(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-508721
(P2025-508721A)
(43)公表日　令和7年4月10日(2025.4.10)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/0789(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0789		４Ｂ０６４
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12	ＺＮＡ	４Ｃ０８５
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783		４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全212頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-548378(P2024-548378)
(86)(22)出願日　令和5年2月16日(2023.2.16)
(85)翻訳文提出日　令和6年10月15日(2024.10.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/062757
(87)国際公開番号　WO2023/159136
(87)国際公開日　令和5年8月24日(2023.8.24)
(31)優先権主張番号　63/311,707
(32)優先日　令和4年2月18日(2022.2.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/426,138
(32)優先日　令和4年11月17日(2022.11.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ
最終頁に続く

(71)出願人　511071555
ダナ－ファーバー キャンサー インスティテュート， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１１５－５４５０， ボストン， ブルックライン アヴェニュー ４５０
(71)出願人　596115687
ザ チルドレンズ メディカル センター コーポレーション
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１１５， ボストン， シャタック・ストリート ５５
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100120134

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞表面受容体のエピトープ操作

(57)【要約】
細胞表面タンパク質の１つ以上の遺伝子編集された遺伝子を有する造血幹細胞などの遺伝子操作された造血細胞、及び単独で、または細胞表面タンパク質（複数可）を標的とする免疫療法と組み合わせたそれらの治療的使用。
【選択図】図１

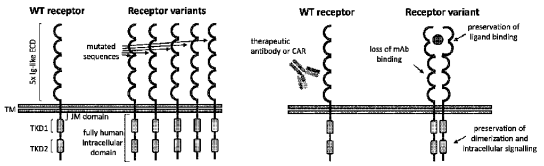


FIG.1

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）であって、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子を含み、前記遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子が、そのコードされたタンパク質の治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減するように操作される、前記遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）。
【請求項２】
前記遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子が、前記ＦＬＴ３遺伝子のエクソン９に少なくとも１つの変異を含む、請求項１に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項３】
前記遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子のエクソン９における少なくとも１つの変異が、Ｎ３９９位に変異を有するポリペプチドをもたらす、請求項２に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項４】
Ｎ３９９位の前記変異が、Ｎ３９９ＤまたはＮ３９９Ｇである、請求項３に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項５】
前記治療用抗ＦＬＴ３抗体が、抗ＦＬＴ３クローン４Ｇ８抗体である、請求項１に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項６】
前記治療用抗ＦＬＴ３抗体が、４Ｇ８抗体と同じ６つのＣＤＲを有するか、またはそれと競合する抗体である、請求項１に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項７】
前記遺伝子操作されたＨＳＰＣが、ガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲシステムを使用して遺伝子操作される、請求項１に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項８】
前記ヌクレアーゼが、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９（ＳｐＣａｓ９）、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ（ＳａＣａｓ９）、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ Ｃａｓ１２ａ（ＬｂＣａｓ１２ａ）、またはＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６（ＡｓＣａｓ１２ａ）のいずれかである、請求項７に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項９】
前記ＣＲＩＳＰＲシステムが、ＳｐＣａｓ９を含む、請求項８に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項１０】
前記ガイド核酸が、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、及び配列番号１６からなる群から選択される、請求項８または請求項９に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項１１】
ＣＲＩＳＰＲシステムが、鋳型ＤＮＡをさらに含む、請求項１０に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項１２】
前記鋳型ＤＮＡが、配列番号４０、配列番号４１、配列番号４２、及び配列番号４３からなる群から選択される、請求項１１に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項１３】
前記ヌクレアーゼが、塩基エディター酵素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である、請求項７に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項１４】
前記塩基エディター酵素が、ヌクレオチドデアミナーゼである、請求項１３に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項１５】

前記ヌクレオチドデアミナーゼが、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである、請求項１４に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項１６】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である、請求項１３に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項１７】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、Ｄ１０Ａ位に変異を含む、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項１８】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む、請求項１７に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項１９】
ガイドＲＮＡが、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、及び配列番号２３からなる群から選択される、請求項１３～１８のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項２０】
前記遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子が、配列番号５１または配列番号５２のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、請求項１に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項２１】
遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団であって、請求項１～２０のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣを含む、前記遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団。
【請求項２２】
造血器悪性腫瘍を治療する方法であって、前記方法が、ヒト対象に、
（ａ）請求項２１に記載の遺伝子操作された造血幹細胞の集団と、
（ｂ）抗ＦＬＴ３抗体結合ドメインまたは抗ＦＬＴ３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片を含む治療有効量の少なくとも１つの薬剤と、を投与することを含む、前記方法。
【請求項２３】
前記少なくとも１つの薬剤が、前記抗ＦＬＴ３抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記造血器悪性腫瘍が、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、またはＴ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）である、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
前記ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、前記ヒト対象からの前記生体試料からの前記ＨＳＰＣを遺伝子操作し、それによって、前記遺伝子操作されたＨＳＰＣの集団を形成することと、をさらに含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２６】
前記生体試料が、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）であって、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子を含み、前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子が、そのコードされたタンパク質の治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減するように操作される、前記遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）。
【請求項２８】
前記治療用抗ＣＤ１２３抗体が、クローン７Ｇ３抗体またはそのヒト化対応物ＣＳＬ３６２である、請求項２７に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。

【請求項２９】
前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子が、前記ＣＤ１２３遺伝子のエクソン２に少なくとも１つの変異を含む、請求項２８に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項３０】
前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン２における少なくとも１つの変異が、Ｓ５９位に変異を有するポリペプチドをもたらす、請求項２９に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項３１】
Ｓ５９での前記変異が、Ｓ５９ＰまたはＳ５９Ｆである、請求項３０に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項３２】
前記治療用抗ＣＤ１２３抗体が、抗ＣＤ１２３クローン６Ｈ６抗体または抗ＣＤ１２３クローンＳ１８０１６Ｆ抗体である、請求項２７に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項３３】
前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子が、前記ＣＤ１２３遺伝子のエクソン３に少なくとも１つの変異を含む、請求項３２に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項３４】
前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン３における少なくとも１つの変異が、Ｐ８８位に変異を有するポリペプチドをもたらす、請求項３２に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項３５】
Ｐ８８での前記変異が、Ｐ８８ＬまたはＰ８８Ｓである、請求項３４に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項３６】
前記遺伝子操作されたＨＳＰＣが、ガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲシステムを使用して遺伝子操作される、請求項３１に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項３７】
前記ガイド核酸が、配列番号２４、配列番号２７、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３３、及び配列番号３４からなる群から選択される、請求項３６に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項３８】
ヌクレアーゼが、塩基エディター酵素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である、請求項３５に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項３９】
前記塩基エディター酵素が、ヌクレオチドデアミナーゼである、請求項３８に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項４０】
前記塩基エディター酵素が、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである、請求項３８に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項４１】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である、請求項３８に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項４２】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、Ｄ１０Ａ位に変異を含む、請求項３７～４１のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項４３】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む、請求項４２に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項４４】
前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子が、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５

６、配列番号５７、または配列番号５８のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、請求項２７に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項４５】
遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団であって、請求項２７～４４のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣを含む、前記遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団。
【請求項４６】
造血器悪性腫瘍を治療する方法であって、前記方法が、ヒト対象に、
（ａ）請求項４５に記載の遺伝子操作された造血幹細胞の集団と、
（ｂ）抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインまたは抗ＣＤ１２３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片を含む治療有効量の少なくとも１つの薬剤と、を投与することを含む、前記方法。
【請求項４７】
前記少なくとも１つの薬剤が、前記抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記造血器悪性腫瘍が、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、または芽球性形質細胞様樹状細胞白血病（ＢＰＣＤＮ）である、請求項４６に記載の方法。
【請求項４９】
前記ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、前記ヒト対象からの前記生体試料からの前記ＨＳＰＣを遺伝子操作し、それによって、前記遺伝子操作されたＨＳＰＣの集団を形成することと、をさらに含む、請求項４６に記載の方法。
【請求項５０】
前記生体試料が、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団であって、
（ｉ）遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子であって、前記遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子が、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、前記遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子と、
（ｉｉ）遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子であって、前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子が、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子と、を含む、前記遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団。
【請求項５２】
前記遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子が、前記ＦＬＴ３遺伝子のエクソン９に少なくとも１つの変異を含む、請求項５１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項５３】
前記遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子のエクソン９における少なくとも１つの変異が、Ｎ３９９位に変異を有するポリペプチドをもたらす、請求項５２に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項５４】
前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子が、前記ＣＤ１２３遺伝子のエクソン２に少なくとも１つの変異を含む、請求項５１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項５５】
前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン２における少なくとも１つの変異が、Ｓ５９位に変異を有するポリペプチドをもたらす、請求項５４に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項５６】

