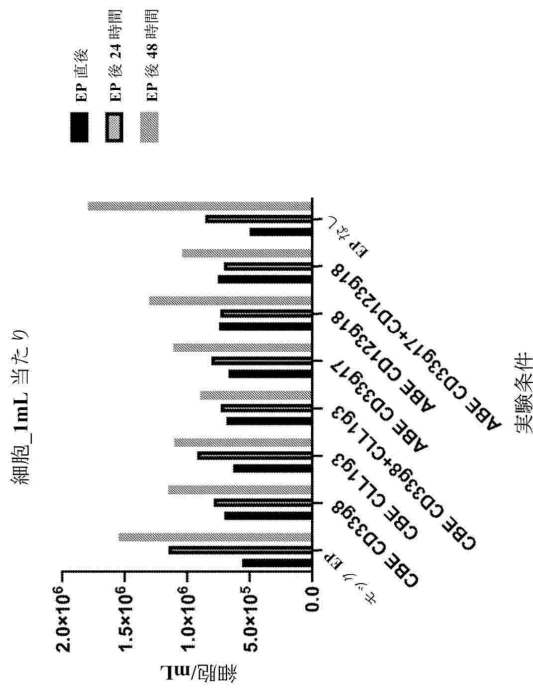


図 23B

【 図 2 3 A 】

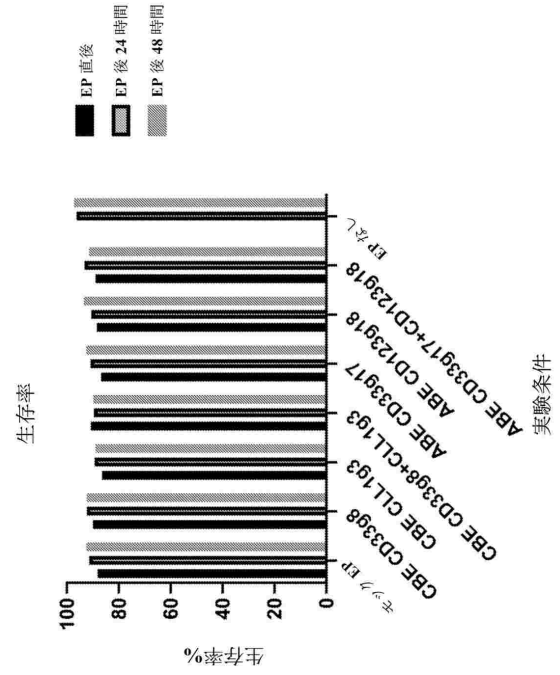


図 23A

【 図 2 4 A 】

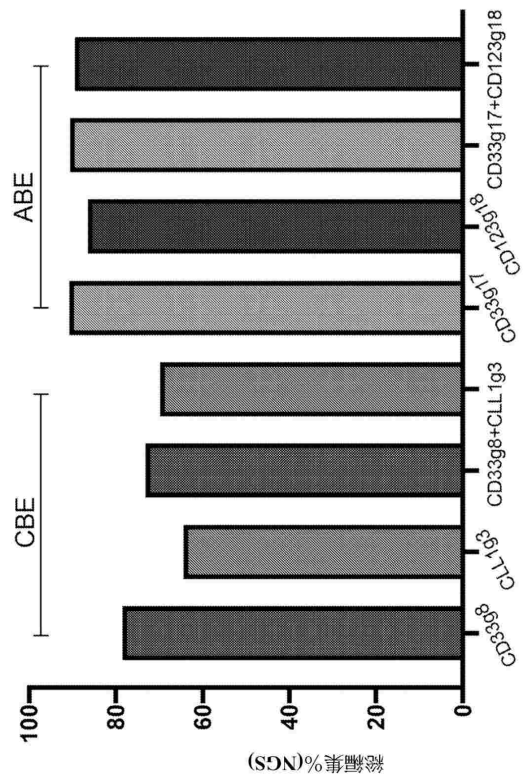


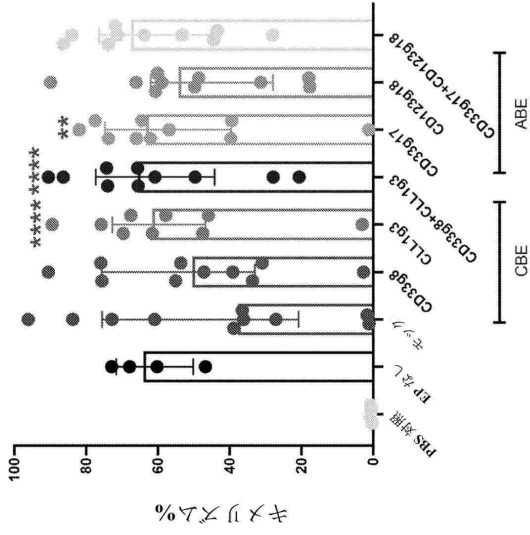
図 24A

【 27 】

キメラズンは以下のように計算される。

$$\frac{\%hCD45^+}{(\%hCD45^+) + (\%mCD45^+)}$$

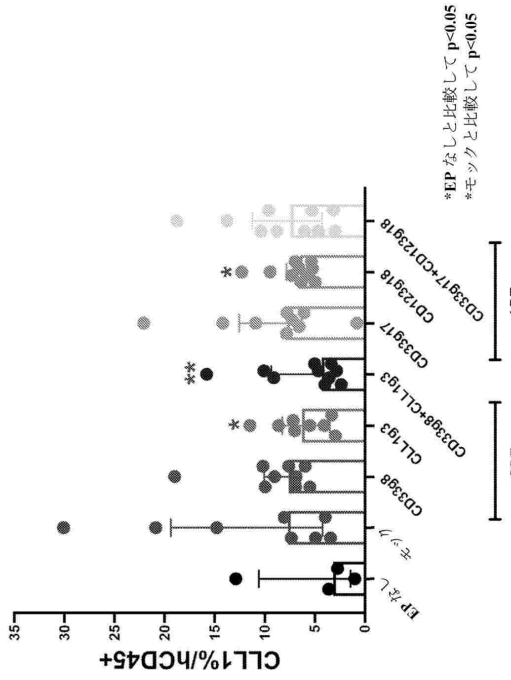
骨髄



27

【 28 B 】

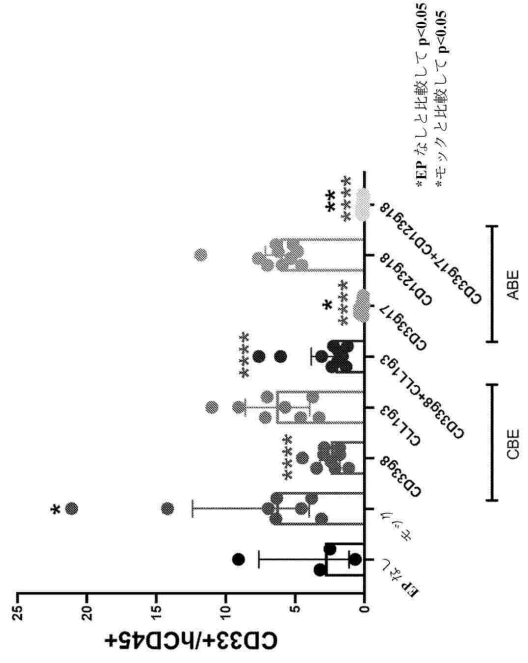
CLL1



28B

【 28 A 】

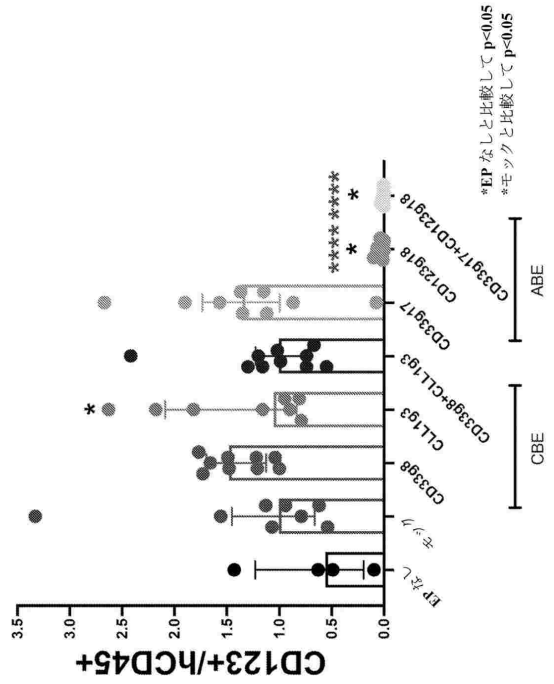
CD33



28A

【 28 C 】

CD123



28C

10

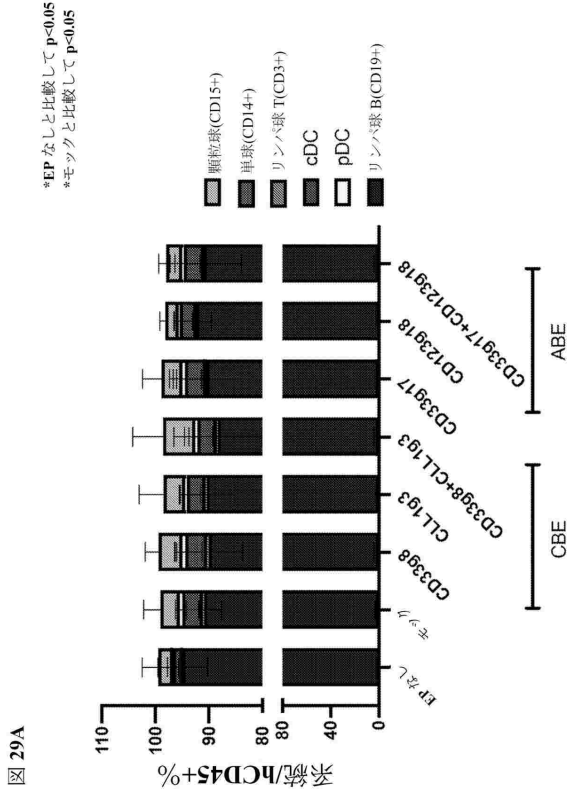
20

30

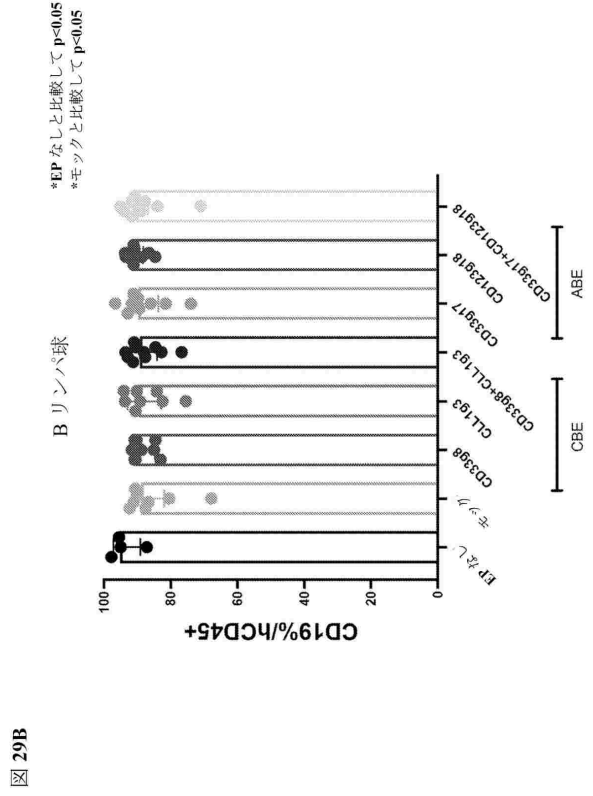
40

50

【 29 A 】



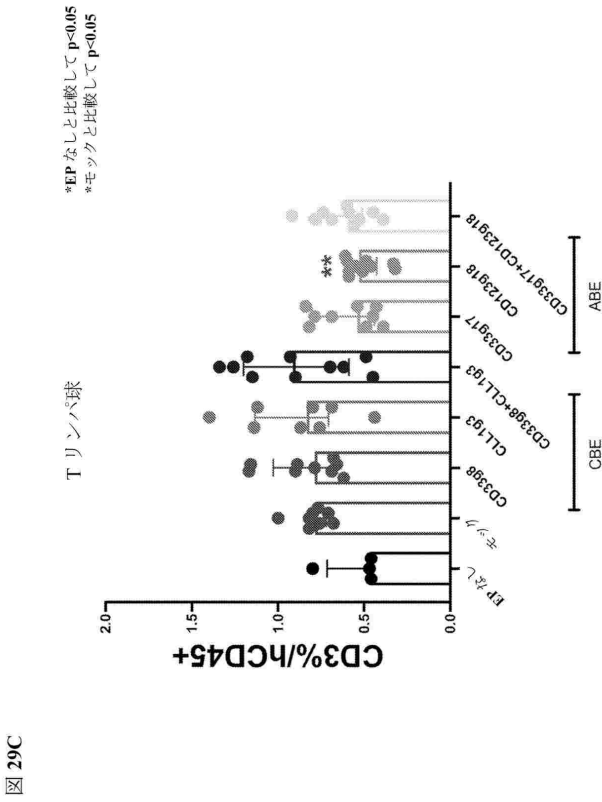
【 29 B 】



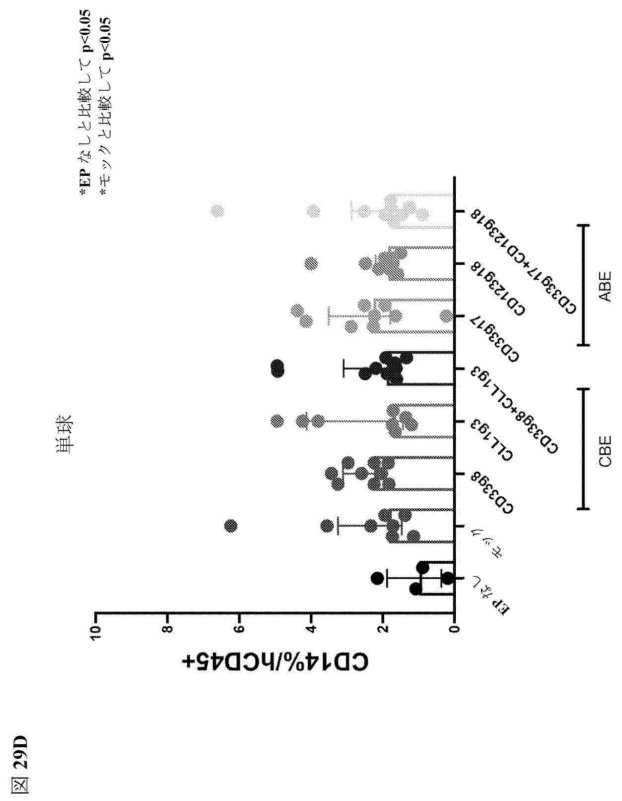
10

20

【 29 C 】



【 29 D 】



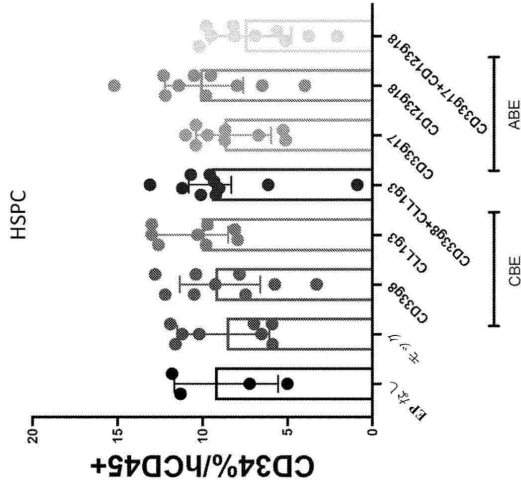
30

40

50

【 29E 】

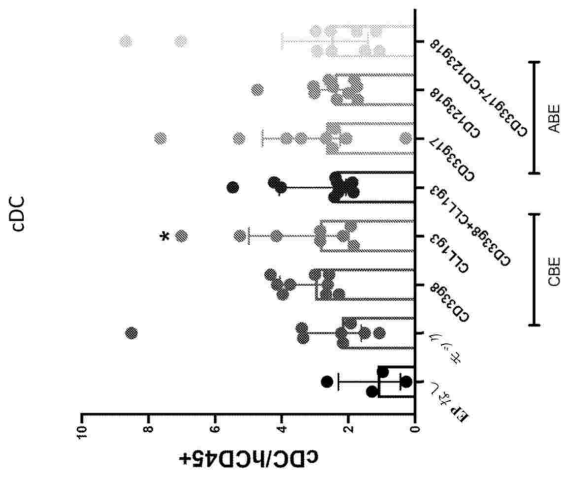
*EPなしと比較して p<0.05
*モックと比較して p<0.05



29E

【 29G 】

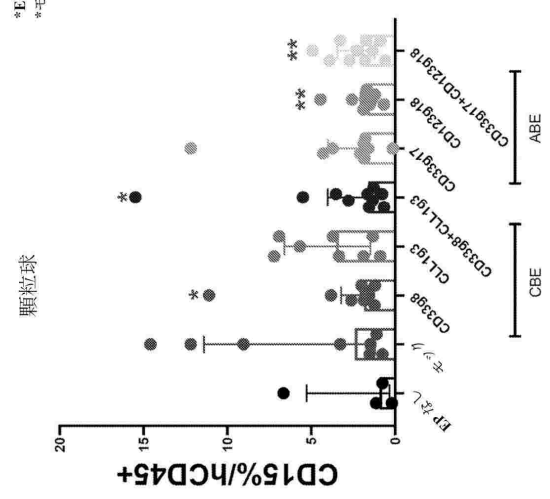
*EPなしと比較して p<0.05
*モックと比較して p<0.05



29G

【 29F 】

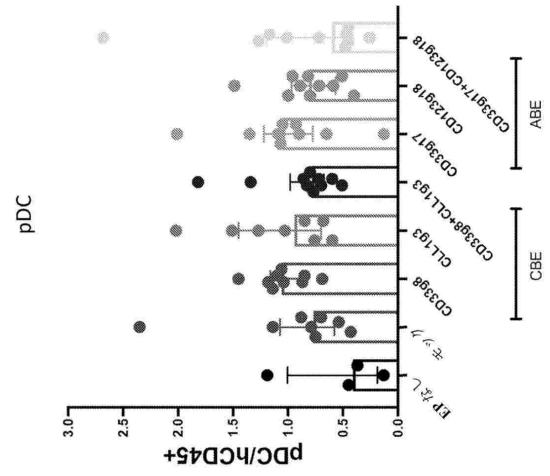
*EPなしと比較して p<0.05
*モックと比較して p<0.05



29F

【 H 6 】

*EPなしと比較して p<0.05
*モックと比較して p<0.05



29H

10

20

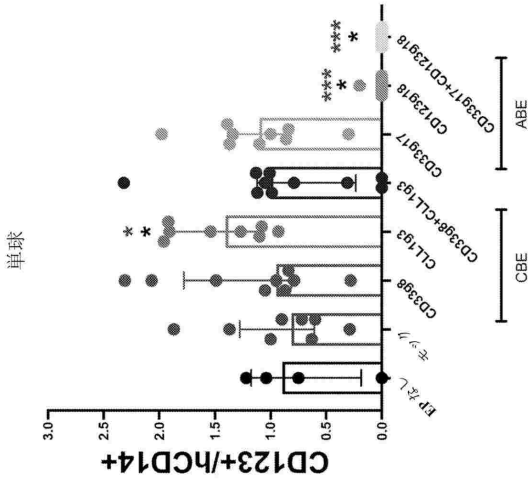
30

40

50

【 30A 】

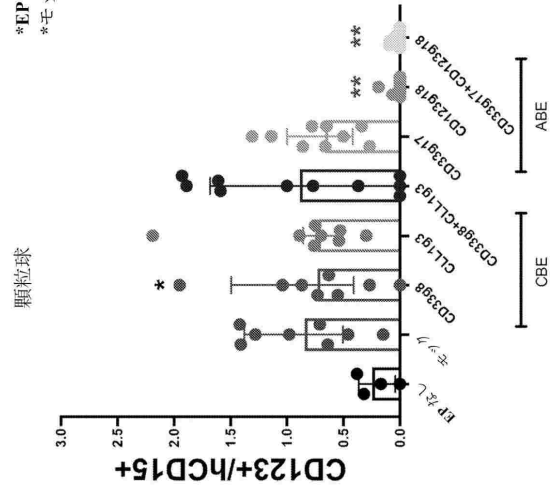
*EPなしと比較して p<0.05
*モックと比較して p<0.05



30A

【 30B 】

*EPなしと比較して p<0.05
*モックと比較して p<0.05



30B

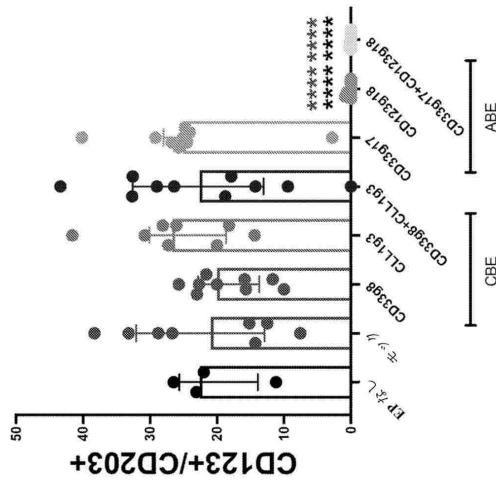
10

20

【 30C 】

*EPなしと比較して p<0.05
*モックと比較して p<0.05

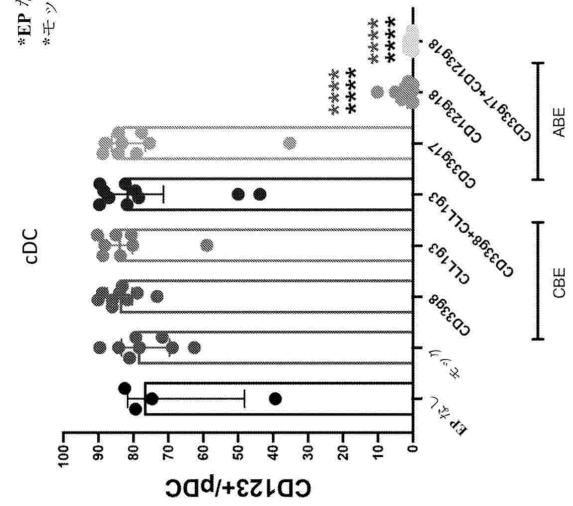
マスト/好塩基球



30C

【 30D 】

*EPなしと比較して p<0.05
*モックと比較して p<0.05



30D

30

40

50

【 図 3 0 E 】

*EP なしと比較して $p < 0.05$
*モックと比較して $p < 0.05$

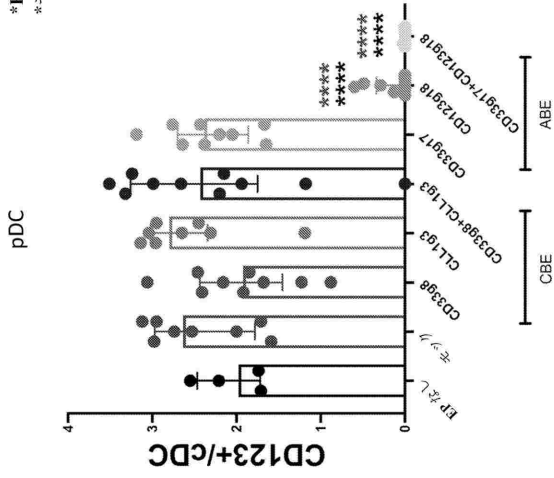


図 30E

【 図 3 1 A 】

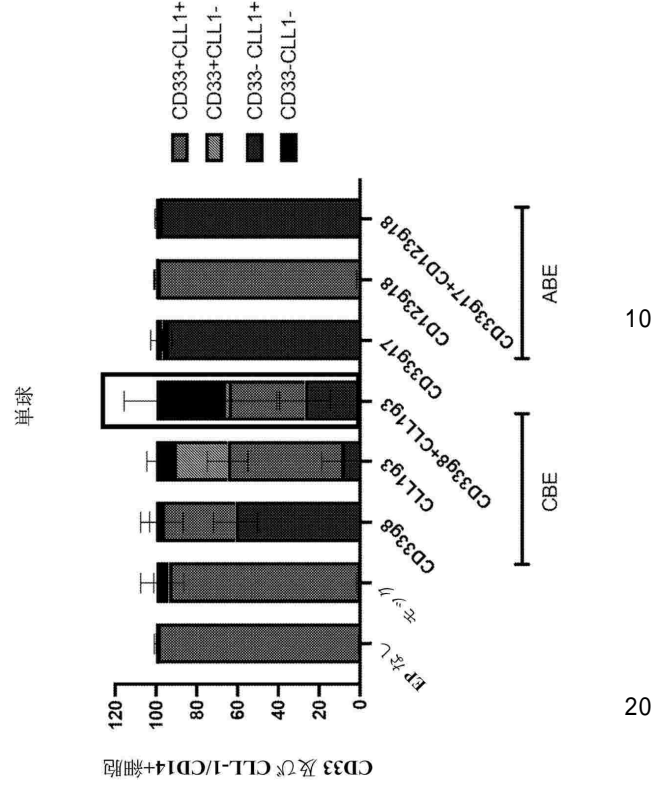


図 31A

【 図 3 1 B 】

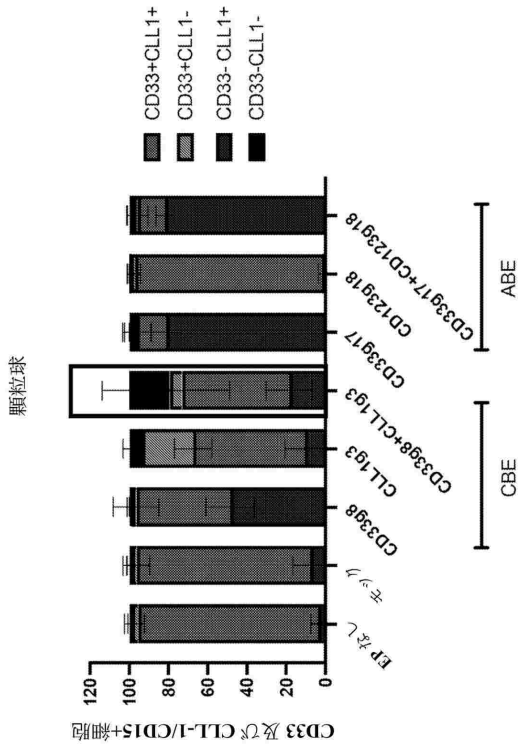


図 31B

【 図 3 1 C 】

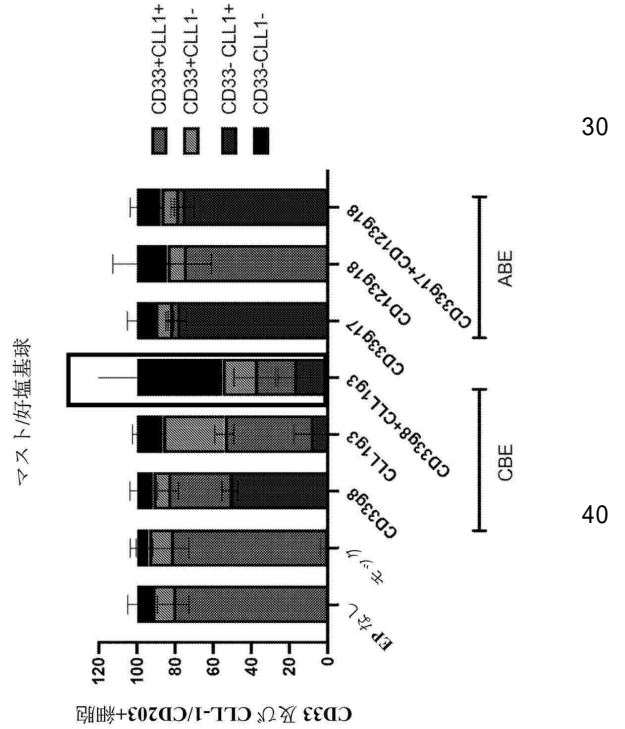


図 31C

10

20

30

40

50

【 3 1 D 】

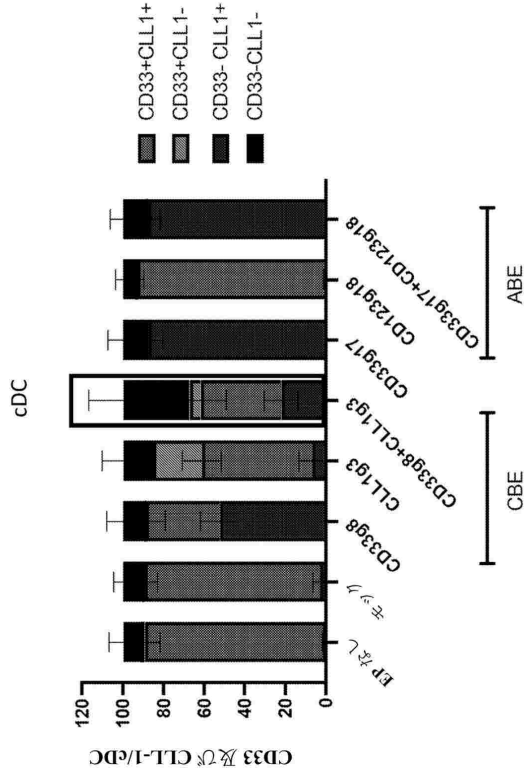


図 31D

【 3 1 E 】

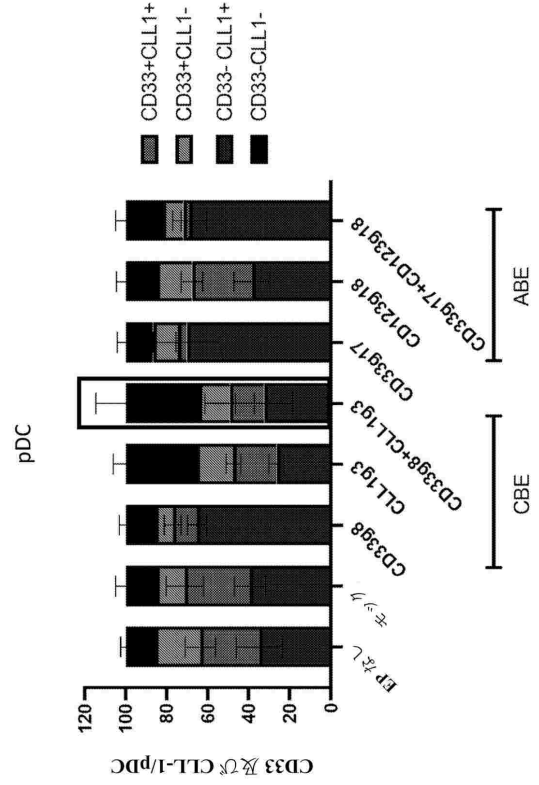


図 31E

10

20

【 3 2 】

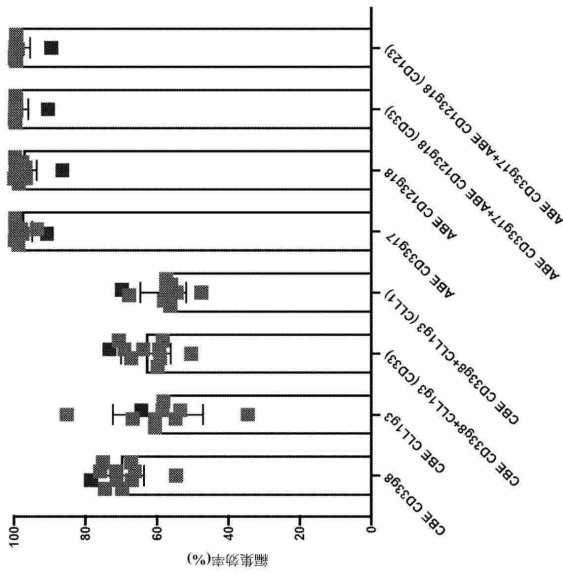


図 32

ABE 誘導性編集の富化
CBE 誘導性編集でのわずかな減少

【 3 3 】

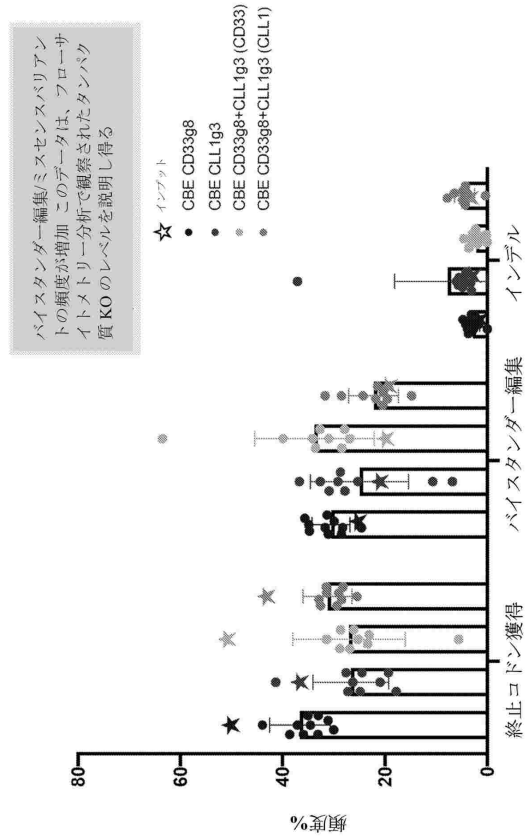


図 33

バイスタンダー編集/ミスセンスバリアントの頻度が増加。このデータは、フローサイトメトリ分析で観察されたタンパク質 KO のレベルを説明し得る

30

40

50

【 図 3 4 】

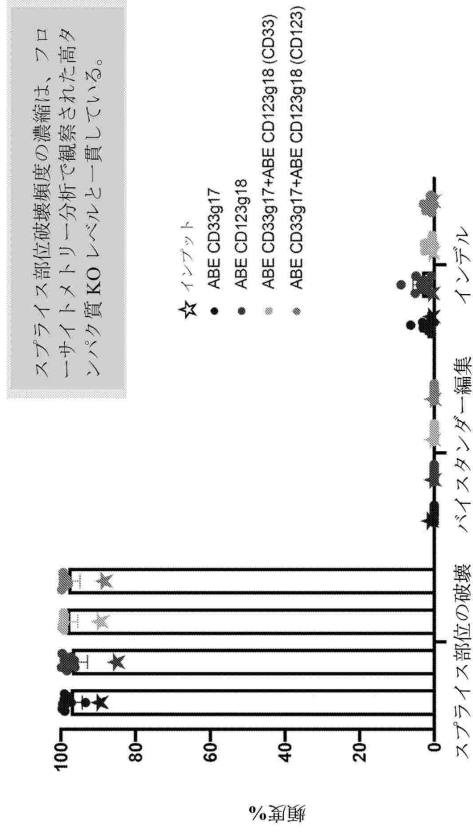


図 34

【 図 3 5 】

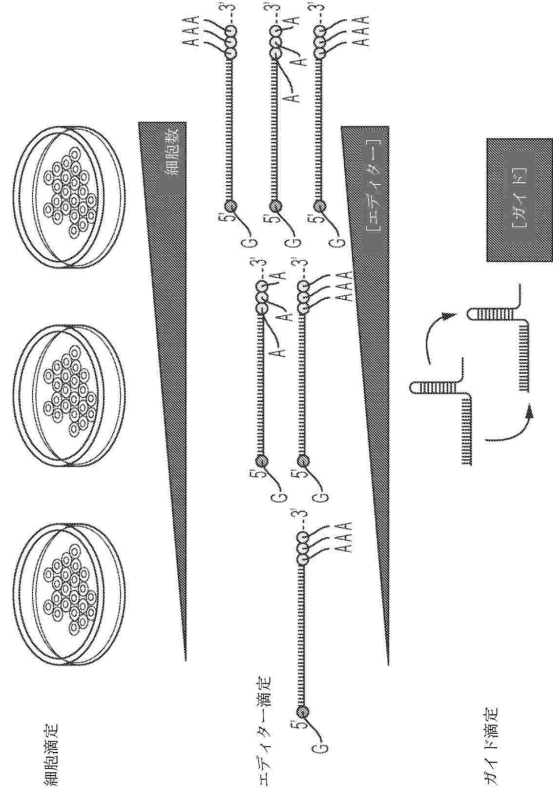


図 35

【 図 3 6 】

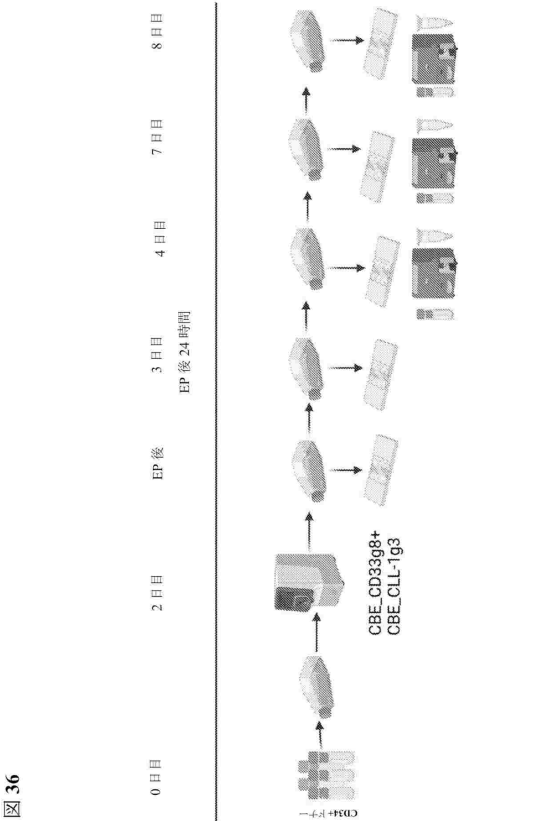


図 36

【 図 3 7 】

用量スケールアップ #1	実験条件	CBE (uL)	sgRNA1 (uL)	sgRNA2 (uL)	P3 細胞液	細胞数(M)	総 Run 体積 (ul)
	CBE CD33g8+CLL1g3 (12M 1.5X)	3.42	3.18 (sg8)	4.2 (sg3)	-0.8	12	100
		12ug	7.05uM	7.05uM			
用量スケールアップ #2	実験条件	CBE (uL)	CD33 sgRNA (uL)	CLL1 sgRNA (uL)	Maxcyte 細胞液	細胞数(M)	総 Run 体積(ul)
1	CBE CD33g8+CLL1g3 (12M OG)	2.28 (9ug)	1.05 (4.7uM)	1.82 (4.7uM)	4.85	12	100
2	CBE CD33g8+CLL1g3 (12M 2X)	4.56 (18ug)	2.11 (9.4uM)	3.64 (9.4uM)	-0.31	12	100
3	CBE CD33g8+CLL1g3 (6M OG)	2.28 (9ug)	1.05 (4.7uM)	1.82 (4.7uM)	4.85	6	100
4	CBE CD33g8+CLL1g3 (6M 2X)	4.56 (18ug)	2.11 (9.4uM)	3.64 (9.4uM)	-0.31	6	100
5	モック EP	0	0	0	10	6	100
6	EP なし						