前記治療用抗ＦＬＴ３抗体が、抗ＦＬＴ３クローン４Ｇ８抗体である、請求項５１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項５７】
前記治療用抗ＣＤ１２３抗体が、抗ＣＤ１２３クローン７Ｇ３抗体またはＣＳＬ３６２抗体である、請求項５１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項５８】
前記ＨＳＰＣの集団が、少なくとも２つのガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲシステムを使用して遺伝子操作される、請求項５１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項５９】
前記少なくとも２つのガイド核酸が、１）配列番号１８または配列番号２０、及び２）配列番号２４または配列番号２７である、請求項５８に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項６０】
前記少なくとも２つのガイド核酸が、配列番号２０及び配列番号２７である、請求項５９に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項６１】
前記ヌクレアーゼが、塩基エディター酵素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である、請求項５８に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項６２】
前記塩基エディター酵素が、ヌクレオチドデアミナーゼである、請求項６１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項６３】
前記塩基エディター酵素が、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである、請求項６１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項６４】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である、請求項６１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項６５】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、Ｄ１０Ａ位に変異を含む、請求項６１～６４のいずれか１項に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項６６】
前記ＳｐＣａｓ９が、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む、請求項６５に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項６７】
造血器悪性腫瘍を治療する方法であって、前記方法が、ヒト対象に、
（ａ）請求項５１～６６のいずれか１項に記載のＨＳＰＣの集団と、
（ｂ）治療有効量の少なくとも１つの薬剤であって、（１）抗ＦＬＴ３抗体結合ドメインまたは抗ＦＬＴ３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片、及び／または（２）抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインまたは抗ＣＤ１２３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片の一方または両方を含む、前記薬剤と、を投与することを含む、前記方法。
【請求項６８】
前記少なくとも１つの薬剤が、前記抗ＦＬＴ３抗体結合ドメイン及び／または前記抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記造血器悪性腫瘍が、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、または芽球性形質細胞様樹状細胞白血病（ＢＰＣＤＮ）である、請求項６７に記載の方法。
【請求項７０】
前記ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、前記ヒト対象からの前記生体試料からの前記ＨＳＰＣを遺伝子操作し、それによって、前記遺伝子操作されたＨＳＰＣ

の集団を形成することと、をさらに含む、請求項６７に記載の方法。
【請求項７１】
前記生体試料が、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である、請求項７０に記載の方法。
【請求項７２】
遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）であって、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子を含み、前記遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子が、そのコードされたタンパク質の治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減するように操作される、前記遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）。
【請求項７３】
前記遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子が、前記ＫＩＴ遺伝子のエクソン７に少なくとも１つの変異を含む、請求項７２に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項７４】
前記遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子のエクソン７における少なくとも１つの変異が、Ｈ３７８位に変異を有するポリペプチドをもたらす、請求項７３に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項７５】
Ｈ３７８位の前記変異が、Ｈ３７８Ｒである、請求項７４に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項７６】
前記治療用抗ＫＩＴ抗体が、抗ＫＩＴクローンＦａｂ７９Ｄ抗体である、請求項７２に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項７７】
前記遺伝子操作されたＨＳＰＣが、ガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲシステムを使用して遺伝子操作される、請求項７２に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項７８】
ガイド核酸が、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、及び配列番号３９からなる群から選択される、請求項７２に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項７９】
前記ヌクレアーゼが、塩基エディター酵素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である、請求項７７に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項８０】
前記塩基エディター酵素が、ヌクレオチドデアミナーゼである、請求項７９に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項８１】
前記塩基エディター酵素が、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである、請求項７９に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項８２】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である、請求項７９に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項８３】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、Ｄ１０Ａ位に変異を含む、請求項７９～８２のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項８４】
前記ＳｐＣａｓ９が、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む、請求項８３に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣ。
【請求項８５】
遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団であって、請求項７２～８４のいずれか１項に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣを含む、前記遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団。

【請求項８６】
造血器悪性腫瘍を治療する方法であって、前記方法が、ヒト対象に、
（ａ）請求項８５に記載の遺伝子操作された造血幹細胞の集団と、
（ｂ）抗ＫＩＴ抗体結合ドメインまたは抗ＫＩＴ結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片を含む治療有効量の少なくとも１つの薬剤と、を投与することを含む、前記方法。
【請求項８７】
前記少なくとも１つの薬剤が、前記抗ＫＩＴ抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む、請求項８６に記載の方法。
【請求項８８】
前記造血器悪性腫瘍が、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、またはＴ急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）である、請求項８６に記載の方法。
【請求項８９】
前記ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、前記ヒト対象からの前記生体試料からの前記ＨＳＰＣを遺伝子操作し、それによって、前記遺伝子操作されたＨＳＰＣの集団を形成することと、をさらに含む、請求項８６に記載の方法。
【請求項９０】
前記生体試料が、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である、請求項８９に記載の方法。
【請求項９１】
遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団であって、
（ｉ）遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子であって、前記遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子が、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、前記遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子と、
（ｉｉ）遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子であって、前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子が、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子と、を含む、前記遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団。
【請求項９２】
前記遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子が、前記ＫＩＴ遺伝子のエクソン７に少なくとも１つの変異を含む、請求項９１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項９３】
前記遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子のエクソン７における少なくとも１つの変異が、Ｈ３７８位に変異を有するポリペプチドをもたらす、請求項９２に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項９４】
前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子が、前記ＣＤ１２３遺伝子のエクソン２に少なくとも１つの変異を含む、請求項９１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項９５】
前記遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン２における少なくとも１つの変異が、Ｓ５９位に変異を有するポリペプチドをもたらす、請求項９４に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項９６】
前記治療用抗ＫＩＴ抗体が、抗ＫＩＴクローンＦａｂ７９Ｄ抗体である、請求項９１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項９７】
前記治療用抗ＣＤ１２３抗体が、抗ＣＤ１２３クローン７Ｇ３抗体またはＣＳＬ３６２抗体である、請求項９１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項９８】
前記ＨＳＰＣの集団が、少なくとも２つのガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲシステムを使用して遺伝子操作される、請求項９１に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項９９】

前記少なくとも２つのガイド核酸が、１）配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、または配列番号３９、及び２）配列番号２４または配列番号２７である、請求項９８に記載のＨＳＰＣの集団。

【請求項１００】

前記少なくとも２つのガイド核酸が、配列番号３７及び配列番号２７である、請求項９９に記載のＨＳＰＣの集団。

【請求項１０１】

前記ヌクレアーゼが、塩基エディター酵素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である、請求項９８に記載のＨＳＰＣの集団。

【請求項１０２】

前記塩基エディター酵素が、ヌクレオチドデアミナーゼである、請求項１０１に記載のＨＳＰＣの集団。

【請求項１０３】

前記塩基エディター酵素が、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである、請求項１０１に記載のＨＳＰＣの集団。

【請求項１０４】

前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である、請求項１０１に記載のＨＳＰＣの集団。

【請求項１０５】

前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、Ｄ１０Ａ位に変異を含む、請求項１０１～１０４のいずれか１項に記載のＨＳＰＣの集団。

【請求項１０６】

前記ＳｐＣａｓ９が、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む、請求項１０５に記載のＨＳＰＣの集団。

【請求項１０７】

造血器悪性腫瘍を治療する方法であって、前記方法が、ヒト対象に、

（ａ）請求項９１～１０６のいずれか１項に記載のＨＳＰＣの集団と、

（ｂ）治療有効量の少なくとも１つの薬剤であって、（１）抗ＫＩＴ抗体結合ドメインまたは抗ＫＩＴ結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片、及び／または（２）抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインまたは抗ＣＤ１２３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片の一方または両方を含む、前記薬剤と、を投与することを含む、前記方法。

【請求項１０８】

前記少なくとも１つの薬剤が、前記抗ＫＩＴ抗体結合ドメイン及び／または前記抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む、請求項１０７に記載の方法。

【請求項１０９】

前記造血器悪性腫瘍が、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、または芽球性形質細胞様樹状細胞白血病（ＢＰＣＤＮ）である、請求項１０７に記載の方法。

【請求項１１０】

前記ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、前記ヒト対象からの前記生体試料からの前記ＨＳＰＣを遺伝子操作し、それによって、前記遺伝子操作されたＨＳＰＣの集団を形成することと、をさらに含む、請求項１０７に記載の方法。

【請求項１１１】

前記生体試料が、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である、請求項１１０に記載の方法。

【請求項１１２】

遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団であって、

（ｉ）遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子であって、前記遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子が、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、前記遺伝子

操作されたＦＬＴ３遺伝子と、
（ｉｉ）遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子であって、前記遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子が、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、前記遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子と、を含む、前記遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団。
【請求項１１３】
前記遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子が、前記ＦＬＴ３遺伝子のエクソン９に少なくとも１つの変異を含む、請求項１１２に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１１４】
前記遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子のエクソン９における少なくとも１つの変異が、Ｎ３９９位に変異を有するポリペプチドをもたらす、請求項１１３に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１１５】
前記遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子が、前記ＫＩＴ遺伝子のエクソン７に少なくとも１つの変異を含む、請求項１１２に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１１６】
前記遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子のエクソン７における少なくとも１つの変異が、Ｈ３７８位に変異を有するポリペプチドをもたらす、請求項１１５に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１１７】
前記治療用抗ＦＬＴ３抗体が、抗ＦＬＴ３クローン４Ｇ８抗体である、請求項１１２に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１１８】
前記治療用抗ＫＩＴ抗体が、抗ＫＩＴクローンＦａｂ７９Ｄ抗体である、請求項１１２に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１１９】
前記ＨＳＰＣの集団が、少なくとも２つのガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲシステムを使用して遺伝子操作される、請求項１１２に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１２０】
前記少なくとも２つのガイド核酸が、１）配列番号１８または配列番号２０、及び２）配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、または配列番号３９である、請求項１１９に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１２１】
前記少なくとも２つのガイド核酸が、配列番号２０及び配列番号３７である、請求項１２０に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１２２】
前記ヌクレアーゼが、塩基エディター酵素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である、請求項１１９に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１２３】
前記塩基エディター酵素が、ヌクレオチドデアミナーゼである、請求項１２２に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１２４】
前記塩基エディター酵素が、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである、請求項１２２に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１２５】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である、請求項１２２に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１２６】
前記触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９が、Ｄ１０Ａ位に変異を含む、請求項１２２～１２５のいずれか１項に記載のＨＳＰＣの集団。
【請求項１２７】

前記ＳｐＣａｓ９が、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む、請求項１２６に記載のＨＳＰＣの集団。