図 37

- CBE は Viiss042 と同じロットとなる
- Maxcyte プログラム:HSC3

CD34+CC ドナーの調査	細胞/スライアル数	バイアル数
CD34 SD01000362*	10M	5

*このドナーはスケールアップ#1で使用

【 図 3 8 A 】

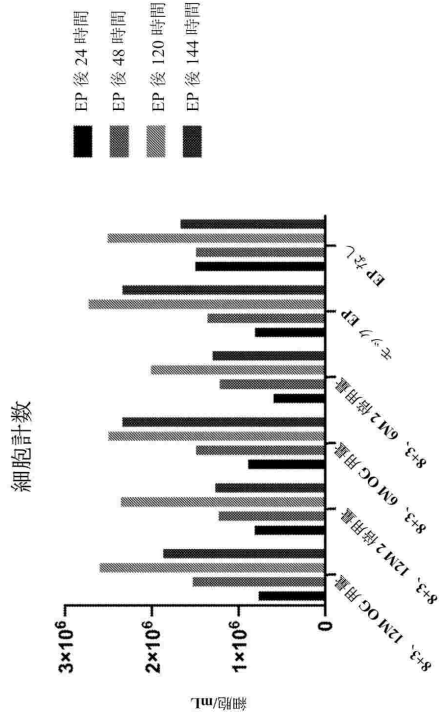


図 38A

【 図 3 8 B 】

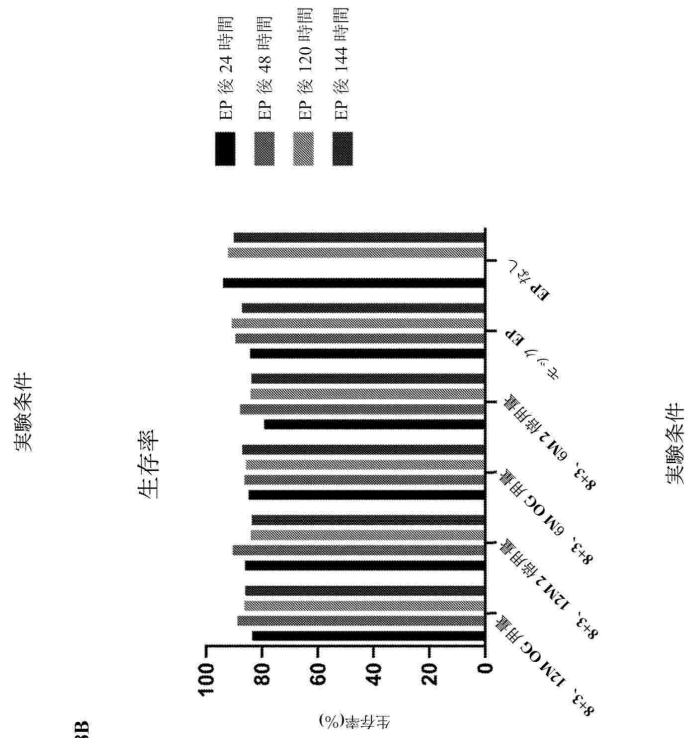


図 38B

【 図 3 9 】

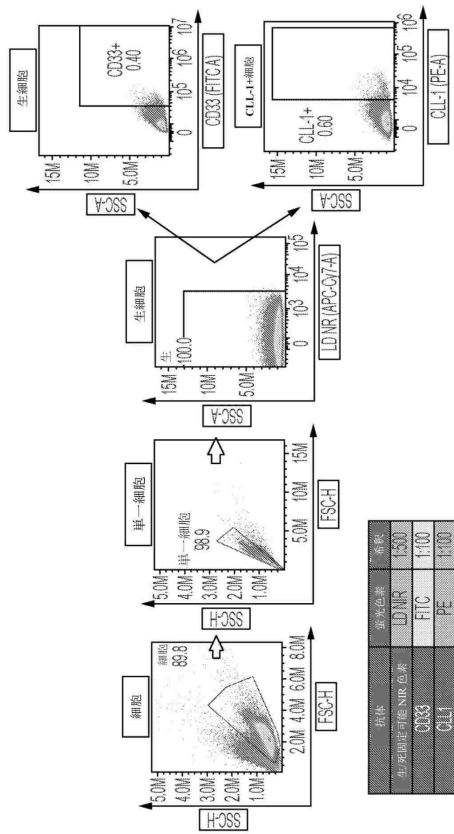


図 39

【 図 4 0 A 】

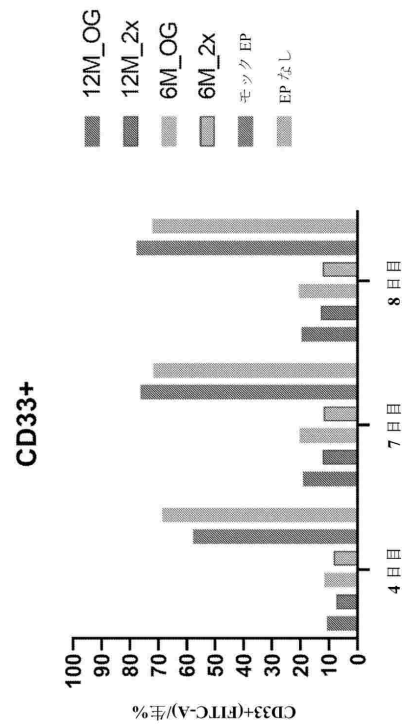


図 40A

*n=1 CD34+ドナー

10

20

30

40

50

【 図 4 0 B 】

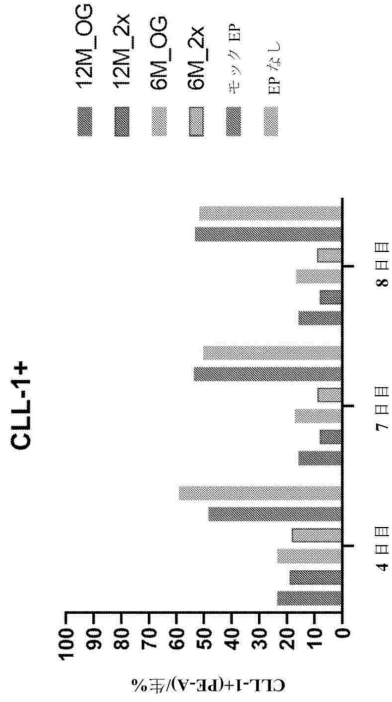


図 40B

【 図 4 1 】

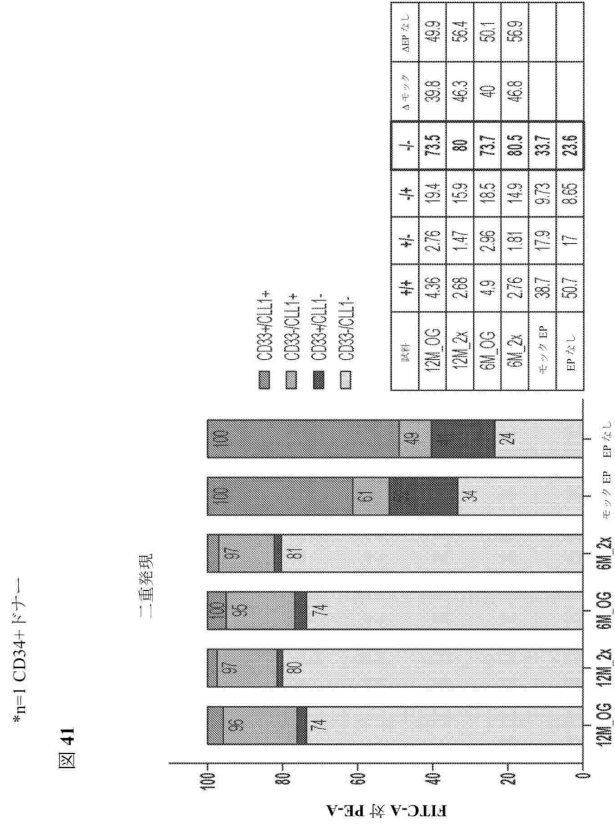


図 41

【 図 4 2 】

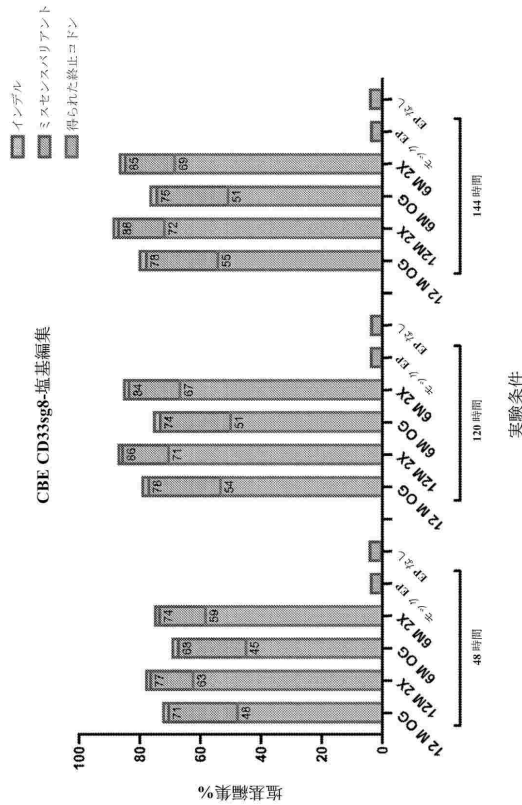


図 42

【 図 4 3 】

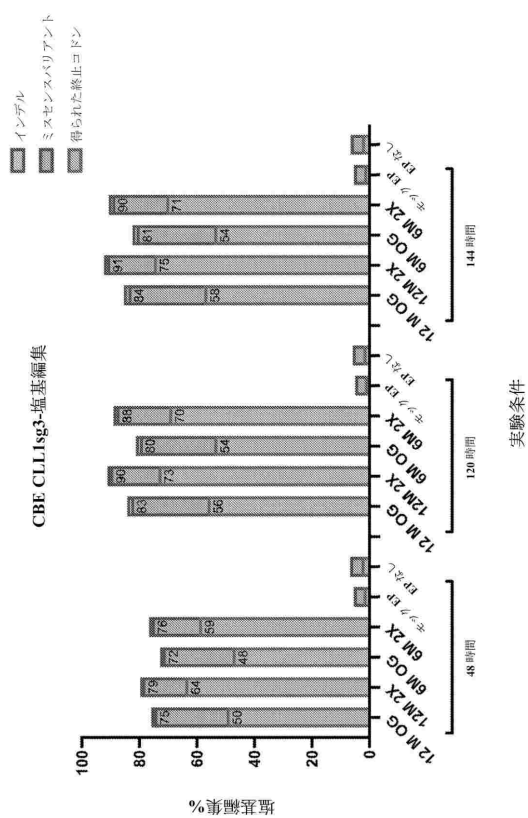


図 43

10

20

30

40

50

【 図 4 4 】

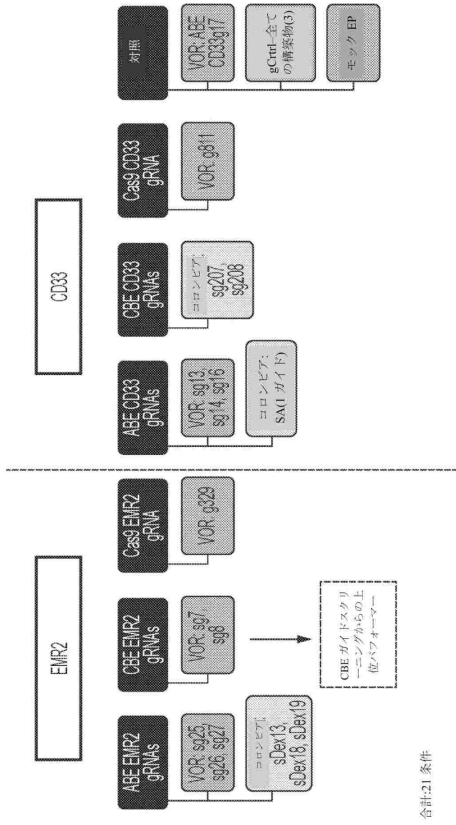


図 44

【 図 4 6 】

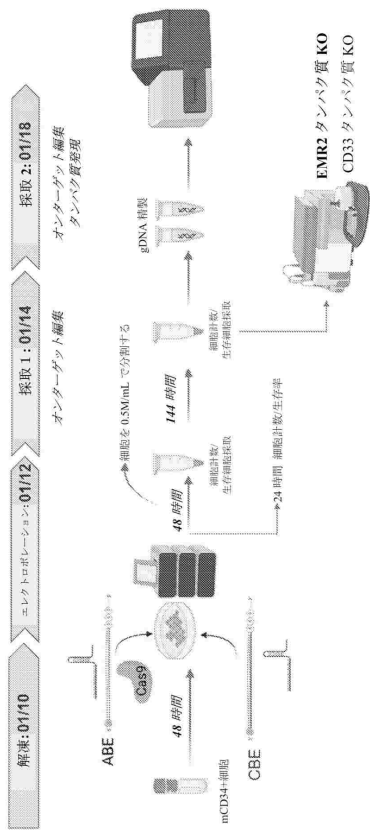


図 46

【 図 4 5 】

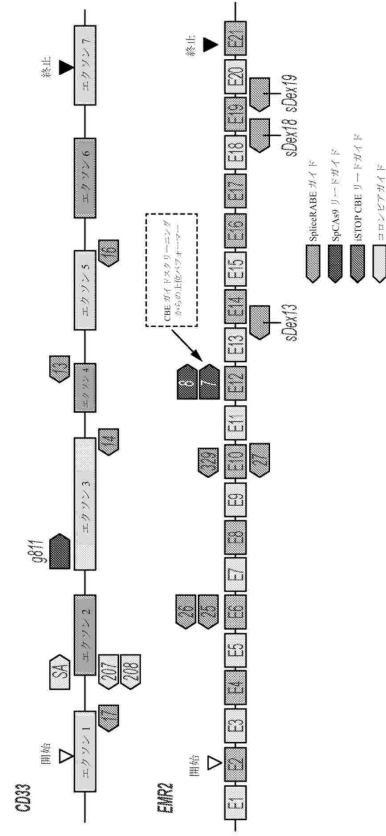


図 45

【 図 4 7 A 】

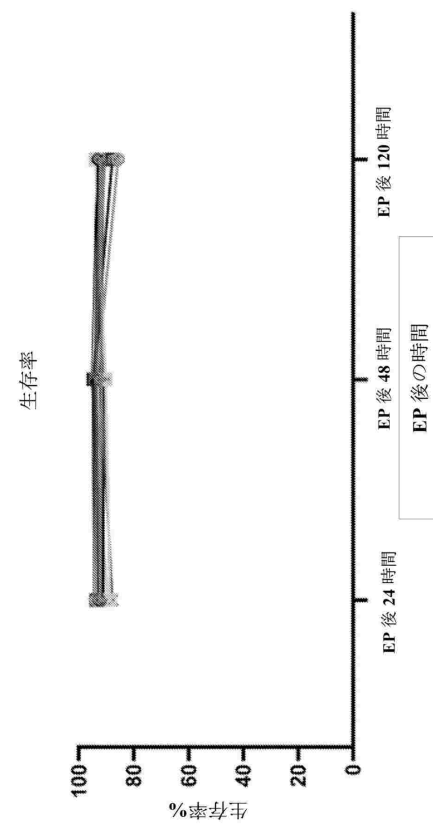


図 47A

10

20

30

40

50

【 図 4 7 B 】

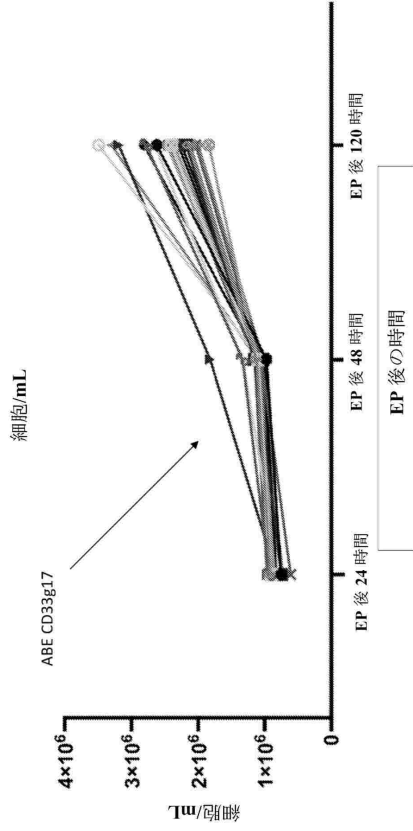


図 47B

【 図 4 8 B 】

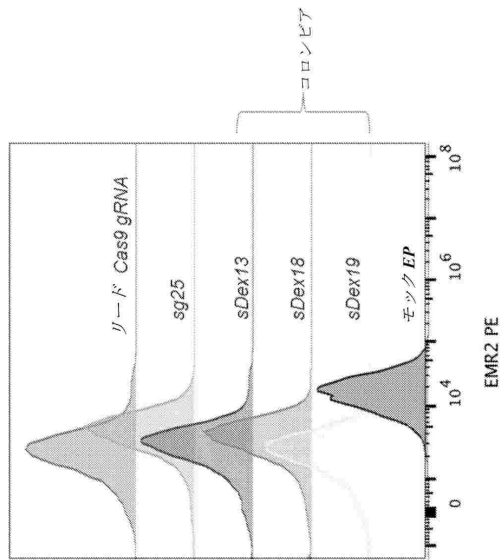


図 48B

*100%モック EP に正規化

図 49A

【 図 4 9 A 】

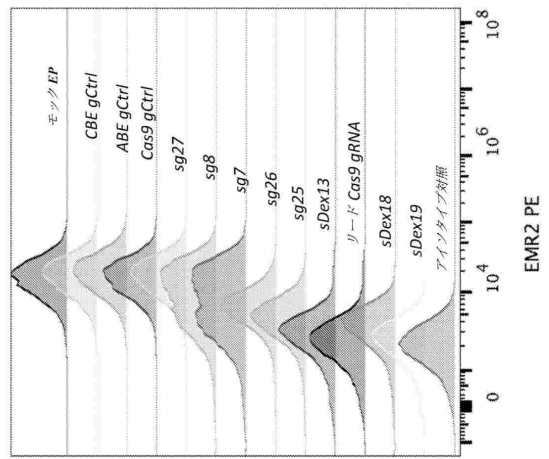
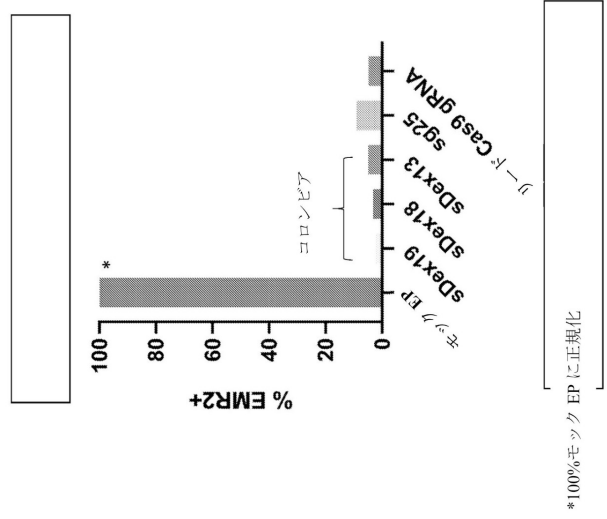