【請求項１２８】

造血器悪性腫瘍を治療する方法であって、前記方法が、ヒト対象に、

（ａ）請求項１１２～１２７のいずれか１項に記載のＨＳＰＣの集団と、

（ｂ）治療有効量の少なくとも１つの薬剤であって、（１）抗ＦＬＴ３抗体結合ドメインまたは抗ＦＬＴ３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片、及び／または（２）抗ＫＩＴ抗体結合ドメインまたは抗ＫＩＴ結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片の一方または両方を含む、前記薬剤と、を投与することを含む、前記方法。

【請求項１２９】

前記少なくとも１つの薬剤が、前記抗ＦＬＴ３抗体結合ドメイン及び／または前記抗ＫＩＴ抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む、請求項１２８に記載の方法。

【請求項１３０】

前記造血器悪性腫瘍が、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、または芽球性形質細胞様樹状細胞白血病（ＢＰＣＤＮ）である、請求項１２８に記載の方法。

【請求項１３１】

前記ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、前記ヒト対象からの前記生体試料からの前記ＨＳＰＣを遺伝子操作し、それによって、前記遺伝子操作されたＨＳＰＣの集団を形成することと、をさらに含む、請求項１２８に記載の方法。

【請求項１３２】

前記生体試料が、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である、請求項１３１に記載の方法。

【請求項１３３】

ポリペプチドを含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）であって、

（ａ）１つ以上の細胞表面系統特異的タンパク質のエピトープに結合する、１つ以上のエピトープ結合断片、

（ｂ）ヒンジドメイン、

（ｃ）膜貫通ドメイン、

（ｄ）共刺激ドメイン、及び

（ｅ）細胞質シグナル伝達ドメインを含み、

前記１つ以上の細胞表面系統特異的タンパク質が、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及び／またはＫＩＴから選択される、前記キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）。

【請求項１３４】

前記細胞表面系統特異的タンパク質が、ＦＬＴ３であり、前記ＣＡＲが、配列番号７３のアミノ酸配列を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。

【請求項１３５】

前記細胞表面系統特異的タンパク質が、ＦＬＴ３であり、前記１つ以上のエピトープ結合断片が、配列番号７３からの前記１つ以上のエピトープ結合断片を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。

【請求項１３６】

前記細胞表面系統特異的タンパク質が、ＦＬＴ３であり、前記１つ以上のエピトープ結合断片が、以下のＣＤＲ配列：ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＨ（配列番号９６）、ＥＩＤＰＳＤＳＹＫＤＹＮＱＫＦＫ（配列番号９７）、ＲＡＩＴＴＴＰＦＤＦ（配列番号９８）、ＲＡＳＱＳＩＳＮＮＬＨ（配列番号９９）、ＹＡＳＱＳＩＳ（配列番号１００）、及びＱＱＳＮＴＷＰＹＴ（配列番号１０１）を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。

【請求項１３７】

前記細胞表面系統特異的タンパク質が、ＣＤ１２３であり、前記ＣＡＲが、配列番号７５、配列番号８６、または配列番号８７のアミノ酸配列を含む、請求項１３３に記載のＣ

ＡＲ。
【請求項１３８】
前記細胞表面系統特異的タンパク質が、ＣＤ１２３であり、前記１つ以上のエピトープ結合断片が、配列番号７５、配列番号８６、または配列番号８７からの前記１つ以上のエピトープ結合断片を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。
【請求項１３９】
前記細胞表面系統特異的タンパク質が、ＣＤ１２３であり、前記１つ以上のエピトープ結合断片が、以下のＣＤＲ配列：ＧＹＳＦＴＤＹＹＭＫ（配列番号１０４）、ＤＩＩＰＳＮＧＡＴＦＹＮＱＫＦＫＧ（配列番号１０５）、ＡＲＳＨＬＬＲＡＳＷＦＡＹ（配列番号１０６）、ＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴ（配列番号１０７）、ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号１０８）、及びＱＮＤＹＳＹＰＹＴ（配列番号１０９）を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。
【請求項１４０】
前記細胞表面系統特異的タンパク質が、ＣＤ１２３であり、前記１つ以上のエピトープ結合断片が、以下のＣＤＲ配列：ＤＩＩＰＳＮＧＡＴＦＹＮＱＫＦＫＧ（配列番号１０５）、ＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴ（配列番号１０７）、ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号１０８）、及びＱＮＤＹＳＹＰＹＴ（配列番号１０９）を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。
【請求項１４１】
前記細胞表面系統特異的タンパク質が、ＫＩＴであり、前記ＣＡＲが、配列番号６９または配列番号７１のアミノ酸配列を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。
【請求項１４２】
前記細胞表面系統特異的タンパク質が、ＫＩＴであり、前記１つ以上のエピトープ結合断片が、配列番号６９または配列番号７１からの前記１つ以上のエピトープ結合断片を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。
【請求項１４３】
前記細胞表面系統特異的タンパク質が、ＫＩＴであり、前記１つ以上のエピトープ結合断片が、以下のＣＤＲ配列：ＧＦＮＩＳＶＹＭＭＨ（配列番号８８）、ＳＩＹＰＹＳＧＹＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号８９）、ＡＲＹＶＹＨＡＬＤＹ（配列番号９０）、ＲＡＳＱＲＧＬＲＮＶＡＶＡ（配列番号９１）、ＳＡＳＳＬＹＳ（配列番号９２）、及びＱＱＷＡＶＨＳＬＩＴ（配列番号９３）を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。
【請求項１４４】
前記１つ以上の細胞表面系統特異的タンパク質が、ＦＬＴ３及びＣＤ１２３であり、前記ＣＡＲが、配列番号７７または配列番号７９のアミノ酸配列を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。
【請求項１４５】
前記１つ以上の細胞表面系統特異的タンパク質が、ＦＬＴ３及びＣＤ１２３であり、前記１つ以上のエピトープ結合断片が、配列番号７７または配列番号７９からの前記１つ以上のエピトープ結合断片を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。
【請求項１４６】
前記１つ以上の細胞表面系統特異的タンパク質が、ＦＬＴ３及びＣＤ１２３であり、前記１つ以上のエピトープ結合断片が、以下のＣＤＲ配列：ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＨ（配列番号９６）、ＥＩＤＰＳＤＳＹＫＤＹＮＱＫＦＫ（配列番号９７）、ＲＡＩＴＴＴＰＦＤＦ（配列番号９８）、ＲＡＳＱＳＩＳＮＮＬＨ（配列番号９９）、ＹＡＳＱＳＩＳ（配列番号１００）、ＱＱＳＮＴＷＰＹＴ（配列番号１０１）、ＧＹＳＦＴＤＹＹＭＫ（配列番号１０４）、ＤＩＩＰＳＮＧＡＴＦＹＮＱＫＦＫＧ（配列番号１０５）、ＡＲＳＨＬＬＲＡＳＷＦＡＹ（配列番号１０６）、ＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴ（配列番号１０７）、ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号１０８）、及びＱＮＤＹＳＹＰＹＴ（配列番号１０９）を含む、請求項１３３に記載のＣＡＲ。
【請求項１４７】

前記ヒンジドメインが、ＣＤ２８ヒンジ、ＩｇＧ４ヒンジ、またはＣＤ８αヒンジである、請求項１３３～１４６のいずれか１項に記載のＣＡＲ。
【請求項１４８】
前記膜貫通ドメインが、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ８α　ＴＭ、または４－１ＢＢ　ＴＭである、請求項１３３～１４７のいずれか１項に記載のＣＡＲ。
【請求項１４９】
前記共刺激ドメインが、ＣＤ２８ｚ、４－１ＢＢ、ＩＣＯＳ、またはＯＸ４０である、請求項１３３～１４８のいずれか１項に記載のＣＡＲ。
【請求項１５０】
前記細胞質シグナル伝達ドメインが、ＣＤ３ｚである、請求項１３３～１４９のいずれか１項に記載のＣＡＲ。
【請求項１５１】
請求項１３３～１５０のいずれか１項に記載のＣＡＲを発現する、細胞。
【請求項１５２】
前記細胞が、免疫細胞である、請求項１５１に記載の細胞。
【請求項１５３】
前記免疫細胞が、Ｔ細胞である、請求項１５２に記載の細胞。
【請求項１５４】
造血器悪性腫瘍を治療する方法であって、前記方法が、ヒト対象に、
（ａ）遺伝子操作された造血幹細胞の集団と、
（ｂ）請求項１５１～１５３のいずれか１項に記載の細胞と、を投与することを含む、前記方法。
【請求項１５５】
配列番号５１に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列であって、前記ポリペプチド配列が、Ｎ３９９Ｄに変異を含み、前記ポリペプチド配列は、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減している、前記ポリペプチド配列。
【請求項１５６】
配列番号５２に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列であって、前記ポリペプチド配列が、Ｎ３９９Ｇに変異を含み、前記ポリペプチド配列は、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減している、前記ポリペプチド配列。
【請求項１５７】
配列番号５４に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列であって、前記ポリペプチド配列が、Ｓ５９Ｐに変異を含み、前記ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している、前記ポリペプチド配列。
【請求項１５８】
配列番号５５に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列であって、前記ポリペプチド配列が、Ｙ５８Ｈ及びＳ５９Ｐに変異を含み、前記ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している、前記ポリペプチド配列。
【請求項１５９】
配列番号５６に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列であって、前記ポリペプチド配列が、Ｓ５９Ｆに変異を含み、前記ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している、前記ポリペプチド配列。
【請求項１６０】
配列番号５７に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列であって、前記ポリペプチド配列が、Ｐ８８Ｓに変異を含み、前記ポリペ

プチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している、前記ポリペプチド配列。
【請求項１６１】
配列番号５８に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列であって、前記ポリペプチド配列が、Ｐ８８Ｌに変異を含み、前記ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している、前記ポリペプチド配列。
【請求項１６２】
配列番号６７に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列であって、前記ポリペプチド配列が、Ｆ３１６Ｓ、Ｍ３１８Ｖ、Ｉ３１９Ｋ、Ｖ３２３Ｉ、Ｉ３３４Ｖ、Ｅ３６０Ｋ、Ｐ３６３Ｖ、Ｅ３６６Ｄ、Ｅ３７６Ｑ、及びＨ３７８Ｒに変異を含み、前記ポリペプチド配列は、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減している、前記ポリペプチド配列。
【請求項１６３】
配列番号６８に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列であって、前記ポリペプチド配列が、Ｈ３７８Ｒに変異を含み、前記ポリペプチド配列は、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減している、前記ポリペプチド配列。
【請求項１６４】
請求項１５５～１６３のいずれか１項に記載のポリペプチドをコードする、核酸。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本発明は、２０２２年２月１８日に出願された米国仮出願第６３／３１１，７０７号、及び２０２２年１１月１７日に出願された米国仮出願第６３／４２６，１３８号の優先権の利益を主張し、これらの内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本明細書では、免疫療法（すなわち、キメラ抗原受容体Ｔ細胞などの細胞傷害性薬剤）と組み合わせて使用することができる、細胞表面タンパク質の１つ以上の遺伝子編集された遺伝子を有する造血幹細胞などの遺伝子操作された造血細胞、それを使用する。
【背景技術】
【０００３】
遺伝子導入における技術革新により、免疫細胞を、がん細胞で発現する標的分子へと再プログラムすることが可能になった。非常に有望な結果により、ＦＤＡは、Ｂリンパ芽球性白血病の治療のために、ＣＤ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞として知られる最初の養子細胞免疫療法を承認した。これらの成功は腫瘍学分野に革命をもたらすことが期待されるが、ほとんどの好適な候補は健康な骨髄細胞と共有されることが多く、免疫抑制及び重度の造血毒性を引き起こすため、それらの応用は妨げられてきた。抗骨髄／幹細胞ＣＡＲ－Ｔ誘発性毒性により、ＨＳＣＴ前の限られた時間枠での救済療法への適用可能性が制限され、疾患の根絶には不十分な場合がある。したがって、正常な細胞集団を標的化または損傷することなく、目的の細胞、例えば、がん細胞を効果的に標的化するアンメットニーズが依然として存在する。
【発明の概要】
【０００４】
本開示は概して、細胞表面タンパク質の１つ以上の遺伝子編集された遺伝子を有する造血幹細胞などの遺伝子操作された造血細胞、及び同じ細胞表面タンパク質を標的とすることができるキメラ抗原受容体に関する。
【０００５】
一実施形態では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子を含む遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）が提供され、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子は、そのコードされたタンパ

ク質の治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減するように操作される。実施形態では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子は、ＦＬＴ３遺伝子のエクソン９に少なくとも１つの変異を含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子のエクソン９における少なくとも１つの変異により、Ｎ３９９位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。一実施形態では、Ｎ３９９位の変異は、Ｎ３９９ＤまたはＮ３９９Ｇである。実施形態では、治療用抗ＦＬＴ３抗体は、抗ＦＬＴ３クローン４Ｇ８抗体である。一実施形態では、治療用抗ＦＬＴ３抗体は、４Ｇ８抗体と同じ６つのＣＤＲを有するか、またはそれと競合する抗体である。一実施形態では、遺伝子操作されたＨＳＰＣは、ガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲ系を使用して遺伝子操作されている。一実施形態では、ヌクレアーゼは、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９（ＳｐＣａｓ９）、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ（ＳａＣａｓ９）、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌Ｃａｓ１２ａ（ＬｂＣａｓ１２ａ）、またはＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６（ＡｓＣａｓ１２ａ）のいずれかである。一実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムは、ＳｐＣａｓ９を含む。一実施形態では、ガイド核酸は、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、及び配列番号１６からなる群から選択される。一実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムは、鋳型ＤＮＡをさらに含む。一実施形態では、鋳型ＤＮＡは、配列番号４０、配列番号４１、配列番号４２、及び配列番号４３からなる群から選択される。一実施形態では、ヌクレアーゼは、塩基エディター酵素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、塩基エディター酵素はヌクレオチドデアミナーゼである。一実施形態では、ヌクレオチドデアミナーゼは、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである。別の実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、Ｄ１０Ａ位に変異を含む。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む。一実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号１７、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２０、及び配列番号２３からなる群から選択される。一実施形態では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子は、配列番号５１または配列番号５２のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。同様に提供するのは、上述の遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）を含む、遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団である。いくつかの実施形態では、造血器悪性腫瘍を治療する方法であって、本方法は、ヒト対象に、（ａ）上述の遺伝子操作された造血幹細胞の集団と、（ｂ）抗ＦＬＴ３抗体結合ドメインまたは抗ＦＬＴ３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片を含む治療有効量の少なくとも１つの薬剤と、を投与することを含む、方法が提供される。一実施形態では、少なくとも１つの薬剤は、抗ＦＬＴ３抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む。一実施形態では、造血器悪性腫瘍は、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、またはＴ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）である。一実施形態では、方法は、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを遺伝子操作し、それにより、遺伝子操作されたＨＳＰＣの集団を形成することとをさらに含む。一実施形態では、生体試料は、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である。

【０００６】

また、一実施形態では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子を含む遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）が提供され、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子は、そのコードされたタンパク質の治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減するように操作される。一実施形態では、治療用抗ＣＤ１２３抗体は、クローン７Ｇ３抗体またはそのヒト化対応物ＣＳＬ３６２である。実施形態では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子は、ＣＤ１２３遺伝子のエクソン２に少なくとも１つの変異を含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン２における少なくとも１つの変異により、Ｓ５９位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。一実施形態では、Ｓ５９での変異は、Ｓ５９ＰまたはＳ５９Ｆである。一実施形態では、治療用抗ＣＤ１２３抗体は、抗ＣＤ１２３クローン６Ｈ

６抗体または抗ＣＤ１２３クローンＳ１８０１６Ｆ抗体である。一実施形態では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子は、ＣＤ１２３遺伝子のエクソン３に少なくとも１つの変異を含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン３における少なくとも１つの変異により、Ｐ８８位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。一実施形態では、Ｐ８８での変異は、Ｐ８８ＬまたはＰ８８Ｓである。一実施形態では、遺伝子操作されたＨＳＰＣは、ガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲ系を使用して遺伝子操作されている。一実施形態では、ガイド核酸は、配列番号２４、配列番号２７、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３３、及び配列番号３４からなる群から選択される。一実施形態では、ヌクレアーゼは、塩基エディター酵素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、塩基エディター酵素はヌクレオチドデアミナーゼである。一実施形態では、塩基エディター酵素は、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、Ｄ１０Ａ位に変異を含む。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子は、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、または配列番号５８のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。また、上述の遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）を含む、遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団が本明細書で提供される。また、造血器悪性腫瘍を治療する方法が提供され、本方法は、ヒト対象に、（ａ）上述の遺伝子操作された造血幹細胞の集団と、（ｂ）抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインまたは抗ＣＤ１２３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片を含む治療有効量の少なくとも１つの薬剤と、を投与することを含む。一実施形態では、少なくとも１つの薬剤は、抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む。一実施形態では、造血器悪性腫瘍は、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、または芽球性形質細胞様樹状細胞白血病（ＢＰＣＤＮ）である。一実施形態では、方法は、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを遺伝子操作し、それにより、遺伝子操作されたＨＳＰＣの集団を形成することとをさらに含む。実施形態では、生体試料は、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である。

【０００７】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団が提供され、（ｉ）遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子であって、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子が、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子と、（ｉｉ）遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子であって、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子が、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子と、を含む。実施形態では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子は、ＦＬＴ３遺伝子のエクソン９に少なくとも１つの変異を含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子のエクソン９における少なくとも１つの変異により、Ｎ３９９位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。実施形態では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子は、ＣＤ１２３遺伝子のエクソン２に少なくとも１つの変異を含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン２における少なくとも１つの変異により、Ｓ５９位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。実施形態では、治療用抗ＦＬＴ３抗体は、抗ＦＬＴ３クローン４Ｇ８抗体である。一実施形態では、治療用の抗ＣＤ１２３抗体は、抗ＣＤ１２３クローン７Ｇ３抗体またはＣＳＬ３６２抗体である。一実施形態では、ＨＳＰＣの集団は、少なくとも２つのガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲシステムを使用して遺伝子操作される。一実施形態では、少なくとも２つのガイド核酸は、１）配列番号１８または配列番号２０、及び２）配列番号２４または配列番号２７である。一実施形態では、少なくとも２つのガイド核酸は、配列番号２０及び配列番号２７である。一実施形態では、ヌクレアーゼは、塩基エディター酵

素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、塩基エディター酵素はヌクレオチドデアミナーゼである。一実施形態では、塩基エディター酵素は、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、Ｄ１０Ａ位に変異を含む。一実施形態では、ＳｐＣａｓ９は、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む。また、造血器悪性腫瘍を治療する方法が提供され、本方法は、ヒト対象に、（ａ）上述のＨＳＰＣの集団と、（ｂ）治療有効量の少なくとも１つの薬剤であって、（１）抗ＦＬＴ３抗体結合ドメインまたは抗ＦＬＴ３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片、及び／または（２）抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインまたは抗ＣＤ１２３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片の一方または両方を含む、薬剤と、を投与することを含む。一実施形態では、少なくとも１つの薬剤は、抗ＦＬＴ３抗体結合ドメイン及び／または抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む。一実施形態では、造血器悪性腫瘍は、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、または芽球性形質細胞様樹状細胞白血病（ＢＰＣＤＮ）である。一実施形態では、方法は、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを遺伝子操作し、それにより、遺伝子操作されたＨＳＰＣの集団を形成することとをさらに含む。一実施形態では、生体試料は、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である。

【０００８】

また、一実施形態では、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子を含む遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）が提供され、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子が、そのコードされたタンパク質の治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減するように操作される。一実施形態では、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子は、ＫＩＴ遺伝子のエクソン７に少なくとも１つの変異を含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子のエクソン７における少なくとも１つの変異により、Ｈ３７８位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。一実施形態では、Ｈ３７８位の変異は、Ｈ３７８Ｒである。一実施形態では、治療用抗ＫＩＴ抗体は、抗ＫＩＴクローンＦａｂ７９Ｄ抗体である。一実施形態では、遺伝子操作されたＨＳＰＣは、ガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲ系を使用して遺伝子操作されている。一実施形態では、ガイド核酸は、配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、及び配列番号３９からなる群から選択される。一実施形態では、ヌクレアーゼは、塩基エディター酵素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、塩基エディター酵素は、ヌクレオチドデアミナーゼである。一実施形態では、塩基エディター酵素は、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、Ｄ１０Ａ位に変異を含む。一実施形態では、ＳｐＣａｓ９は、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む。同様に提供するのは、上述の遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）を含む、遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団である。また、造血器悪性腫瘍を治療する方法が提供され、本方法は、ヒト対象に、（ａ）上述の遺伝子操作された造血幹細胞の集団と、（ｂ）抗ＫＩＴ抗体結合ドメインまたは抗ＫＩＴ抗体結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片を含む治療有効量の少なくとも１つの薬剤と、を投与することを含む。一実施形態では、少なくとも１つの薬剤は、抗ＫＩＴ抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む。一実施形態では、造血器悪性腫瘍は、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、またはＴ急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）である。一実施形態では、方法は、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを遺伝子操作し、それにより、遺伝子操作されたＨＳＰＣの集団を形成することとをさらに含む。実施形態では、生体試料は、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である。

【０００９】
また、いくつかの実施形態では、遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団も提供され、（ｉ）遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子であって、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子が、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子と、（ｉｉ）遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子であって、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子が、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子と、を含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子は、ＫＩＴ遺伝子のエクソン７に少なくとも１つの変異を含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子のエクソン７における少なくとも１つの変異により、Ｈ３７８位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。実施形態では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子は、ＣＤ１２３遺伝子のエクソン２に少なくとも１つの変異を含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン２における少なくとも１つの変異により、Ｓ５９位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。一実施形態では、治療用抗ＫＩＴ抗体は、抗ＫＩＴクローンＦａｂ７９Ｄ抗体である。一実施形態では、治療用の抗ＣＤ１２３抗体は、抗ＣＤ１２３クローン７Ｇ３抗体またはＣＳＬ３６２抗体である。一実施形態では、ＨＳＰＣの集団は、少なくとも２つのガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲシステムを使用して遺伝子操作される。一実施形態では、少なくとも２つのガイド核酸は、１）配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、または配列番号３９、及び２）配列番号２４または配列番号２７である。一実施形態では、少なくとも２つのガイド核酸は、配列番号３７及び配列番号２７である。一実施形態では、ヌクレアーゼは、塩基エディター酵素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、塩基エディター酵素はヌクレオチドデアミナーゼである。一実施形態では、塩基エディター酵素は、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、Ｄ１０Ａ位に変異を含む。一実施形態では、ＳｐＣａｓ９は、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む。また、造血器悪性腫瘍を治療する方法が提供され、本方法は、ヒト対象に、（ａ）上述のＨＳＰＣの集団と、（ｂ）治療有効量の少なくとも１つの薬剤であって、（１）抗ＫＩＴ抗体結合ドメインまたは抗ＫＩＴ結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片、及び／または（２）抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインまたは抗ＣＤ１２３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片の一方または両方を含む、薬剤と、を投与することを含む。一実施形態では、少なくとも１つの薬剤は、抗ＫＩＴ抗体結合ドメイン及び／または抗ＣＤ１２３抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む。一実施形態では、造血器悪性腫瘍は、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、または芽球性形質細胞様樹状細胞白血病（ＢＰＣＤＮ）である。一実施形態では、方法は、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを遺伝子操作し、それにより、遺伝子操作されたＨＳＰＣの集団を形成することとをさらに含む。実施形態では、生体試料は、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である。

【００１０】
また、遺伝子操作された造血幹細胞（ＨＳＰＣ）の集団が提供され、（ｉ）遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子であって、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子が、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子と、（ｉｉ）遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子であって、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子が、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減したタンパク質をコードする、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子と、を含む。実施形態では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子は、ＦＬＴ３遺伝子のエクソン９に少なくとも１つの変異を含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子のエクソン９における少なくとも１つの変異により、Ｎ３９９位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。一実施形態では、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子は、ＫＩ

Ｔ遺伝子のエクソン７に少なくとも１つの変異を含む。一実施形態では、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子のエクソン７における少なくとも１つの変異により、Ｈ３７８位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。実施形態では、治療用抗ＦＬＴ３抗体は、抗ＦＬＴ３クローン４Ｇ８抗体である。一実施形態では、治療用抗ＫＩＴ抗体は、抗ＫＩＴクローンＦａｂ７９Ｄ抗体である。一実施形態では、ＨＳＰＣの集団は、少なくとも２つのガイド核酸及びヌクレアーゼを含むＣＲＩＳＰＲシステムを使用して遺伝子操作される。一実施形態では、少なくとも２つのガイド核酸は、１）配列番号１８または配列番号２０、及び２）配列番号３６、配列番号３７、配列番号３８、または配列番号３９である。一実施形態では、少なくとも２つのガイド核酸は、配列番号２０及び配列番号３７である。一実施形態では、ヌクレアーゼは、塩基エディター酵素に連結された触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、塩基エディター酵素はヌクレオチドデアミナーゼである。一実施形態では、塩基エディター酵素は、シトシンデアミナーゼまたはアデノシンデアミナーゼのいずれかである。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９またはＳｐＲＹ－ＳｐＣａｓ９である。一実施形態では、触媒作用に障害のあるＳｐＣａｓ９は、Ｄ１０Ａ位に変異を含む。一実施形態では、ＳｐＣａｓ９は、Ｋ９１８Ｎ位に変異をさらに含む。また、造血器悪性腫瘍を治療する方法が提供され、本方法は、ヒト対象に、（ａ）上述のＨＳＰＣの集団と、（ｂ）治療有効量の少なくとも１つの薬剤であって、（１）抗ＦＬＴ３抗体結合ドメインまたは抗ＦＬＴ３結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片、及び／または（２）抗ＫＩＴ抗体結合ドメインまたは抗ＫＩＴ結合ドメインを含む抗体もしくは抗体断片の一方または両方を含む、薬剤と、を投与することを含む。一実施形態では、少なくとも１つの薬剤は、抗ＦＬＴ３抗体結合ドメイン及び／または抗ＫＩＴ抗体結合ドメインを含むキメラ抗原受容体－Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞を含む。一実施形態では、造血器悪性腫瘍は、Ｂリンパ芽球性白血病（ＢＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、または芽球性形質細胞様樹状細胞白血病（ＢＰＣＤＮ）である。一実施形態では、方法は、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを得ることと、ヒト対象からの生体試料からＨＳＰＣを遺伝子操作し、それにより、遺伝子操作されたＨＳＰＣの集団を形成することとをさらに含む。実施形態では、生体試料は、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である。

【００１１】

また、いくつかの実施形態では、以下を含むポリペプチドを含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）が提供され、（ａ）１つ以上の細胞表面系統特異的タンパク質のエピトープに結合する１つ以上のエピトープ結合断片、（ｂ）ヒンジドメイン、（ｃ）膜貫通ドメイン、（ｄ）共刺激ドメイン、及び（ｅ）細胞質シグナル伝達ドメインを含み、１つ以上の細胞表面系統特異的タンパク質が、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及び／またはＫＩＴから選択される。

【００１２】

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は、ＦＬＴ３であり、ＣＡＲは、配列番号７３のアミノ酸配列を含む。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は、ＦＬＴ３であり、１つ以上のエピトープ結合断片は、配列番号７３からの１つ以上のエピトープ結合断片を含む。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は、ＦＬＴ３であり、１つ以上のエピトープ結合断片は、以下のＣＤＲ配列：ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＨ（配列番号９６）、ＥＩＤＰＳＤＳＹＫＤＹＮＱＫＦＫ（配列番号９７）、ＲＡＩＴＴＴＰＦＤＦ（配列番号９８）、ＲＡＳＱＳＩＳＮＮＬＨ（配列番号９９）、ＹＡＳＱＳＩＳ（配列番号１００）、及びＱＱＳＮＴＷＰＹＴ（配列番号１０１）を含む。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は、ＣＤ１２３であり、ＣＡＲは、配列番号７５、配列番号８６、または配列番号８７のアミノ酸配列を含む。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は、ＣＤ１２３であり、１つ以上のエピトープ結合断片は、配列番号７５、配列番号８６、または配列番号８７からの１つ以上のエピトープ結合断片を含む。いくつかの実施形態では、細胞表面系統特異的タンパ