図 48A

【 図 4 8 A 】



10

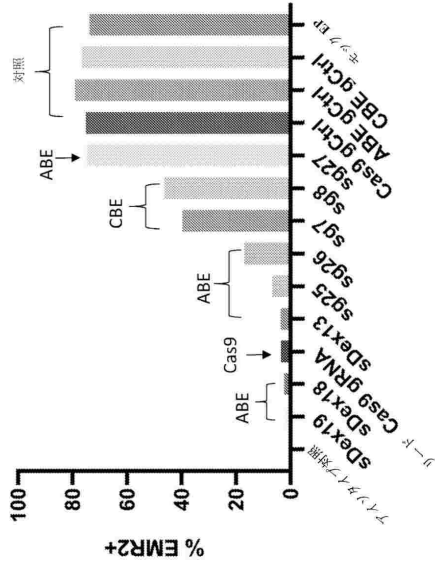
20

30

40

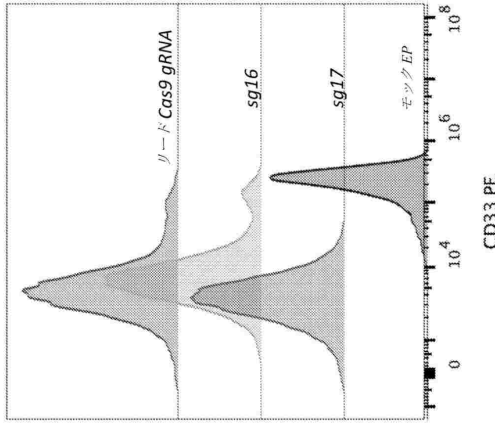
50

【 49 B 】



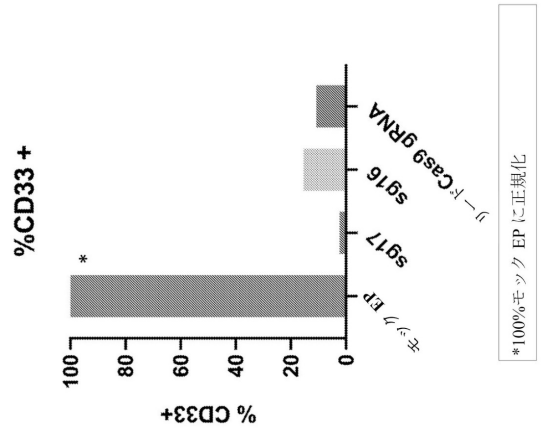
49B

【 50 B 】



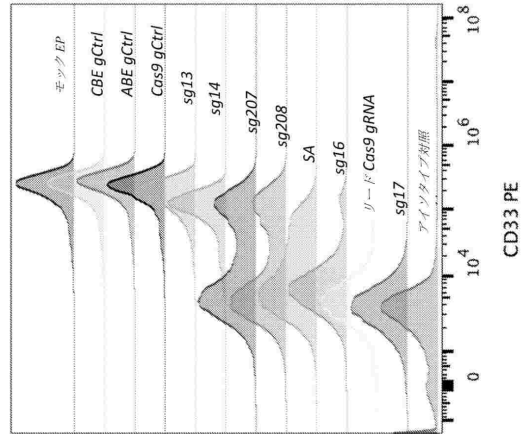
50B

【 50 A 】



50A

【 51 A 】



51A

10

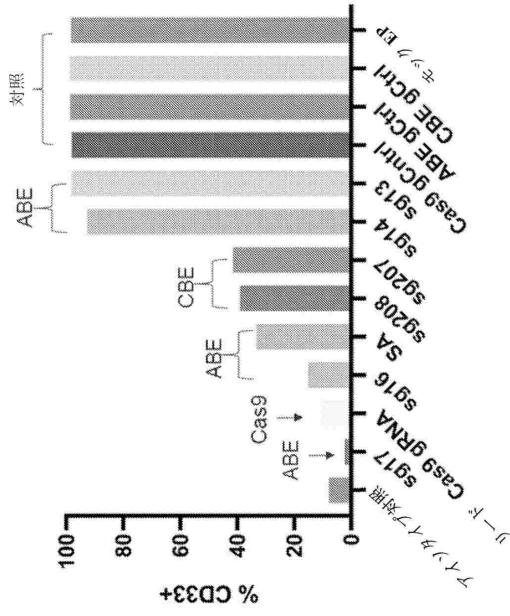
20

30

40

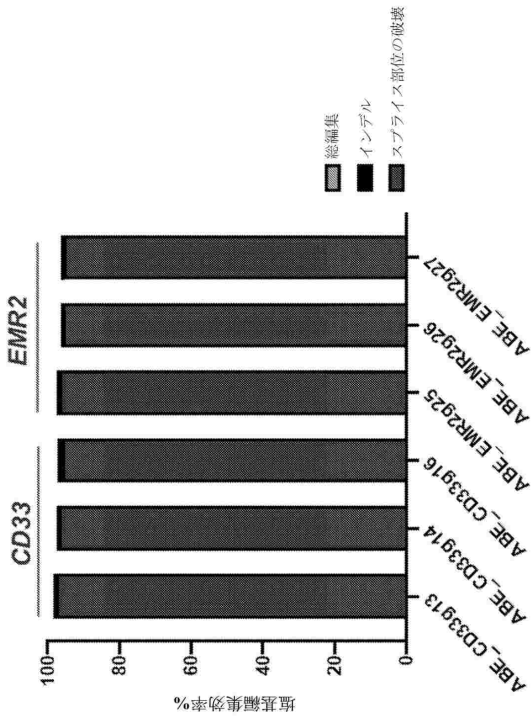
50

【 5 1 B 】



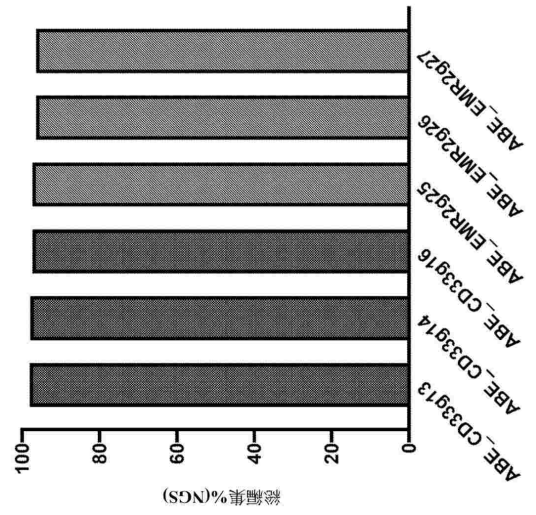
51B

【 5 2 B 】



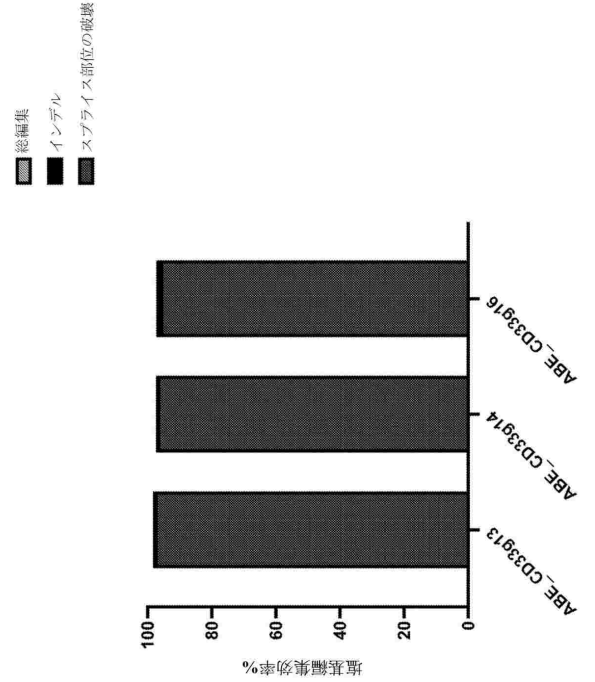
52B

【 5 2 A 】



52A

【 5 3 】



53

10

20

30

40

50

【 図 5 4 】

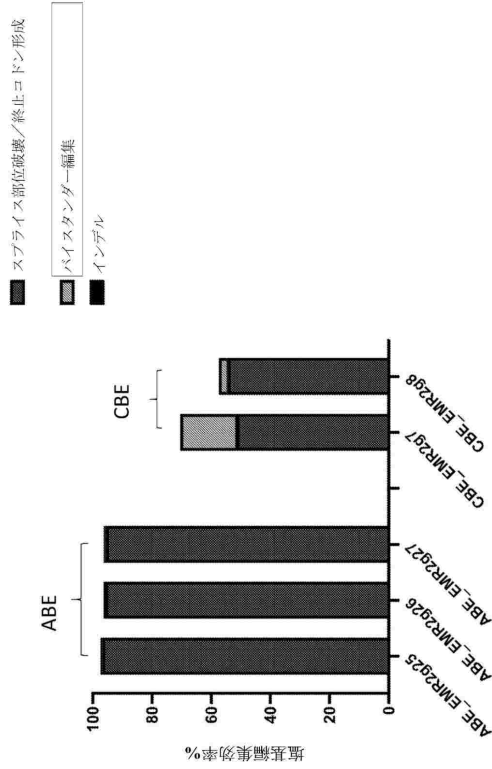


図 54

【 図 5 6 】

hCD34+ ドナー: RD01000137

条件	エディター	gRNA 1 (4.7 μM)	gRNA 2 (4.7 μM)	EP プログラム	エレクトロポレーションされた細胞の量
エレクトロポレーションなし	N/A	N/A	N/A	N/A	8e5
モックエレクトロポレーション	N/A	N/A	N/A	CA-137	8e5
ABE ガイド参照	ABE mRNA (9 ug)	Synthego ガイド参照	N/A	CA-137	8e5
ABE EMR2 g25	ABE mRNA (9 ug)	Vor EMR2 g25	N/A	CA-137	8e5
ABE EMR2 sDex19	ABE mRNA (9 ug)	Columbia EMR2 sDex19	N/A	CA-137	8e5
ABE CD33 g16	ABE mRNA (9 ug)	Vor CD33 g16	N/A	CA-137	8e5
ABE CD33 g17	ABE mRNA (9 ug)	Vor CD33 g17	N/A	CA-137	8e5
ABE EMR2 g25 + CD33 g16	ABE mRNA (9 ug)	Vor EMR2 g25	Vor CD33 g16	CA-137	8e5
ABE EMR2 g25 + CD33 g17	ABE mRNA (9 ug)	Vor EMR2 g25	Vor CD33 g17	CA-137	8e5
ABE EMR2 sDex19 + CD33 g16	ABE mRNA (9 ug)	Columbia EMR2 sDex19	Vor CD33 g16	CA-137	8e5
ABE EMR2 sDex19 + CD33 g17	ABE mRNA (9 ug)	Columbia EMR2 sDex19	Vor CD33 g17	CA-137	8e5

図 56

【 図 5 5 】

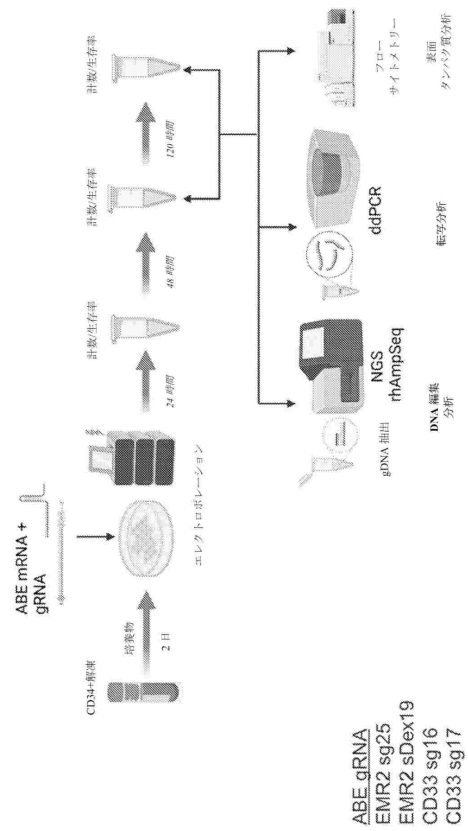


図 55

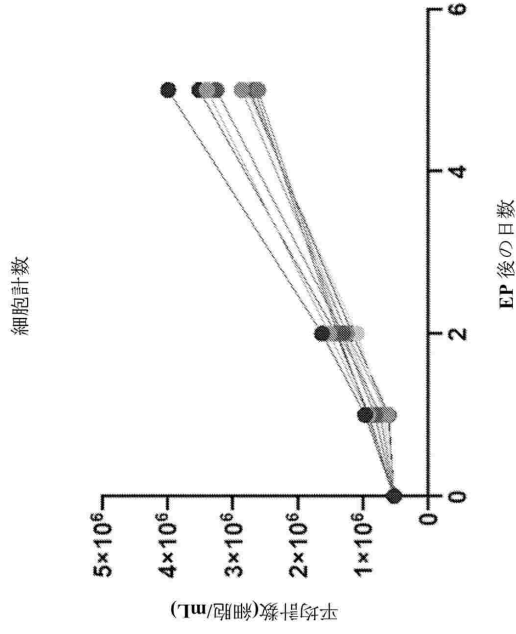
【 図 5 7 】

ABE ガイド	配列	PAM	ミスマッチ
EMR2 ABE sg25	CCTCTACCTGTGCAGAGCTT	CGG	CD97 を有する 1/20
EMR2 ABE sDex19	GTGGTACCTGCTGGCTGAGG	AGG	CD97 を有する 9/20
CD33 ABE sg16	ATGCTCACATGAAGAAGATG	AGG	
CD33 ABE sg17	CACTCACCTGCCACAGCAG	GGG	20/20 Siglec-6