ク質は、ＣＤ１２３であり、１つ以上のエピトープ結合断片は、以下のＣＤＲ配列：ＧＹＳＦＴＤＹＹＭＫ（配列番号１０４）、ＤＩＩＰＳＮＧＡＴＦＹＮＱＫＦＫＧ（配列番号１０５）、ＡＲＳＨＬＬＲＡＳＷＦＡＹ（配列番号１０６）、ＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴ（配列番号１０７）、ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号１０８）、及びＱＮＤＹＳＹＰＹＴ（配列番号１０９）を含む。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は、ＣＤ１２３であり、１つ以上のエピトープ結合断片は、以下のＣＤＲ配列：ＤＩＩＰＳＮＧＡＴＦＹＮＱＫＦＫＧ（配列番号１０５）、ＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴ（配列番号１０７）、ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号１０８）、及びＱＮＤＹＳＹＰＹＴ（配列番号１０９）を含む。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は、ＫＩＴであり、ＣＡＲは、配列番号６９または配列番号７１のアミノ酸配列を含む。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は、ＫＩＴであり、１つ以上のエピトープ結合断片は、配列番号６９または配列番号７１からの１つ以上のエピトープ結合断片を含む。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は、ＫＩＴであり、１つ以上のエピトープ結合断片は、以下のＣＤＲ配列：ＧＦＮＩＳＶＹＭＭＨ（配列番号８８）、ＳＩＹＰＹＳＧＹＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号８９）、ＡＲＹＶＹＨＡＬＤＹ（配列番号９０）、ＲＡＳＱＲＧＬＲＮＶＡＶＡ（配列番号９１）、ＳＡＳＳＬＹＳ（配列番号９２）、及びＱＱＷＡＶＨＳＬＩＴ（配列番号９３）を含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞表面系統特異的タンパク質は、ＦＬＴ３及びＣＤ１２３であり、ＣＡＲは、配列番号７７または配列番号７９のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞表面系統特異的タンパク質は、ＦＬＴ３及びＣＤ１２３であり、１つ以上のエピトープ結合断片は、配列番号７７または配列番号７９からの１つ以上のエピトープ結合断片を含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞表面系統特異的タンパク質は、ＦＬＴ３及びＣＤ１２３であり、１つ以上のエピトープ結合断片は、以下のＣＤＲ配列：ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＨ（配列番号９６）、ＥＩＤＰＳＤＳＹＫＤＹＮＱＫＦＫ（配列番号９７）、ＲＡＩＴＴＴＰＦＤＦ（配列番号９８）、ＲＡＳＱＳＩＳＮＮＬＨ（配列番号９９）、ＹＡＳＱＳＩＳ（配列番号１００）、ＱＱＳＮＴＷＰＹＴ（配列番号１０１）、ＧＹＳＦＴＤＹＹＭＫ（配列番号１０４）、ＤＩＩＰＳＮＧＡＴＦＹＮＱＫＦＫＧ（配列番号１０５）、ＡＲＳＨＬＬＲＡＳＷＦＡＹ（配列番号１０６）、ＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴ（配列番号１０７）、ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号１０８）、及びＱＮＤＹＳＹＰＹＴ（配列番号１０９）を含む。上記ＣＡＲのいずれかのいくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、ＣＤ２８ヒンジ、ＩｇＧ４ヒンジ、またはＣＤ８αヒンジである。上述のＣＡＲのいずれかのいくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ８α　ＴＭ、または４－１ＢＢ　ＴＭである。上記のＣＡＲのいずれかのいくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、ＣＤ２８ｚ、４－１ＢＢ、ＩＣＯＳ、またはＯＸ４０である。上述のＣＡＲのいずれかのいくつかの実施形態では、細胞質シグナル伝達ドメインは、ＣＤ３ｚである。

【００１３】

本明細書ではまた、上述のＣＡＲのいずれかを発現する細胞も提供される。いくつかの実施形態では、細胞は免疫細胞である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、Ｔ細胞である。

【００１４】

また、造血器悪性腫瘍を治療する方法が本明細書で提供され、本方法は、ヒト対象に、（ａ）遺伝子操作された造血幹細胞の集団（例えば、上述したもののうちのいずれか）、及び（ｂ）上述のＣＡＲのうちのいずれかを発現する細胞（例えば、免疫細胞）を投与することを含む。

【００１５】

また、配列番号５１に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｎ３９９Ｄに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減している。

【００１６】

また、配列番号５２に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｎ３９９Ｇに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減している。

【００１７】

また、配列番号５４に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｓ５９Ｐに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している。

【００１８】

また、配列番号５５に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｙ５８Ｈ及びＳ５９Ｐに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している。

【００１９】

また、配列番号５６に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｓ５９Ｆに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している。

【００２０】

また、配列番号５７に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｐ８８Ｓに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している。

【００２１】

また、配列番号５８に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｐ８８Ｌに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している。

【００２２】

また、配列番号６７に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｆ３１６Ｓ、Ｍ３１８Ｖ、Ｉ３１９Ｋ、Ｖ３２３Ｉ、Ｉ３３４Ｖ、Ｅ３６０Ｋ、Ｐ３６３Ｖ、Ｅ３６６Ｄ、Ｅ３７６Ｑ、及びＨ３７８Ｒに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減している。

【００２３】

また、配列番号６８に示される配列と少なくとも８０％同一であるポリペプチド配列を含むポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｈ３７８Ｒに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減している。

【００２４】

また、上述のポリペプチドのいずれかをコードする核酸が本明細書で提供される。

【００２５】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本発明で使用するための方法及び材料は本明細書に記載されている。当該技術分野で既知の他の好適な方法及び材料も使用することができる。材料、方法、及び実施例は単なる例示であり、限定することを意図するものではない。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によってその全体が組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先される。

【００２６】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の発明を実施するための形態及び図面から、ならびに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００２７】

【図１】ＦＬＴ３またはＫＩＴなどの遺伝子によってコードされるサイトカイン受容体の

構造の図である。図１（左）は、細胞外ドメインに変異を導入することによって治療用抗体の結合を無効にするためのエピトープ操作アプローチを例示する。図１（右）は、エピトープ操作された表面タンパク質の主な特徴：リガンド親和性、タンパク質機能、及び細胞内シグナル伝達の維持による抗体認識の喪失を示す。

【図２－１】図２（左）は、異なる抗体クローンによるかかるバリアントの認識を評価するために、またはフローサイトメトリーによってリガンド親和性を測定するために、ヒトまたはマウス細胞株に所望の受容体バリアントのｃＤＮＡ配列を導入するためのトランスファーベクター設計を含むスリーピングビューティートランスポザーゼ実験の概略図である。Ｌｏｎｚａ　４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒを使用して、Ｋ５６２細胞に１００ｎｇのトランスファープラスミド及び５００ｎｇのｐＳＢ１００ｘトランスポザーゼをエレクトロポレーションした。図２（右）は、ヒト野生型ＦＬＴ３（ｈＦＬＴ３）、マウスＦＬＴ３（ｍＦＬＴ３）、及び細胞外ドメイン４内にアミノ酸置換を有するエピトープ修飾バリアントｅＦＬＴ３－０１をスリーピングビューティートランスポザーゼによって形質導入したＫ５６２細胞のフローサイトメトリープロットを示す。形質導入細胞は、ｍＣｈｅｒｒｙ蛍光（ｙ軸）によって同定される。細胞を、ＦＬＴ３　ＢＶ１０Ａ４クローン（対照抗体、ＥＣＤ２に結合）、ＦＬＴ３　４Ｇ８治療用クローン（ＥＣＤ４に結合）、抗マウスＦＬＴ３抗体、及びＡＦ４８８－コンジュゲートヒトＦＬＴ３Ｌのいずれかで染色し、結合親和性を評価した。

【図２－２】上記のとおり。

【図２－３】上記のとおり。

【図３】図３（上）は、ヒトＦＬＴ３細胞外ドメイン４といくつかの動物種のオルソログ遺伝子との配列アラインメントである。黒色の長方形は、ｅＦＬＴ３－０１において変異され、図５に示されるコンビナトリアルライブラリに含まれる、あまり保存されていない残基を強調する。図３（下）は、ヒトＫＩＴ細胞外ドメイン４といくつかの動物種のオルソログ遺伝子との配列アラインメントである。黒色の長方形は、ｅＫＩＴ－０１において変異しており、クローンＦａｂ７９Ｄが結合するエピトープに寄与すると予測される保存の少ない残基を強調表示する。

【図４Ａ】スリーピングビューティー形質導入Ｋ５６２細胞の対照抗体（クローンＢＶ１０Ａ４）及び治療用抗体（クローン４Ｇ８）での共染色を示すフローサイトメトリープロットである。ｅＦＬＴ３－０１バリアントの過剰発現は、４Ｇ８クローンによる認識の欠如を示すが、野生型ＦＬＴ３は、治療用Ａｂと対照Ａｂとの両方によって結合される。

【図４Ｂ】スリーピングビューティー形質導入Ｋ５６２細胞による蛍光ＦＬＴ３－リガンド結合を示すフローサイトメトリープロットである。細胞を、ＡＦ４８８コンジュゲートヒトＦＬＴ３Ｌ及びＥＣＤ２を認識する対照抗体ＢＶ１０Ａ４とともにインキュベートした。対照抗体とＡＦ４８８コンジュゲートヒトＦＬＴ３Ｌとの間のＭＦＩ比をプロットで報告する。ｅＦＬＴ３－０１バリアントは、野生型ＦＬＴ３と同等のリガンド結合親和性を示す。

【図４Ｃ】スリーピングビューティー形質導入Ｋ５６２細胞タンパク質抽出物のウエスタンブロットである。細胞を１６時間、血清飢餓状態とし、次いでＦＬＴ３Ｌ　１００ｎｇ／ｍＬで刺激するか、または刺激せず、溶解してタンパク質抽出物を得た。Ｋ５６２（未形質導入）、野生型ＦＬＴ３を過剰発現するＫ５６２、及びｅＦＬＴ３－０１を過剰発現するＫ５６２を、ＦＬＴ３細胞外ドメイン、ホスホ－ＦＬＴ３　Ｙ５８９－５９１、またはアクチン（対照）を認識する抗体でプローブした。ｅＦＬＴ３－０１バリアントは、野生型ＦＬＴ３と同様に、ＦＬＴ３Ｌ刺激に応答してキナーゼドメインのリン酸化を示す。

【図５－１】図５（左上）は、スリーピングビューティープラスミドにクローニングされたＦＬＴ３コンビナトリアルライブラリの設計を示す。図５（下左）は、対照抗体（クローンＢＶ１０Ａ４）及び治療用抗体（クローン４Ｇ８）で染色された、野生型ＦＬＴ３またはＦＬＴ３コンビナトリアルライブラリによって形質導入されたＫ５６２細胞のフローサイトメトリープロットを示す。選別された単一陽性細胞及び二重陽性細胞のＮＧＳ配列決定は、選別された単一陽性試料においてのみＮ３９９Ｄ変異の存在を強調した。図５（

右）は、スリーピングビューティー形質導入を介したＫ５６２細胞におけるＦＬＴ３　Ｎ３９９Ｄ変異の過剰発現の検証である。ＢＶ１０Ａ４及び４Ｇ８クローンによる共染色は、後者による結合の欠如を示すが、ＡＦ４８８コンジュゲートＦＬＴ３Ｌで評価されるように、リガンド親和性は維持される。
【図５－２】上記のとおり。
【図６Ａ】スリーピングビューティー形質導入ＮＩＨ３Ｔ３細胞の対照抗体（クローン１０４Ｄ２）及び治療用抗体（クローンＦａｂ７９Ｄ）での共染色を示すフローサイトメトリープロットである。ｅＫＩＴ－０１バリアントの過剰発現は、Ｆａｂ７９Ｄクローンによる認識の欠如を示すが、野生型ＫＩＴは、治療用Ａｂと対照Ａｂの両方によって結合される。
【図６Ｂ】スリーピングビューティー形質導入ＮＩＨ３Ｔ３細胞による蛍光ＳＣＦ結合を示すフローサイトメトリープロットである。細胞をＡＦ４８８コンジュゲートヒトＳＣＦ及び対照抗体１０４Ｄ２とインキュベートした。対照抗体とＡＦ４８８コンジュゲートヒトＳＣＦとの間のＭＦＩ比をプロットで報告する。ｅＫＩＴ－０１バリアントは、野生型ＫＩＴと同等のリガンド結合親和性を示す。
【図６Ｃ】スリーピングビューティー形質導入ＮＩＨ３Ｔ３細胞タンパク質抽出物のウエスタンブロットである。細胞を１６時間、血清飢餓状態とし、次いで、ＳＣＦ　１００ｎｇ／ｍＬで刺激するか、または刺激せず、溶解してタンパク質抽出物を得た。ＮＩＨ３Ｔ３（未形質導入）、ＮＩＨ３Ｔ３過剰発現野生型ＫＩＴ、及びＮＩＨ３Ｔ３過剰発現ｅＫＩＴ－０１を、ＫＩＴ細胞外ドメイン、ホスホＫＩＴ　Ｙ７１９またはアクチン（対照）を認識する抗体でプローブした。ｅＫＩＴ－０１バリアントは、野生型ＫＩＴと同様にＳＣＦ刺激に応答してキナーゼドメインのリン酸化を示す。
【図６Ｄ－１】野生型ＫＩＴに加えて、いくつかの変異したＫＩＴバリアントをスリーピングビューティーシステムで形質導入したＨＥＫ－２９３Ｔ細胞のフローサイトメトリープロットを報告する。細胞を対照抗体（クローン１０４Ｄ２）及び治療用抗体（Ｆａｂ７９Ｄ）で染色し、表面発現を保存しながらＦａｂ７９Ｄ結合を無効にするための最良の候補変異を特定した。
【図６Ｄ－２】上記のとおり。
【図７－１】図７（左上）は、クローンＦａｂ７９Ｄのエピトープをマッピングするために行った、ＫＩＴ細胞外ドメイン４縮重ライブラリスクリーニングのための実験設計である。ＥＣＤ４内の各アミノ酸残基を完全縮重コドン（ＮＮＮ）で置換して任意のアミノ酸置換を可能にし、形質導入細胞の共発現マーカーとしてｍＴａｇＢＦＰ２とともにスリーピングビューティープラスミドにクローニングした。ライブラリをＨＥＫ－２９３Ｔ細胞にエレクトロポレーションした。図７（左下）は、ＮＧＳ配列決定する単一の陽性細胞（ＫＩＴ対照抗体クローン１０４Ｄ２について）を単離するためのＫＩＴ細胞外ドメイン４縮重ライブラリのＦＡＣＳソーティングのためのゲーティング戦略である。図７（右）は、ヒートマップマトリックスであり、細胞外ドメイン４ライブラリ領域内の各アミノ酸位置をカラムとして示し、ＦＡＣＳ選別及び配列決定された単一陽性細胞対二重陽性細胞で濃縮されているアミノ酸置換を示す。最も頻繁に変異しているアミノ酸位置は、Ｆａｂ７９Ｄエピトープ認識に関与する残基を表す（プロットの上部に報告されている）。
【図７－２】上記のとおり。
【図７－３】上記のとおり。
【図７－４】上記のとおり。
【図７－５】上記のとおり。
【図７－６】上記のとおり。
【図７－７】上記のとおり。
【図８－１】ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９またはＣａｓ１２ａの相同性指向修復により媒介される、ＦＬＴ３及びＩＬ３ＲＡ（ＣＤ１２３）リーディングフレームの上流への標的化ＥＦ１－アルファプロモーター挿入の実験レイアウトである。未修飾Ｋ５６２細胞はいずれの遺伝子も発現しないため、この実験は、フローサイトメトリーによる編集結果の強化か

つ迅速な評価を可能にするレポーター細胞株を生成するために行った。内因性遺伝子座からＫＩＴ遺伝子を過剰発現させるために、同じ方策がＫＩＴ遺伝子にも適用されている。Ｋ５６２に、ＦＬＴ３またはＩＬ３ＲＡプロモーター領域のための相同性アームを備えたｄｓＤＮＡドナー鋳型とともにＲＮＰ複合体をエレクトロポレーションした。次いで、所望の遺伝子を発現する細胞をＦＡＣＳで選別し、単一細胞でクローニングし、スクリーニングして、発現が最も高いクローンを同定した。

【図８－２】上記のとおり。

【図９】ＣＤ１２３のＮ末端ドメイン上の抗ＣＤ１２３クローン７Ｇ３エピトープのマッピングである。各アミノ酸位置をアラニンまたは進化的保存アミノ酸のいずれかで置換し、７Ｇ３結合についてスクリーニングした。白色の四角は、７Ｇ３結合に影響を与えない残基を同定し、一方、漸次的に暗くなる灰色の四角は、クローン７Ｇ３結合の２５～５０～７５％の喪失に関連する。同様に、図９の下部は、ＣＤ１２３上のＩＬ３の結合部位を示す。

【図１０Ａ】ＣＤ１２３表面発現を保存しながらクローン７Ｇ３結合を無効にすることができるｇＲＮＡ及び変異を特定するための塩基編集スクリーニング実験で使用したＩＬ３ＲＡエクソン２及び３に関連するいくつかのｓｇＲＮＡの位置を示す。各ｓｇＲＮＡに関連するＣａｓタンパク質のタイプを凡例で報告する。

【図１０Ｂ－１】異なるｓｇＲＮＡ及び塩基エディターのペアで編集された、内因性遺伝子座からＣＤ１２３を発現するＫ５６２レポーター細胞の代表的なフローサイトメトリープロットを示す（各プロットの上及び左に示す）。細胞を、対照抗体、ＣＤ１２３クローン９Ｆ５、ならびに３つの異なる治療用抗体、ＣＤ１２３クローン７Ｇ３、６Ｈ６、及びＳ１８０１６Ｆで染色する。細胞にエレクトロポレーションを行ったｓｇＲＮＡ及びプラスミドの用量を図で報告する。

【図１０Ｂ－２】上記のとおり。

【図１１－１】いくつかのｓｇＲＮＡ－塩基エディター対で編集されたＣＤ１２３レポーター細胞における塩基編集スクリーニング実験（それぞれ、プロットの左側または上部に報告されている）。細胞に３６０ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡ及び５００ｎｇの塩基エディタープラスミドをＬｏｎｚａ　４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒでエレクトロポレーションし、７２時間後にフローサイトメトリーで評価した。細胞を、対照抗体、ＣＤ１２３クローン９Ｆ５、及び３つの異なる治療用抗体、ＣＤ１２３クローン７Ｇ３で染色する。

【図１１－２】上記のとおり。

【図１１－３】上記のとおり。

【図１１－４】上記のとおり。

【図１１－５】上記のとおり。

【図１１－６】上記のとおり。

【図１１－７】上記のとおり。

【図１２Ａ】ＦＬＴ３　４Ｇ８　ＣＡＲ及び切断型ＥＧＦＲ形質導入（ＬＶ）マーカー／安全スイッチをコードするレンチウイルスベクターの設計を報告する。第３世代ＬＶベクターを作製し、刺激の２～３日目に新鮮なＰＢＭＣ由来Ｔ細胞にＣＤ３－ＣＤ２８ダイナビーズを形質導入し、ＩＬ７及びＩＬ１５を含有する培地中で１４日間培養した。共培養殺傷実験の場合、ＦＬＴ３なし、野生型ＦＬＴ３、またはＦＬＴ３のエピトープ操作バリアントのいずれかを発現するＫ５６２細胞を、４Ｇ８－ＣＡＲ　Ｔ細胞または未形質導入（ＵＴ）Ｔ細胞とともに異なるエフェクター：標的比（ＥＴ）で９６ウェルプレートにプレーティングした。