図 57

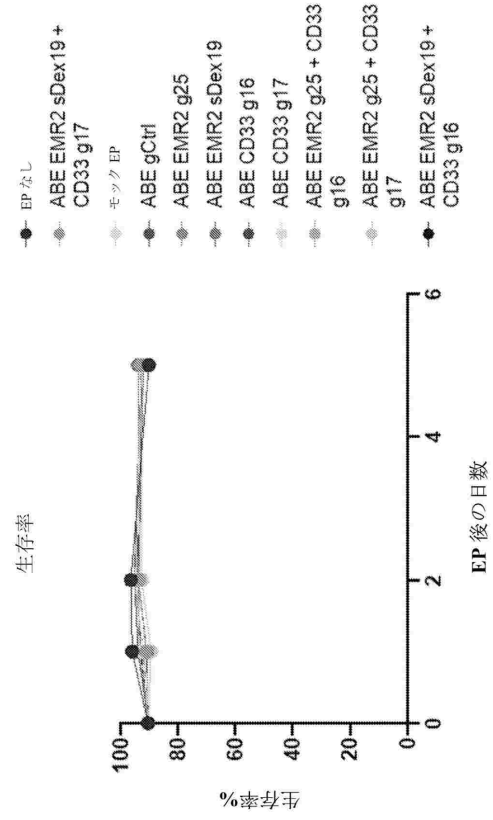
【 図 5 8 A 】

図 58A



【 図 5 8 B 】

図 58B

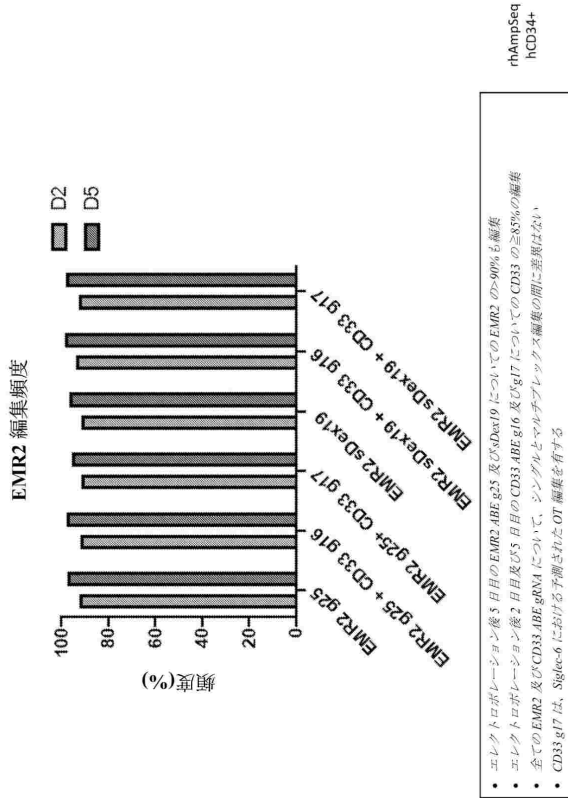


10

20

【 図 5 9 A 】

図 59A

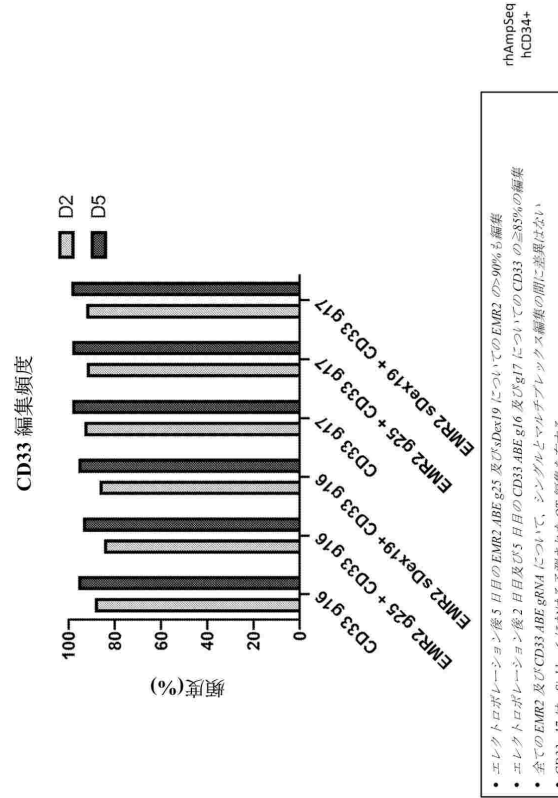


30

40

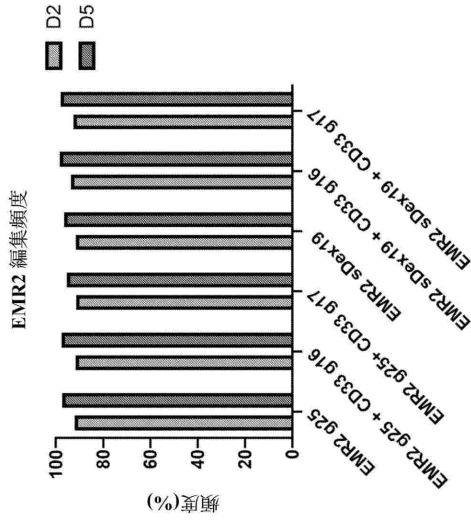
【 図 5 9 B 】

図 59B



50

【 図 6 0 A 】

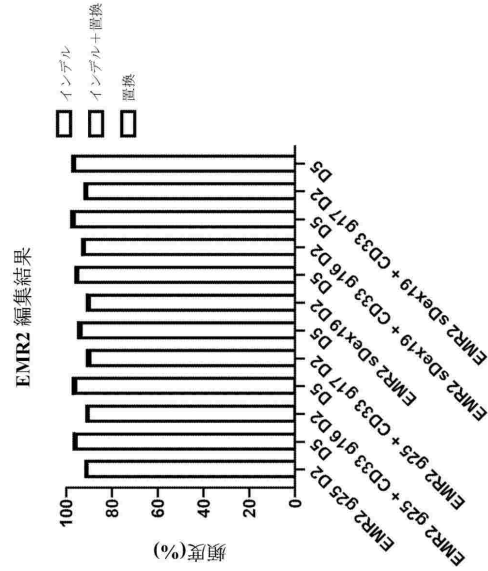


ABE gRNA g25 及び hDex19 を用いた EMIR2 編集は、スプライス部位の破壊につながる A>G 置換の大部分を引き起こす

rhAmpSeq
hCD34+

図 60A

【 図 6 0 B 】

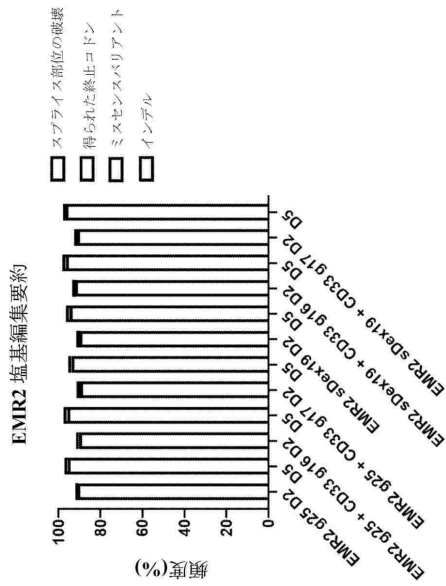


ABE gRNA g25 及び hDex19 を用いた EMIR2 編集は、スプライス部位の破壊につながる A>G 置換の大部分を引き起こす

rhAmpSeq
hCD34+

図 60B

【 図 6 0 C 】



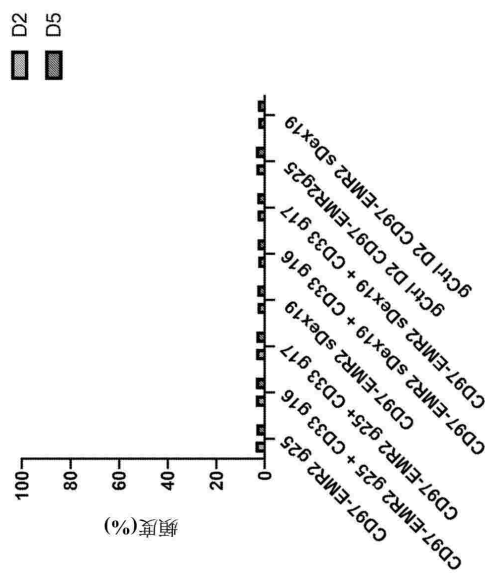
ABE gRNA g25 及び hDex19 を用いた EMIR2 編集は、スプライス部位の破壊につながる A>G 置換の大部分を引き起こす

rhAmpSeq
hCD34+

図 60C

【 図 6 1 A 】

CD97 における EMIR2 オプターゲット編集



CD97 修飾前線における EMIR2 ABE gRNA の有意なオプターゲット編集はない

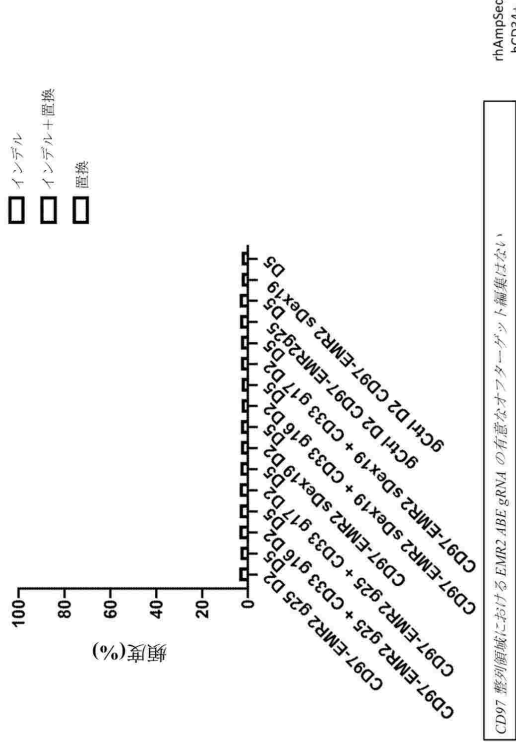
rhAmpSeq
hCD34+

図 61A

【 図 6 1 B 】

図 61B

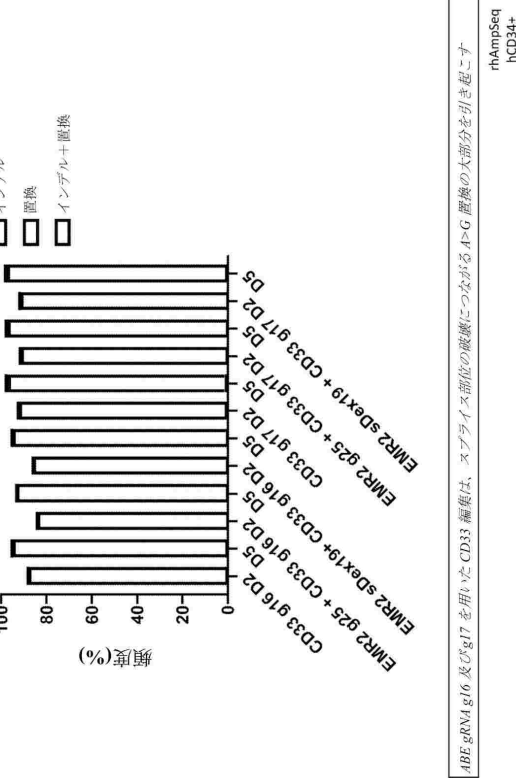
CD97 における EMR2 OT 編集の結果



【 図 6 2 B 】

図 62B

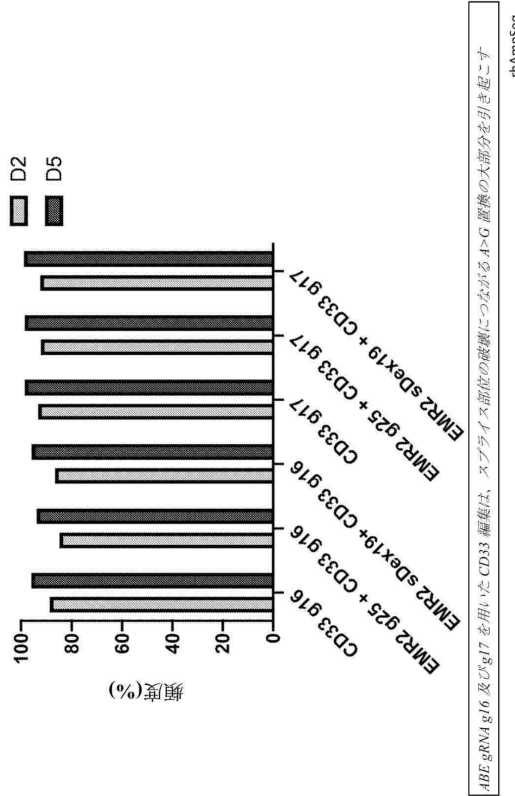
CD33 編集結果



【 図 6 2 A 】

図 62A

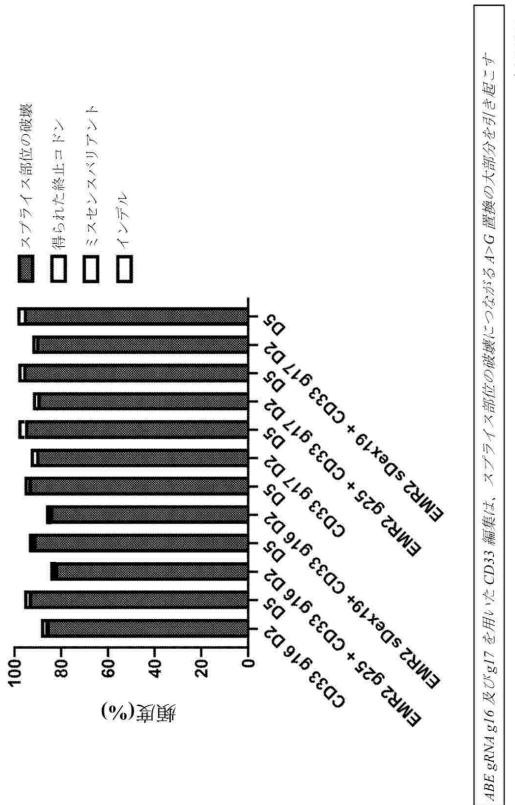
CD33 編集頻度



【 図 6 2 C 】

図 62C

CD33 塩基編集結果



【 図 6 3 】

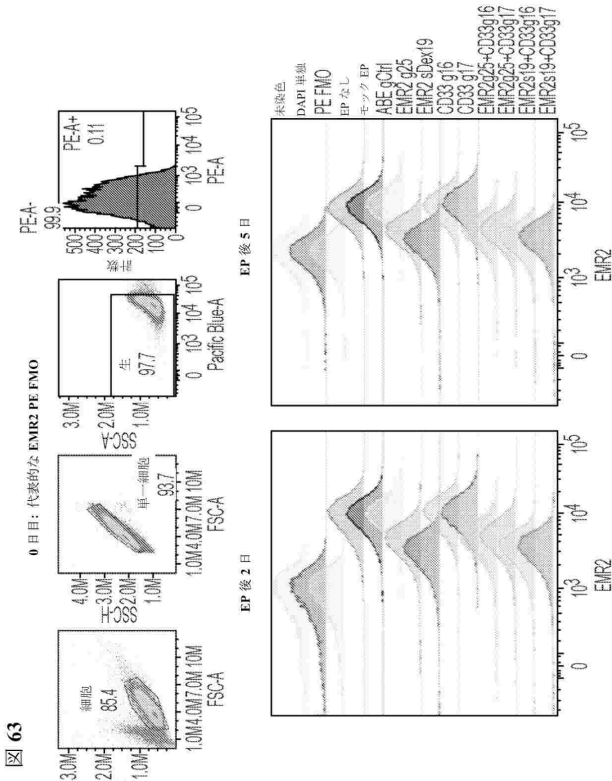


図 63

【 図 6 4 】

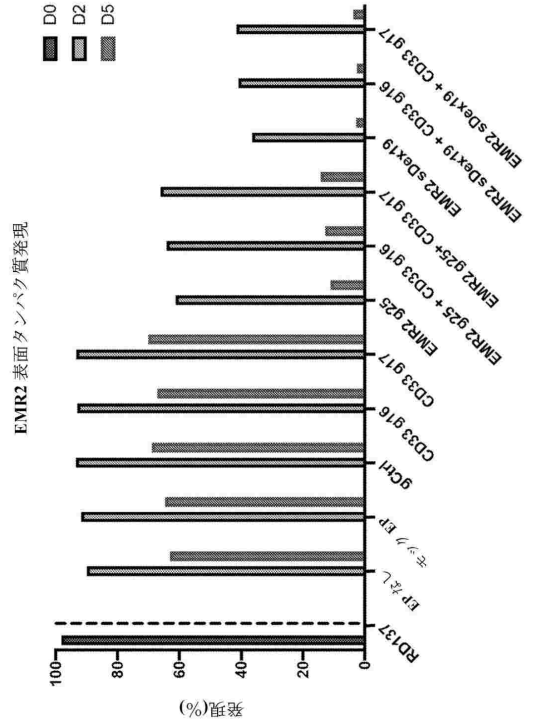


図 64

10

20

【 図 6 5 】

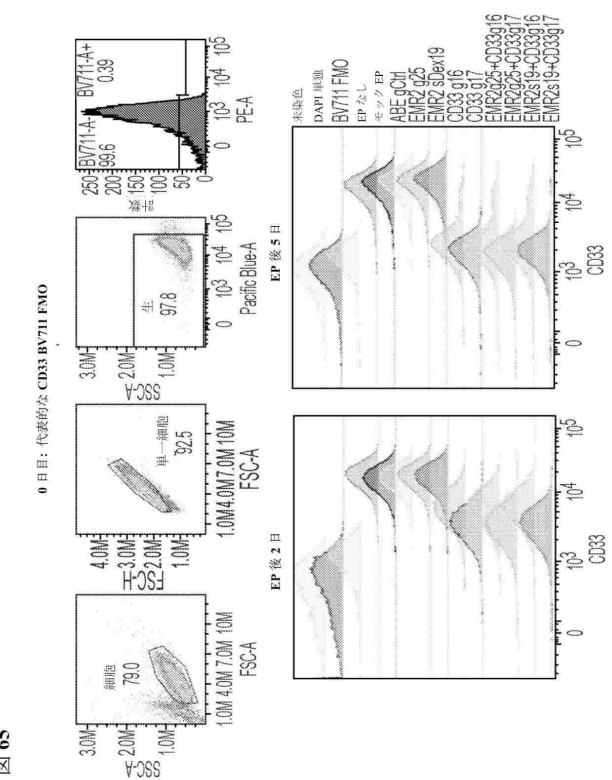


図 65

【 図 6 6 】

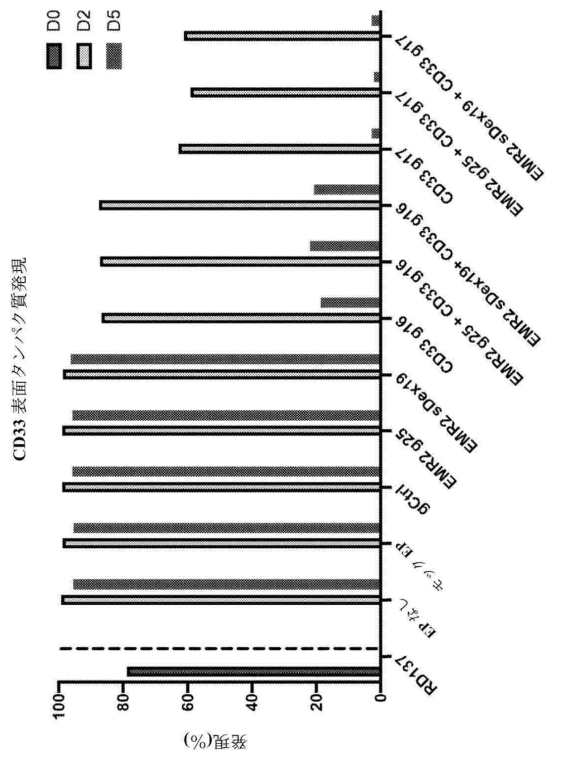


図 66

30

40

50

【 図 7 0 】

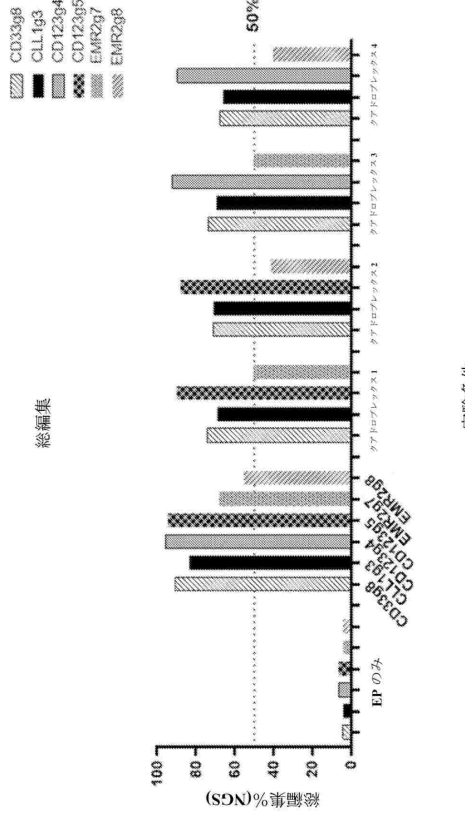


図 70

【 図 7 1 】

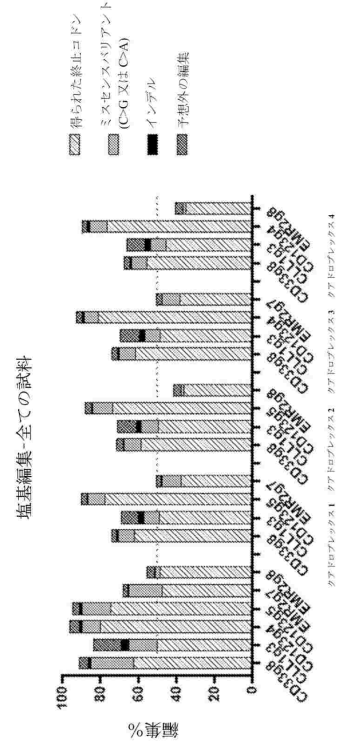


図 71

【 図 7 2 】

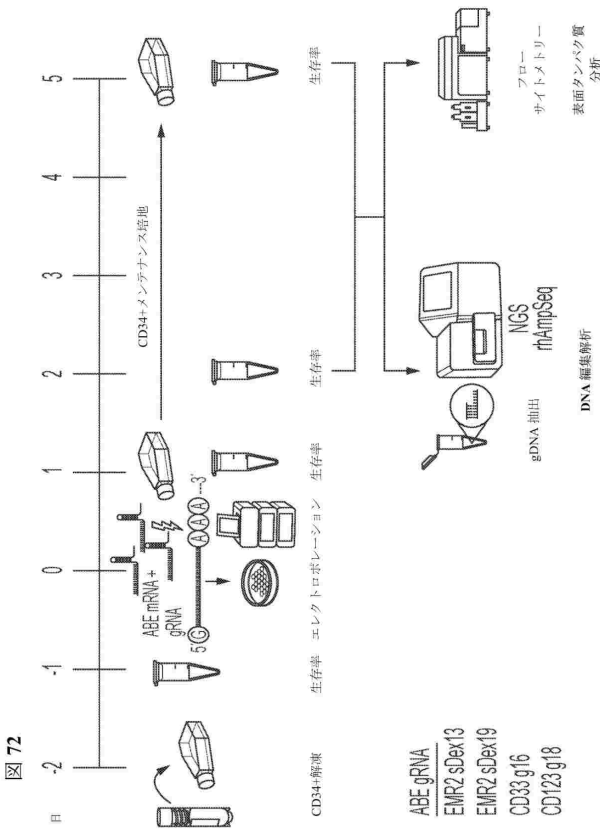


図 72

【 図 7 3 】

hCD34+ ドナー : SD01000362

条件	エディター	gRNA (4.7 uM)	EPプログラム	エレトロポレーションされた細胞の量
エレトロポレーションなし	N/A	N/A	N/A	1e6
モックエレトロポレーション	N/A	N/A	CA-137	1e6
ABE gRNA 対照	ABE mRNA (9 ug)	Synthego gRNA 対照	CA-137	1e6
ABE EMR2 sDex13	ABE mRNA (9 ug)	Columbia EMR2 sDex13	CA-137	1e6
ABE EMR2 sDex19	ABE mRNA (9 ug)	Columbia EMR2 sDex19	CA-137	1e6
ABE CD33 g16	ABE mRNA (9 ug)	Vor CD33 g16	CA-137	1e6
ABE CD123 g18	ABE mRNA (9 ug)	Vor CD123 g18	CA-137	1e6
トリプレックス1	ABE mRNA (9 ug)	EMR2 sDex13, CD33 g16, CD123 g18	CA-137	1e6
トリプレックス2	ABE mRNA (9 ug)	EMR2 sDex19, CD33 g16, CD123 g18	CA-137	1e6

図 73

10

20

30

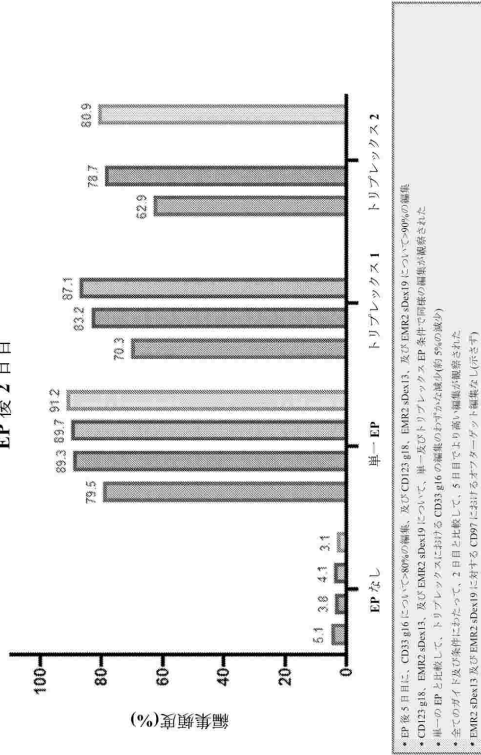
40

50

【 7 4 A 】

トリプレックス1= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
トリプレックス2= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

EP 後 2 日目



rhAmpSeq
hCD34+

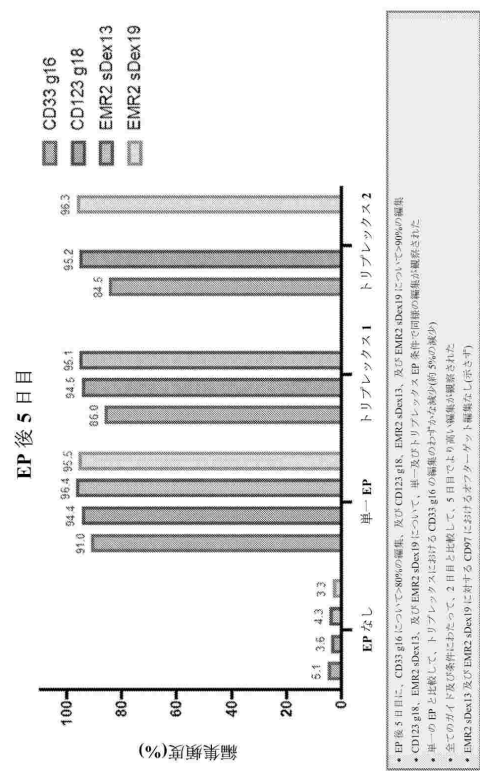
- EP 後 5 日目に、CD33 g16 について 80% の陽性、及び CD123 g18、EMR2 sDex13、及び EMR2 sDex19 について 90% の陽性
- CD123 g18、EMR2 sDex13、及び EMR2 sDex19 について、単一及びトリプレックス EP 条件で同様の陽性の陽性率を維持した
- 単一の EP と比較して、トリプレックスにおける CD33 g16 の陽性の割合は相対的に減少した
- 全ての遺伝子及び条件において、2 日目と比較して、5 日目でより高い陽性率を維持した
- EMR2 sDex13 及び EMR2 sDex19 における CD33 g16 に対する CD33 g16 に対する CD33 g16 陽性率を維持した (示す)

74A

【 7 4 B 】

トリプレックス1= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
トリプレックス2= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

EP 後 5 日目



rhAmpSeq
hCD34+

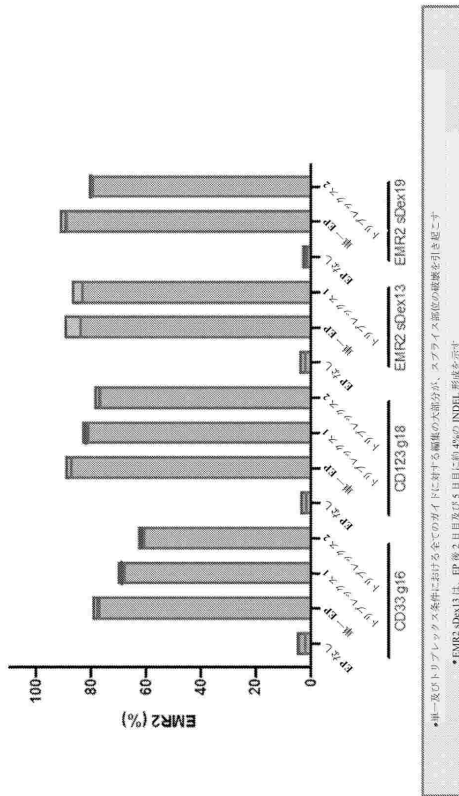
- EP 後 5 日目に、CD33 g16 について 80% の陽性、及び CD123 g18、EMR2 sDex13、及び EMR2 sDex19 について 90% の陽性
- CD123 g18、EMR2 sDex13、及び EMR2 sDex19 について、単一及びトリプレックス EP 条件で同様の陽性の陽性率を維持した
- 単一の EP と比較して、トリプレックスにおける CD33 g16 の陽性の割合は相対的に減少した
- 全ての遺伝子及び条件において、2 日目と比較して、5 日目でより高い陽性率を維持した
- EMR2 sDex13 及び EMR2 sDex19 における CD33 g16 に対する CD33 g16 陽性率を維持した (示す)

74B

【 7 5 A 】

トリプレックス1= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
トリプレックス2= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

EP 後 2 日目



rhAmpSeq
hCD34+

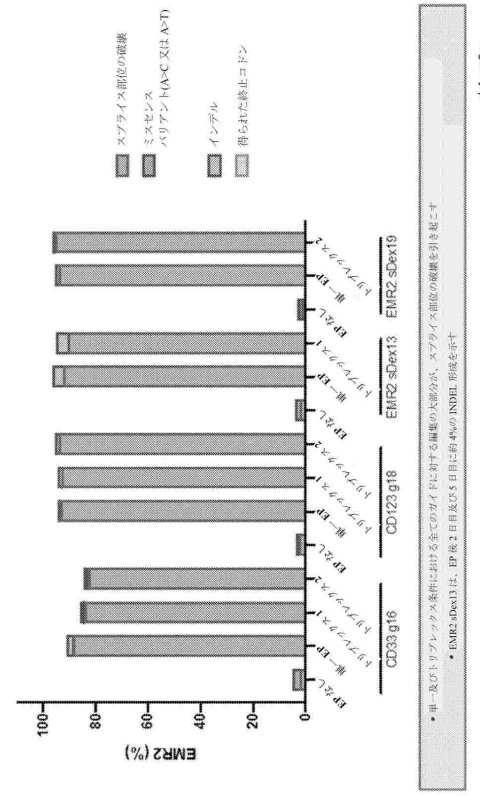
- 単一及びトリプレックス条件における全ての遺伝子に対する陽性の大部分が、スパライズ部位の陽性を引き起こす
- EMR2 sDex13 は、EP 後 2 日目及び 5 日目に約 40% の INDEL 形成を示す

75A

【 7 5 B 】

トリプレックス1= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
トリプレックス2= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

EP 後 5 日目



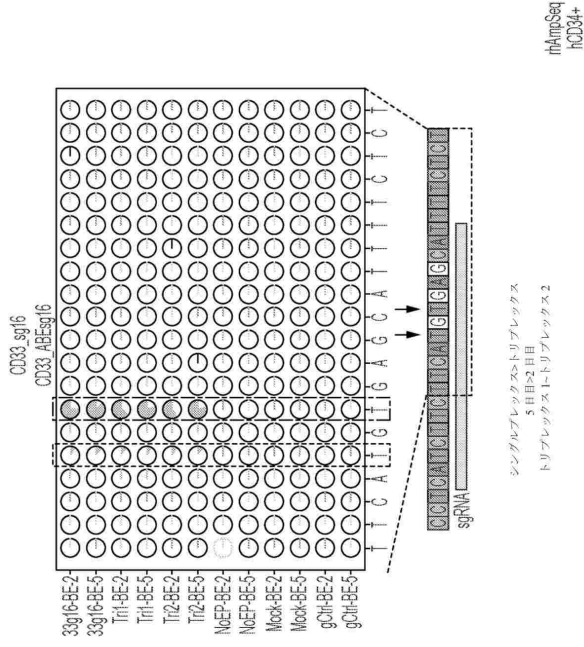
rhAmpSeq
hCD34+

- 単一及びトリプレックス条件における全ての遺伝子に対する陽性の大部分が、スパライズ部位の陽性を引き起こす
- EMR2 sDex13 は、EP 後 2 日目及び 5 日目に約 40% の INDEL 形成を示す

75B

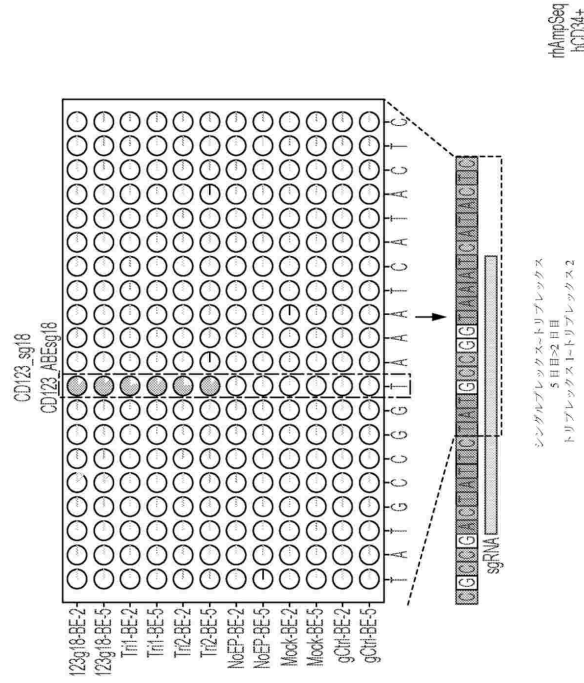
【 図 7 6 A 】

図 76A



【 図 7 6 B 】

図 76B

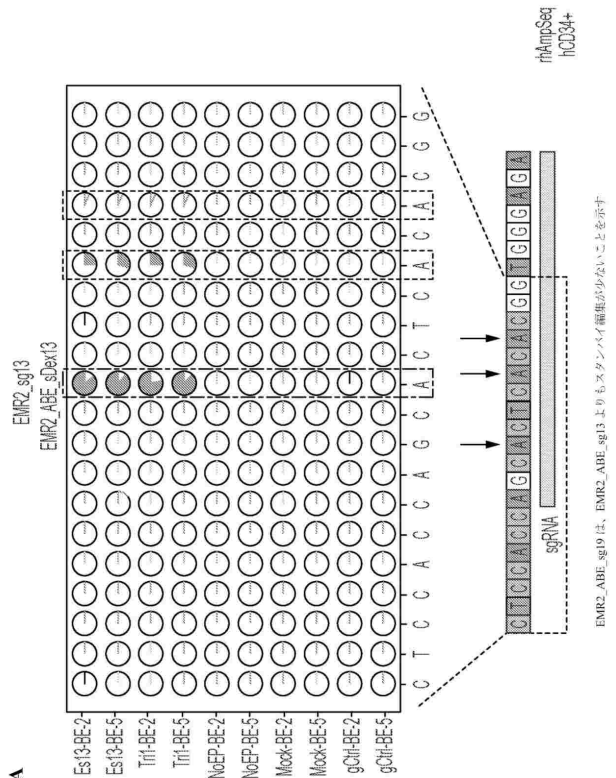


10

20

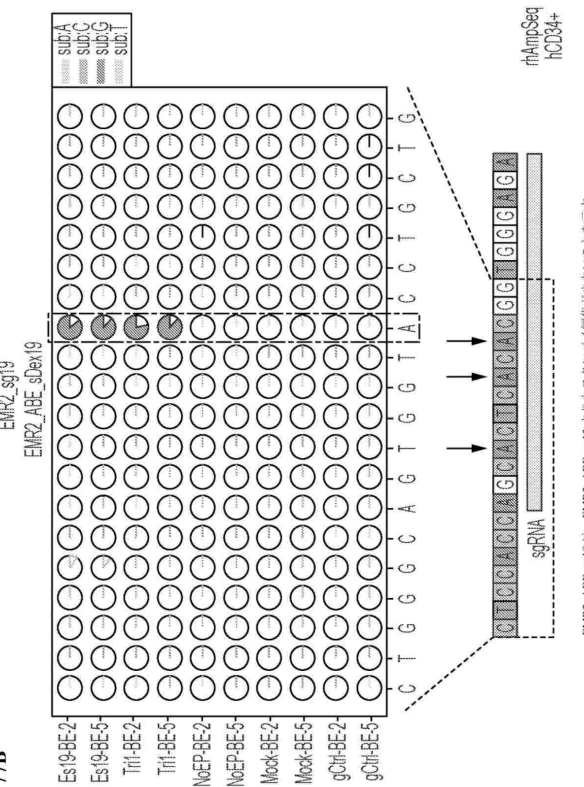
【 図 7 7 A 】

図 77A



【 図 7 7 B 】

図 77B

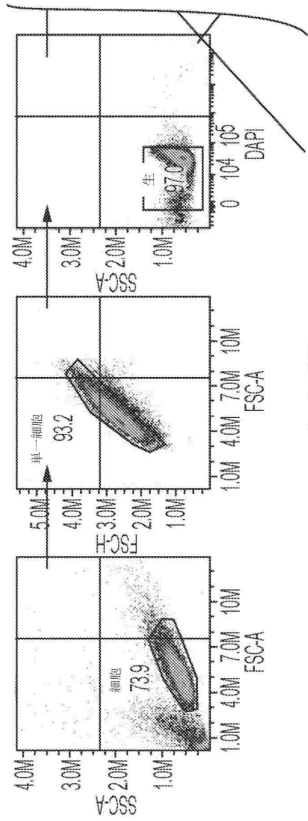


30

40

50

【 図 7 8 A - 1 】



単一 KO 発現

図 78A

【 図 7 8 A - 2 】

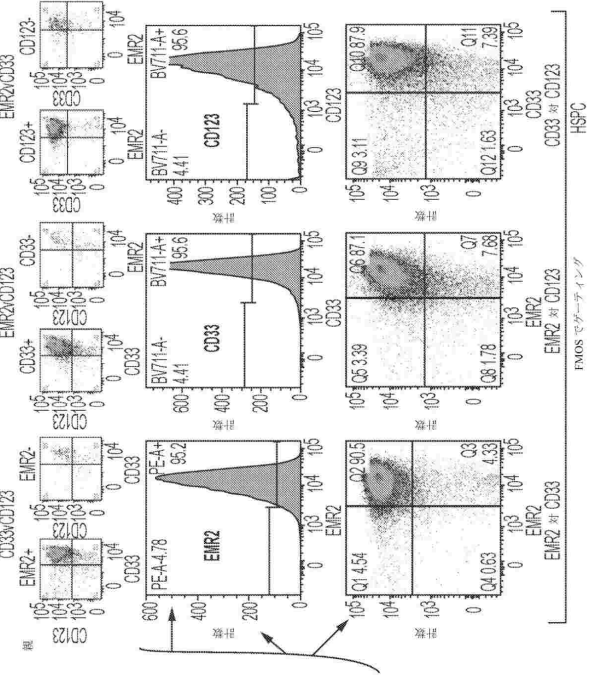
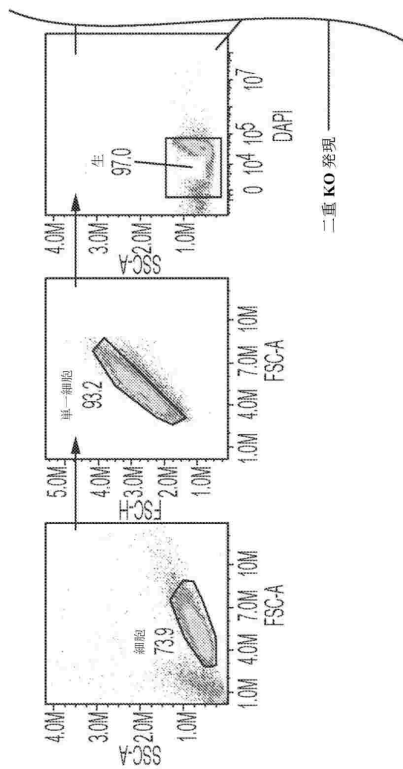


図 78A 続き

10

20

【 図 7 8 B - 1 】



二重 KO 発現

図 78B

【 図 7 8 B - 2 】

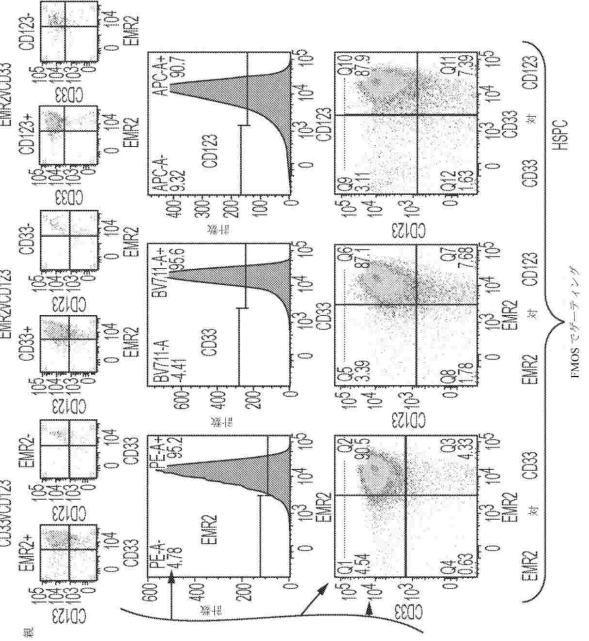


図 78B 続き

30

40

50

【 図 78 C 】

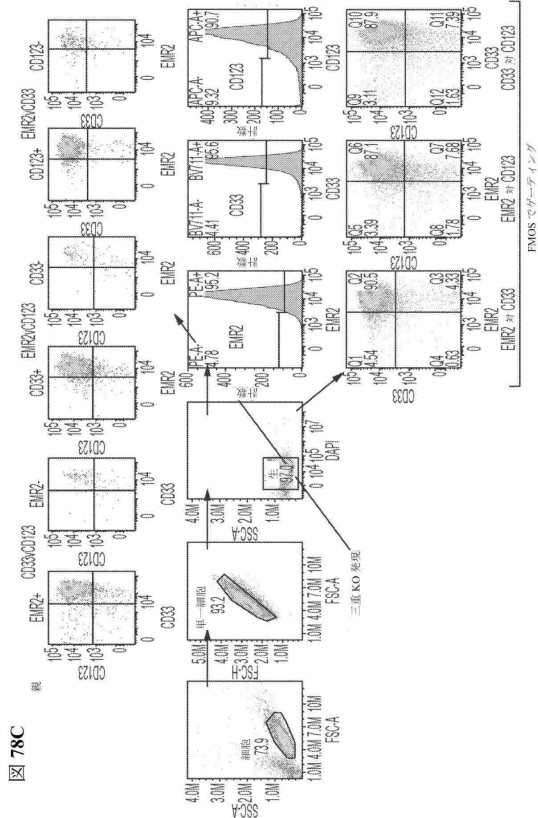


図 78C

【 図 79 A 】

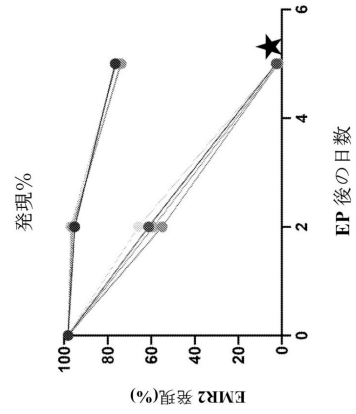


図 79A

トリプレックス1= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
トリプレックス2= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

10

20

【 図 79 B 】

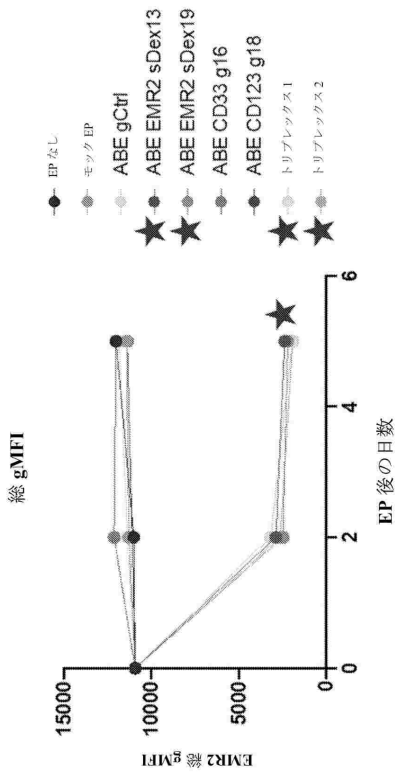


図 79B

トリプレックス1= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
トリプレックス2= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

【 図 80 】

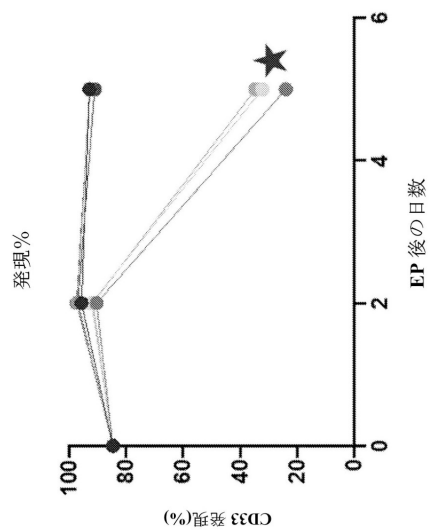


図 80

トリプレックス1= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
トリプレックス2= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

30

40

50

【 図 8 1 】

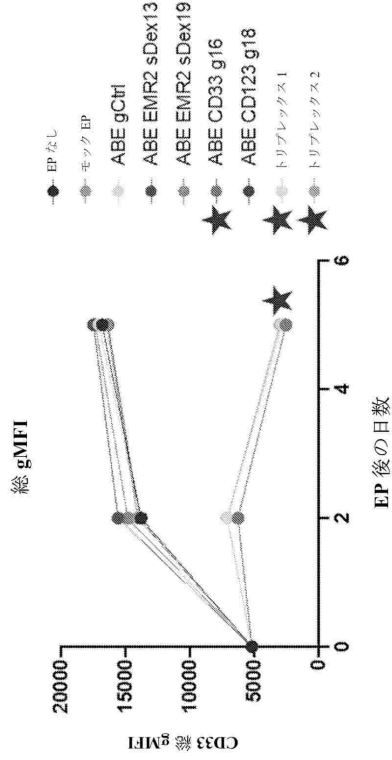


図 81

【 図 8 2 B 】

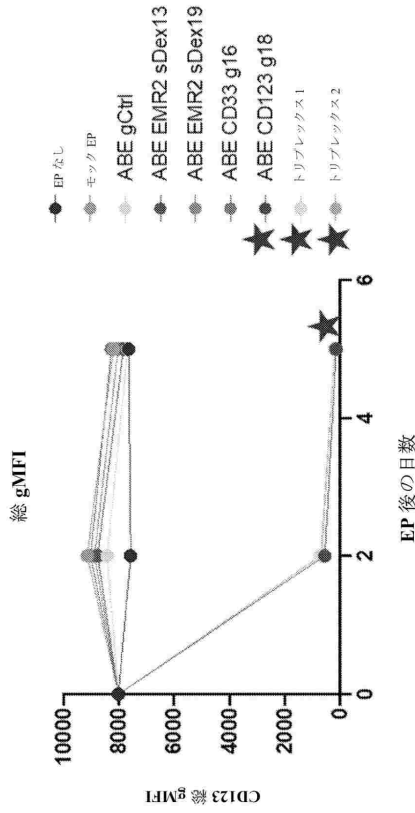


図 82B

トリアレックス1 = CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
トリアレックス2 = CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

【 図 8 2 A 】

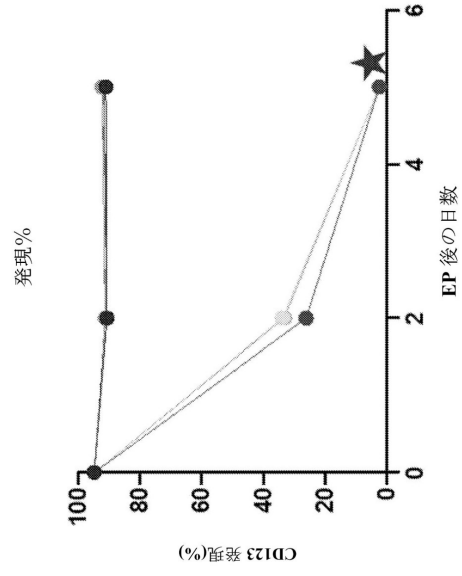


図 82A

トリアレックス1 = CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
トリアレックス2 = CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

【 図 8 3 A 】

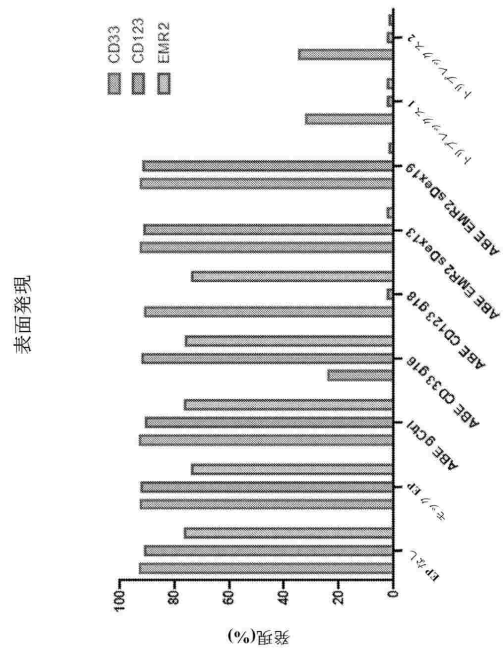


図 83A

トリアレックス1 = CD33 g16, EMR2 sDex13
トリアレックス2 = CD33 g16, EMR2 sDex19

10

20

30

40

50

【 図 8 3 B 】

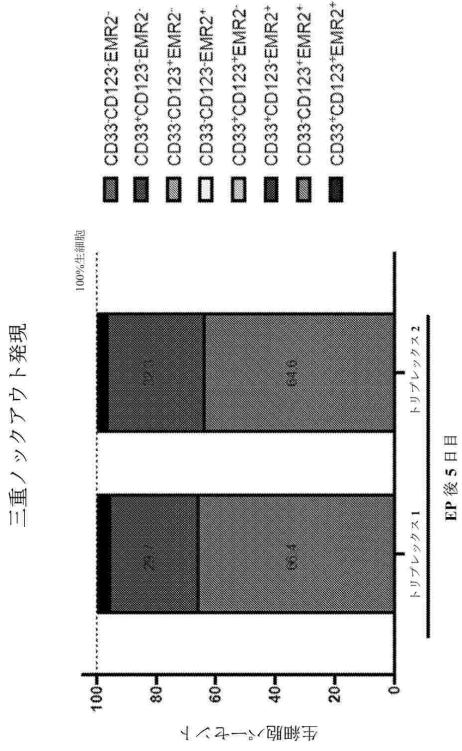


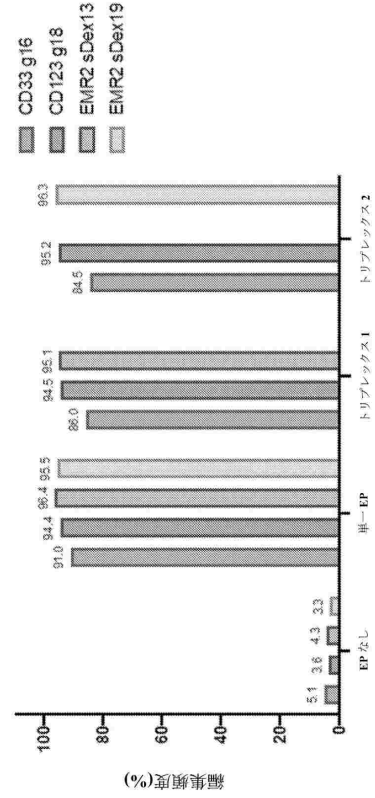
図 83B

【 図 8 4 A 】

トリプレックス1= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
 トリプレックス2= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

図 84A

DNA 編集



トリプレックス1= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
 トリプレックス2= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

10

20

【 図 8 4 B 】

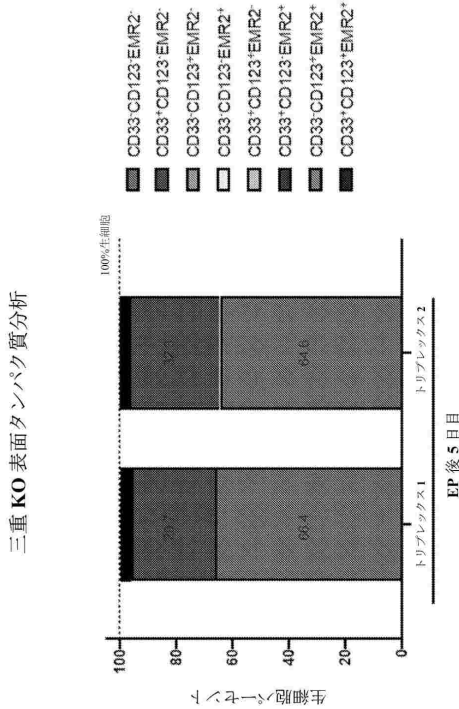


図 84B

トリプレックス1= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex13
 トリプレックス2= CD33 g16, CD123 g18, EMR2 sDex19

図 85A

【 図 8 5 A 】

ガイド	スベーター配列	PAM 配列	hNSP 挿入	OT スコア	BR クラン ドク	編集可能な 変位塩基子 挿入	RR 配列	コドン	アミノ酸	結果
g15	AAAGGTAAGATTTCAGTTA	TGG	0	405	aGGTaa	3	gGGTaa gGGTgp gGGTgp	AAA/AAG	K	スプライス 副産物 バリエーション
g88	AAGGTAATCTGTATTCTCT	TGG	0	210	GGTaaT	2	GGTgaT GGTggT	-	-	スプライス 副産物 バリエーション

30

40

50

【 8 5 B 】

図 85B

ガイド	スベアーサ一配列	PAM 配列	dbSNP 位置	OT ヌクレオ チド	BE ウィ ンドウ サイズ	BE ウィ ンドウ サイズ	編成可能な 対立遺伝子 の数	BE 配列	コードン	アミノ 酸	結果
g10	CTACCTATCCACATGCAGA	AG	0	1692	CaCTCa	2	2	CpCCtA CpCCtG	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g11	CTTCGCACTGGATAGGTAG	AG	0	988	TCTGGCa	1	1	TCTGGG	ATGGTG	M>V	腫瘍_正常
g12	GTACATACACATGGTTGGCA	TG	0	1798	aCAtaC	3	3	gCAt aC gCAt aC gCAt gC	ATGGTG	M>V	腫瘍_正常
g127	ATGTGGAGTTCACGTAACCT	TG	1	212	GTGGAG	1	1	GTGGG	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g128	TGGAGTTCACGTAACCT	AG	1	199	CaGTTc	1	1	GgGTTc	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g13	ACACTCACCTATCCACATGC	AG	0	685	aCTCaC	2	2	gCTCaC gCTCaC	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g197	AGGTAATCTGTATCTCTCT	GG	0	14551	GTaaTC	2	2	GTaaTC GTaaTC	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g202	TCTTCAGACACAAATGTa	AG	0	866	TTCAG	1	1	TTCGg	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g267	CTTTACCAATTCGATTTTTGT	TG	0	956	TaaCGa	2	2	TtgCa TtgCg	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g268	GGGCTTACCAATTCGATTTTT	TG	0	462	GCTTta	1	1	GCTTTg	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g278	GTAGAAATTTATAAATCCC	AG	0	530	aCGaaT	3	3	gCGaaT gCGaaT gCGaaT	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g316	CACCTACCAGGAGGAGGAGT	TG	0	716	CTTaCC	1	1	CTTgCC	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g321	GCCTGGTAAGTGTCTATCT	TG	0	316	CTGGTta	1	1	CTGGTg	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g324	GGTAAGTGTCTATCTCTCT	AG	0	476	TaaGTG	2	2	TgaaTC TgaaTC	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g337	TCTTACAGGAGTATAAGAAA	CG	0	1219	TTCAG	1	1	TTTCg	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g60	CTTACCTTTTCGCCAAAT	TG	0	1022	TaCCTT	1	1	TgCCTT	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g64	AAGGTAAAGTTCAGTTAT	GG	0	1043	GGTaaG	2	2	GGTaaG GGTTgG	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント

【 8 5 C 】

図 85C

ガイド	スベアーサ一配列	PAM 配列	dbSNP 位置	OT ヌクレ オチド	BE ウィ ンドウ サイズ	編成可能な 対立遺伝子 の数	BE 配列	コードン	アミノ 酸	結果	
g7	ACTGACCTATCCACATGCAG	AAG	0	773	TCaCCT	1	1	TGgCCT	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g8	GACACTCACCTATCCACATG	CAG	0	441	CaCTCa	2	2	CpCTCa CpCTCa	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g69	AGTACATACACATGGTTGCC	AAG	0	262	TaCaTa	3	3	TgCaTa TgCaTa TgCaTa	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g70	GTGGAGTTCACGTAACCTTTG	AAG	1	122	GGaGTT	1	1	GGgGTT	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g104	TTACTTGTCTTTTGGTATA	TAG	0	547	aCCTTG	1	1	gCCTTG	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g106	GGTAACTGTATCTCTCTCT	BAG	0	673	TaaTCT	2	2	TgaaTC TgaaTC	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g110	TTCTCCAGACACAAATGT	AAG	0	551	CTTCCa	1	1	CTTCcG	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g154	TGTAGAAATTTATAAATCCC	CAG	0	484	TaCGaa	3	3	TgCGaa TgCGaa TgCGaa	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g183	TGGTAAGTGTCTATCTCTCT	TAG	0	408	GTTaaGT	2	2	GTgaaGT GTgaaGT	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント

10

20

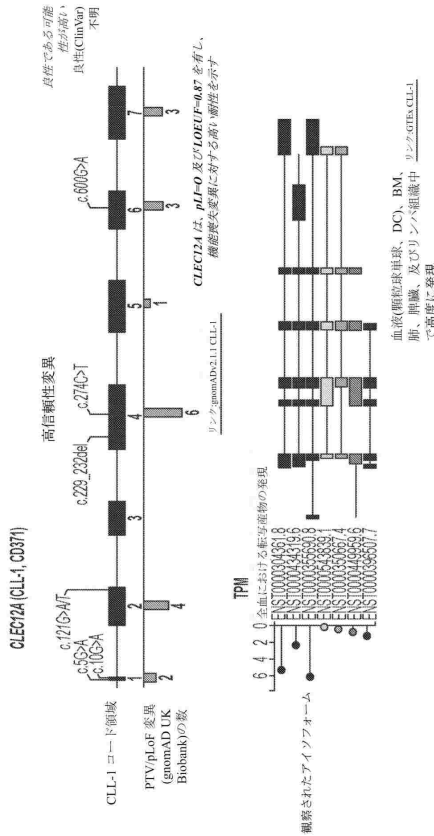
【 8 5 D 】

図 85D

ガイド	スベアーサ一配列	PAM 配列	dbSNP 位置	OT ヌクレ オチド	BE ウィ ンドウ サイズ	編成可能な 対立遺伝子 の数	BE 配列	コードン	アミノ 酸	結果	
g7A	TCAAGATTTCTTACATATTC	TTTG	0	386	aaGaaT	3	3	ggGaaT ggGaaT ggGaaT	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g22	CACAGCACCTCCAGTCCCTC	TTTC	0	46	CaGCaC	2	2	CpGCaC CpGCaC	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g29	AATGTGGAGTTCACGTAACCT	TTTT	1	25	TGTGGa	1	1	TGTGGg	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g30	ATGTGGAGTTCACGTAACCT	TTTT	1	15	GTGGaG	1	1	GTGGGg	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g59	CTGTAGAAATTTATAAATCCC	TTTC	0	54	GTAAGa	2	2	GTgGaa GTgGaa	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント
g69	TCTTTACAGGAGTATAAGAAC	TTTC	0	70	TTTaaG	1	1	TTTCgG	-	-	スワライズ_腫瘍_バリアント

【 8 5 E 】

図 85E



30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/43567

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61K 35/12; C07K 14/705; C12N 15/113 (2022.01) ADD. CPC - INV. A61K 35/12; C07K 14/705; C12N 15/113 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		10
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/0326179 A1 (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY) 16 November 2017; [0007], [0019], [0021], [0029], [0148], [0154]	1-6, 119-120, 170
A	WO 2021/041971 A1 (VOR BIOPHARMA, INC.) 04 March 2021; entire document	1-5, 119-120, 170
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 January 2023 (27.01.2023)		Date of mailing of the international search report FEB 16 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JS22/43557

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.
- b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

10

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

An "Invitation to Furnish Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Listing and to Pay, Where Applicable, Late Furnishing Fee" (Form PCT/ISA/225), was mailed on 06 October 2022 (06.10.2022), however, a sequence listing was not filed with the ISA/US in response to the Form PCT/ISA/225. Therefore, the international search was carried out only to the extent possible without a sequence listing.

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/43557

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 6-118, 133-169, 180-199
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***Please See Supplemental Page-***

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I+, Claims 1-5, 119-132, 170; SEQ ID NO: 1 (target domain nucleic acid sequence); CDG3 (target domain)

20

30

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/43557

-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+, Claims 1-5, 119-132, 170; SEQ ID NO: 1 (target domain nucleic acid sequence); CD33 (target domain) are directed towards guide RNAs and methods for producing novel cells having a modification (e.g., insertion or deletion) in an endogenous lineage-specific cell-surface antigen.

10

The gRNAs and methods of Claims 1-5 (each in-part), 119-120 (each in-part), and 170 (in-part) are believed to encompass the first named invention of Group I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (first exemplary target domain nucleic acid sequence) and CD33 (first exemplary target domain).

Applicant is invited to elect additional target domain(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO., such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional target domain(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected target domain(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "*" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 2 (target domain nucleic acid sequence).

No technical features are shared between the target domains of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a gRNA comprising a targeting domain which binds a target domain; a gRNA comprising a targeting domain which binds a target domain comprising a nucleic acid sequence; a gRNA comprising a targeting domain capable of directing editing of a target domain; a gRNA comprising a targeting domain, wherein the targeting domain comprises a nucleic acid sequence; a method for multiplex base editing, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) one or more guide RNAs (gRNAs) that target CD33 (Siglec-3), one or more gRNAs that target CLL-1, one or more gRNAs that target CD123, one or more gRNAs that target CD327 (Siglec-6), and/or one or more gRNAs that target CD312 (EMR2); and (b) a base editor that binds the one or more gRNAs, wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains, thereby producing a genetically engineered cell; a method of producing a genetically engineered cell, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) one or more guide RNAs (gRNAs) that target CD33 (Siglec-3), one or more gRNAs that target CLL-1, one or more gRNAs that target CD123, one or more gRNAs that target CD327 (Siglec-6), and/or one or more gRNAs that target CD312 (EMR2); and (b) a base editor that binds the one or more gRNAs, wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains, thereby producing a genetically engineered cell; a method of producing a genetically engineered cell, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) one or more guide RNAs (gRNAs) that target CD33 (Siglec-3), one or more gRNAs that target CLL-1 and/or one or more gRNAs that target CD123; and (c) a base editor that binds the one or more gRNAs, wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains, thereby producing a genetically engineered cell; a method of producing a genetically engineered cell, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) one or more guide RNAs (gRNAs) that target CD33 (Siglec-3); (b) one or more gRNAs that target CLL-1 and/or one or more gRNAs that target CD123; and (c) a base editor that binds the one or more gRNAs, wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains, thereby producing a genetically engineered cell; a method of producing a genetically engineered cell, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) one or more guide RNAs (gRNAs) that target CD33 (Siglec-3); (b) one or more gRNAs that target CLL-1, one or more gRNAs that target CD123, one or more gRNAs that target CD327 (Siglec-6), and/or one or more gRNAs that target CD312 (EMR2); and (c) a base editor that binds the one or more gRNAs, wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains, thereby producing a genetically engineered cell; a method of producing a genetically engineered cell, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) a plurality of gRNAs configured to provide simultaneous editing events within at least three different genomic targets; and (d) a base editor that binds the plurality of gRNAs, thereby producing a genetically engineered cell; a method of producing a genetically engineered cell, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) one or more guide RNAs (gRNAs) that target CD33 (Siglec-3); (b) one or more gRNAs that target CLL-1, one or more gRNAs that target CD123, one or more gRNAs that target CD327 (Siglec-6), and/or one or more gRNAs that target CD312 (EMR2); and (c) a base editor that binds the one or more gRNAs, wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains, thereby producing a genetically engineered cell; a method of producing a genetically engineered cell, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) a plurality of gRNAs configured to provide simultaneous editing events within at least three different genomic targets; and (d) a base editor that binds the plurality of gRNAs, thereby producing a genetically engineered cell; a method of producing a genetically engineered cell, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) one or more guide RNAs (gRNAs) that target CD33 (Siglec-3); (b) one or more gRNAs that target CLL-1; (c) one or more gRNAs that target CD123; and (d) a base editor that binds the one or more gRNAs, wherein the one or more gRNAs are configured to provide simultaneous editing events within at least three different target domains, thereby producing a genetically engineered cell; a method of producing a genetically engineered cell, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) a plurality of gRNAs configured to provide simultaneous editing events within at least four different genomic targets; and (d) a base editor that binds the plurality of gRNAs, thereby producing a genetically engineered cell; a method for quadruplex base editing, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) one or more gRNAs that target CD33 (Siglec-3); (b) one or more gRNAs that target CLL-1; (c) one or more gRNAs that target CD123; (d) one or more gRNAs that target CD312 (EMR2); (e) a base editor that binds the one or more gRNAs, wherein the one or more gRNAs are configured to provide simultaneous editing events within at least four different target domains, thereby producing a genetically engineered cell; a method of producing a genetically engineered cell, comprising: (i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) a plurality of gRNAs configured to provide simultaneous editing events within at least four different genomic targets; and (b) a base editor that binds the plurality of gRNAs, thereby producing a genetically engineered cell; a method of producing a genetically engineered cell, comprising:

20

30

40

-Continued Within the Next Supplemental Box-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/43557

---Continued from previous Supplemental Box---

(i) providing a cell, and (ii) introducing into the cell (a) one or more gRNAs that target CD33 (Siglec-3); (b) one or more gRNAs that target CLL1; (c) one or more gRNAs that target CD123; (d) one or more gRNAs that target CD312 (EMR2); (e) a base editor that binds the one or more gRNAs, wherein the one or more gRNAs are configured to provide simultaneous editing events within at least four different target domains, thereby producing a genetically engineered cell; a cell population comprising a plurality of the genetically engineered hematopoietic stem or progenitor cells; these shared technical features are previously disclosed by WO 2021/04197 A1 (VOR BIOPHARMA, INC.) (hereinafter "Vor").

10

Vor discloses a gRNA comprising a targeting domain which binds a target domain (a gRNA comprising a targeting domain which binds a target domain; claim 15); a gRNA comprising a targeting domain which binds a target domain comprising a nucleic acid sequence (a gRNA comprising a targeting domain which binds a target domain comprising a nucleic acid sequence; claim 15); a gRNA comprising a targeting domain capable of directing editing of a target domain (a gRNA comprising a targeting domain capable of directing editing of a target domain; claim 16); a gRNA comprising a targeting domain, wherein the targeting domain comprises a nucleic acid sequence (a gRNA comprising a targeting domain, wherein the targeting domain comprises a nucleic acid sequence; claim 15); a method for multiplex base editing (introducing dual gRNA compositions into a cell (method for multiplex base editing); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (introducing into the cell; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) (a) one or more guide RNAs (gRNAs) that target CD33 (Siglec-3), one or more gRNAs that target CLL-1 (first and second guide RNAs wherein the first gRNA targets CLL1; page 78, lines 12-20); one or more gRNAs that target CD123 (second gRNA targets CD123; page 78, lines 12-20), one or more gRNAs that target CD327 (Siglec-6), and/or one or more gRNAs that target CD312 (EMR2); and (b) a base editor that binds the one or more gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains (gRNAs target CLL1 and CD123 (wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains); page 78, lines 12-20), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method of producing a genetically engineered cell (introducing dual gRNA compositions into a cell (method for producing a genetically engineered cell); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (introducing into the cell; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) (a) one or more guide RNAs (gRNAs) that target CD33 (Siglec-3), one or more gRNAs that target CLL-1 (first and second guide RNAs wherein the first gRNA targets CLL1; page 78, lines 12-20), one or more gRNAs that target CD123 (second gRNA targets CD123; page 78, lines 12-20), one or more gRNAs that target CD327 (Siglec-6), and/or one or more gRNAs that target CD312 (EMR2); and (b) a base editor that binds the one or more gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains (gRNAs target CLL1 and CD123 (wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains); page 78, lines 12-20), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method for multiplex base editing (introducing dual gRNA compositions into a cell (method for multiplex base editing); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (a) one or more guide RNAs (gRNAs) (introducing into the cell one or more guide RNAs; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) that target CD33 (page 78, lines 12-25); (b) one or more gRNAs that target CLL-1 (page 78, lines 12-25) and/or one or more gRNAs that target CD123; and (c) a base editor that binds the one or more gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within different target domains (gRNAs target CD33 and CLL1 (wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains); page 78, lines 12-25), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method of producing a genetically engineered cell (introducing gRNA compositions into a cell (method for producing a genetically engineered cell); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (a) one or more guide RNAs (gRNAs) that target CD33 (page 78, lines 12-25); (b) one or more gRNAs that target CLL-1 (page 78, lines 12-25), one or more gRNAs that target CD123 (page 12, lines 24-27), one or more gRNAs that target CD327 (Siglec-6) (page 80, line 7), and/or one or more gRNAs that target CD312 (EMR2) (page 80, line 5); and (c) a base editor that binds the one or more gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains (wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains); page 78, lines 12-25), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method of producing a genetically engineered cell (introducing gRNA compositions into a cell (method for producing a genetically engineered cell); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (a) one or more guide RNAs (gRNAs) (introducing into the cell one or more guide RNAs; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) that target CD33 (Siglec-3) (page 78, lines 12-25); (b) one or more gRNAs that target CLL-1 (page 78, lines 12-25), one or more gRNAs that target CD123 (page 12, lines 24-27), one or more gRNAs that target CD327 (Siglec-6) (page 80, line 7), and/or one or more gRNAs that target CD312 (EMR2) (page 80, line 5); and (c) a base editor that binds the one or more gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains (wherein the one or more gRNAs are configured to provide an editing event within the same or different target domains); page 78, lines 12-25), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method for triplex base editing (introducing three gRNA compositions into a cell (method for triplex base editing); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49; page 78, lines 7-8), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (a) a plurality of gRNAs (introducing into the cell one or more guide RNAs; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) configured to provide simultaneous editing events within at least three different genomic targets (gRNAs are admixed (configured to provide simultaneous editing events within at least three different genomic targets); and (d) a base editor that binds the plurality of gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), thereby producing a genetically

20

30

40

---Continued Within the Next Supplemental Box---

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 2022)

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/43557

---Continued from previous Supplemental Box---

engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method for triplex base editing (introducing three gRNA compositions into a cell (method for triplex base editing); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49; page 78, lines 7-8), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (a) one or more gRNAs (introducing into the cell one or more guide RNAs; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) that target CD33 (Siglec-3) (page 78, lines 12-25); (b) one or more gRNAs that target CLL1 (page 78, lines 12-25); (c) one or more gRNAs that target CD123 (page 12, lines 24-27); and (d) a base editor that binds the one or more gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), wherein the one or more gRNAs are configured to provide simultaneous editing events within at least three different target domains (gRNAs are admixed (configured to provide simultaneous editing events within at least three different genomic targets), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method of producing a genetically engineered cell (introducing gRNA compositions into a cell (method for producing a genetically engineered cell); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (a) a plurality of gRNAs (introducing into the cell one or more guide RNAs; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) configured to provide simultaneous editing events within at least three different genomic targets (gRNAs are admixed (configured to provide simultaneous editing events within at least three different genomic targets); and (d) a base editor that binds the plurality of gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method of producing a genetically engineered cell (introducing gRNA compositions into a cell (method for producing a genetically engineered cell); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (a) one or more gRNAs (introducing into the cell one or more guide RNAs; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) that target CD33 (Siglec-3) (page 78, lines 12-25); (b) one or more gRNAs that target CLL1 (page 78, lines 12-25); (c) one or more gRNAs that target CD123 (page 12, lines 24-27); and (d) a base editor that binds the one or more gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), wherein the one or more gRNAs are configured to provide simultaneous editing events within at least three different target domains (gRNAs are admixed (configured to provide simultaneous editing events within at least three different genomic targets), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method for quadruplex base editing (introducing four gRNA compositions into a cell (method for quadruplex base editing); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49; page 78, lines 7-8), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (a) a plurality of gRNAs (introducing into the cell one or more guide RNAs; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) configured to provide simultaneous editing events within at least four different genomic targets (gRNAs are admixed (configured to provide simultaneous editing events within at least four different genomic targets); page 78, lines 7-8); and (d) a base editor that binds the plurality of gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method for quadruplex base editing (introducing four gRNA compositions into a cell (method for quadruplex base editing); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49; page 78, lines 7-8), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (introducing into the cell one or more guide RNAs; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) (a) one or more gRNAs that target CD33 (Siglec-3) (page 78, lines 12-25); (b) one or more gRNAs that target CLL1 (page 78, lines 12-25); (c) one or more gRNAs that target CD123 (page 12, lines 24-27); (d) one or more gRNAs that target CD312 (EMR2) (page 80, line 5); (e) a base editor that binds the one or more gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), wherein the one or more gRNAs are configured to provide simultaneous editing events within at least four different target domains (gRNAs are admixed (configured to provide simultaneous editing events within at least four different genomic targets), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method of producing a genetically engineered cell (introducing gRNA compositions into a cell (method for producing a genetically engineered cell); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (a) a plurality of gRNAs (introducing into the cell one or more guide RNAs; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) configured to provide simultaneous editing events within at least four different genomic targets (gRNAs are admixed (configured to provide simultaneous editing events within at least four different genomic targets); and (b) a base editor that binds the plurality of gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a method of producing a genetically engineered cell (introducing gRNA compositions into a cell (method for producing a genetically engineered cell); page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15; page 77, lines 46-49), comprising: (i) providing a cell (page 18, lines 10-16), and (ii) introducing into the cell (a) one or more gRNAs (introducing into the cell one or more guide RNAs; page 18, lines 10-16; page 52, lines 12-15) that target CD33 (Siglec-3) (page 78, lines 12-25); (b) one or more gRNAs that target CLL1 (page 78, lines 12-25); (c) one or more gRNAs that target CD123 (page 12, lines 24-27); (d) one or more gRNAs that target CD312 (EMR2) (page 80, line 5); (e) a base editor that binds the one or more gRNAs (a base editor that binds the one or more gRNAs; page 56, lines 4-19), wherein the one or more gRNAs are configured to provide simultaneous editing events within at least four different target domains (gRNAs are admixed (configured to provide simultaneous editing events within at least four different genomic targets), thereby producing a genetically engineered cell (thereby producing modified cells (a genetically engineered cell); abstract); a cell population comprising a plurality of the genetically engineered hematopoietic stem or progenitor cells (a cell population comprising a plurality of the genetically engineered hematopoietic stem or progenitor cells); abstract; page 19, lines 4-6).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Vor reference, unity of invention is lacking.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	
(32)優先日 令和4年5月18日(2022.5.18)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW		
(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、ケア オブ ブイオーアール バイオフィーマ インコーポレーテッド	
(72)発明者	ファリヤ, アレハンドラ	
	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 1 0 1、ケア オブ ブイオーアール バイオフィーマ インコーポレーテッド	
(72)発明者	パイク, エリザベス	
	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 1 0 1、ケア オブ ブイオーアール バイオフィーマ インコーポレーテッド	
(72)発明者	ヘイゼルベイカー, デーン	
	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 1 0 1、ケア オブ ブイオーアール バイオフィーマ インコーポレーテッド	
(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 1 0 1、ケア オブ ブイオーアール バイオフィーマ インコーポレーテッド	
F ターム (参考)	4B065 AA94X AB01 BA02 CA44 4C087 AA01 AA02 BB63 NA14 ZB26 ZB27	