【図１２Ｂ－１】図１２Ｂ（上部の列）は、対照抗体（クローンＢＶ１０Ａ４）及び治療用抗体（クローン４Ｇ８）での共染色によるＦＬＴ３の発現を示すプレーティングされたＫ５６２細胞のフローサイトメトリープロットである。図１２Ｂ（中央及び下部の列）は、プレーティングの４時間後及び４８時間後の共培養殺傷実験からの生細胞（ＬｉｖｅＤｅａｄ黄色－ＡｎｎｅｘｉｎＶ－）のフローサイトメトリープロットである。エフェクター細胞は、ＣｅｌｌＴｒａｃｅ蛍光またはＣＤ４／ＣＤ８発現によって同定されるが、標

的細胞は、ＣｅｌｌＴｒａｃｅ及びＣＤ４／ＣＤ８陰性及びＦＳＣ－Ａ高である。
【図１２Ｂ－２】上記のとおり。
【図１２Ｃ】全ての試験条件における４時間での生存標的細胞（ＬｉｖｅＤｅａｄ－ＡｎｎｅｘｉｎＶ－）のパーセンテージを示すプロットである。
【図１２Ｄ】標的細胞との共培養中の脱顆粒のマーカーとしての４時間でのＴリンパ球上のＣＤ１０７ａ表面染色を示すプロットである。
【図１２Ｅ】色素希釈によるＴ細胞増殖を評価するために、標的細胞との共培養の４８時間後のＣｅｌｌＴｒａｃｅ　ｙｅｌｌｏｗのＭＦＩを報告するプロットである。
【図１３Ａ】ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ相同性指向修復（ＨＤＲ）編集戦略のための、ＦＬＴ３エクソン９に対する３つのｇＲＮＡの位置を示す概略図である。２つのｇＲＮＡは、ＡｓＣａｓ１２ａと組み合わせて使用するために設計され、１つのｇＲＮＡは、ＳｐＣａｓ９ヌクレアーゼと組み合わせて使用するために設計されている。一本鎖オリゴ－デオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）を鋳型ドナーとして使用し、４つの異なるバリアントの設計を報告する。ｓｓＯＤＮ配列内の黒四角は、野生型配列とは異なる変異コドンを特定する（追加の変異は、ＨＤＲ媒介性修復後のＣａｓヌクレアーゼの再切断の速度を低下させるために含まれる）。各ｓｓＯＤＮの逆相補体も試験した。
【図１３Ｂ－１】図１３Ａで報告したｇＲＮＡ及びｓｓＯＤＮを用いて、ＦＬＴ３を発現するレポーターＫ５６２細胞で行ったＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ　ＨＤＲ編集実験の結果を報告するフローサイトメトリープロットである。細胞を対照抗体（クローンＢＶ１０Ａ４）及び治療用抗体（クローン４Ｇ８）で共染色した。黒四角は、編集された細胞を強調表示する。
【図１３Ｂ－２】上記のとおり。
【図１３Ｂ－３】上記のとおり。
【図１４Ａ】アデニン塩基エディター（ＡＢＥ）と組み合わせて使用されるＦＬＴ３エクソン９及びＮ３９９コドンに対する２つのｓｇＲＮＡの位置を示す概略図である。
【図１４Ｂ】Ｎ３９９コドン及びＰＡＭ配列との関連において、各ｇＲＮＡの配列を報告する。
【図１４Ｃ】代替ＰＡＭ配列との使用を可能にする、変異したＣａｓ９を有する３つのアデニン塩基エディターバリアントの概略図である。
【図１４Ｄ－１】図１４Ａ及び図１４Ｂに示したｓｇＲＮＡならびに図１４Ｃで報告したＡＢＥを用いたＦＬＴ３発現Ｋ５６２レポーター細胞における塩基編集実験の結果を示すフローサイトメトリープロットである。細胞を対照抗体（クローンＢＶ１０Ａ４）及び治療用抗体（クローン４Ｇ８）で共染色した。各プロットは、編集されたセルのゲーティング及び編集されたセルの割合を報告する。
【図１４Ｄ－２】上記のとおり。
【図１５Ａ】Ｎ３９９Ｄ変異を導入するためにアデニン塩基エディター（ＡＢＥ）と組み合わせて使用されるＦＬＴ３エクソン９及びＮ３９９コドンに対する５つのｓｇＲＮＡの位置を示す概略図である。凡例は、各ｓｇＲＮＡに対する異なるＰＡＭ及びＳｐＣａｓ９の要件を示す。
【図１５Ｂ】Ｎ３９９コドン及びＰＡＭ配列との関連において、各ｇＲＮＡの配列を報告する。
【図１５Ｃ－１】図１５Ａ及び図１５Ｂに示したｓｇＲＮＡならびに２つのアデニン塩基エディター（ＮＧ－ＡＢＥ８ｅ及びＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　３ｘＮＬＳ）を用いたＦＬＴ３発現Ｋ５６２レポーター細胞における塩基編集実験の結果を示すフローサイトメトリープロットである。細胞を対照抗体（クローンＢＶ１０Ａ４）及び治療用抗体（クローン４Ｇ８）で共染色した。各プロットは、編集されたセルのゲーティング及び編集されたセルの割合を報告する。
【図１５Ｃ－２】上記のとおり。
【図１６Ａ】スリーピングビューティー形質導入によって異なるＦＬＴ３バリアントを過剰発現し、抗ＦＬＴ３対照抗体（クローンＢＶ１０Ａ４）及びＡＦ４８８コンジュゲート

ヒトＦＬＴ３Ｌで共染色されたＦＬＴ３レポーターＫ５６２細胞のフローサイトメトリープロットである。二重陽性集団の勾配は、ＦＬＴ３Ｌ親和性に比例する（ＦＬＴ３対照抗体とＦＬＴ３Ｌ染色との間のＭＦＩ比を各プロットで報告する）。
【図１６Ｂ】野生型ＦＬＴ３と比較して、ＦＬＴ３対照抗体染色とＡＦ４８８コンジュゲートＦＬＴ３Ｌ染色との間のＭＦＩ比の分布を示すヒストグラムである（灰色の重ね合わせ）。
【図１７Ａ】ヒトＣＤ３４＋細胞の編集のための塩基エディターｍＲＮＡを産生するためのカスタムクローン化ｐｍＲＮＡプラスミドの設計を示す。
【図１７Ｂ】ＢＥ　ｍＲＮＡの産生に使用したインビトロ転写プロトコルのワークフローを説明する。
【図１７Ｃ】インビトロで転写されたＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　ｍＲＮＡのＡｇｉｌｅｎｔ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒプロファイルである。ｘ軸はヌクレオチドサイズ、ｙ軸は相対蛍光単位（ＲＦＵ）シグナルである。
【図１８－１】パネルＡは、図１５（パネルＢ）に示したＦＬＴ３－１８－ＮＲＮ　ｓｇＲＮＡ及びＩＶＴアデニン塩基エディターｍＲＮＡ（ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ３ｘＮＬＳ）を用いたＦＬＴ３発現Ｋ５６２レポーター細胞における塩基編集実験の結果を示すフローサイトメトリープロットである。細胞を対照抗体（クローンＢＶ１０Ａ４）及び治療用抗体（クローン４Ｇ８）で共染色した。各プロットは、編集されたセルのゲーティング及び編集されたセルの割合を報告する。実験は、異なるｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡの用量で実施した（それぞれ、プロットの最上部及び左側に報告されている）。図１８Ｂは、フローサイトメトリーによるｍＲＮＡ、ｇＲＮＡと編集効率との間の用量効果の相関を示すドットプロットである。図１８（パネルＣ）は、ｍＲＮＡ、ｇＲＮＡと編集後の細胞生存率との間の用量効果の相関を示すドットプロットである。
【図１８－２】上記のとおり。
【図１８－３】上記のとおり。
【図１９Ａ】ＦＬＴ３レポーターＫ５６２細胞で行った、（左側に報告した）異なるｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡ用量でのＦＬＴ３－１８－ＮＲＮ　ｓｇＲＮＡの各デニン塩基位置での編集効率を報告するヒートマップである（図１８と同じ）。ｇＲＮＡ配列及び予想編集ウィンドウは、ヒートマップの上部に報告される。
【図１９Ｂ】ｍＲＮＡ、ｇＲＮＡとｇＤＮＡ配列決定による編集効率との間の用量効果の相関を示すドットプロットである（Ａ６及びＡ７塩基位置での編集のみが報告されている）。
【図２０Ａ】ＩＶＴ　ｍＲＮＡ及びＦＬＴ３－１８－ＮＲＮ　ｓｇＲＮＡを使用した、ヒト動員末梢血由来ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣにおけるＦＬＴ３塩基編集実験の実験設計である。培地の組成は右側に報告され、タイムラインはフローサイトメトリー及びｇＤＮＡ収集の時点を報告する。
【図２０Ｂ】培養ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの幹細胞表現型のフローサイトメトリー評価のためのゲーティング戦略を報告する。
【図２０Ｃ】編集後０日目、３日目、及び６日目における培養ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの倍率増殖を報告する棒プロットである。
【図２０Ｄ】フローサイトメトリーによる編集後３日目及び６日目の培養ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの組成を示す棒プロットである（ゲーティングを図２０Ｂに報告する）。
【図２１Ａ】動員末梢血由来ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣで行った、異なるｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡ用量でのＦＬＴ３－１８－ＮＲＮ　ｓｇＲＮＡの各アデニン塩基位置における編集効率を報告するヒートマップである（図２０と同じ）。
【図２１Ｂ】ｍＲＮＡ、ｇＲＮＡとＣＤ３４＋　ＨＳＰＣでのｇＤＮＡ配列決定による編集効率との間の用量効果の相関を示すドットプロットである。
【図２２Ａ－１】標的細胞が未修飾または塩基編集ＦＬＴ３発現Ｋ５６２細胞のいずれかであったＣＡＲ－Ｔ共培養殺傷アッセイを示すフローサイトメトリープロットである。標的細胞を４Ｇ８－ＣＡＲ　Ｔ細胞または未形質導入Ｔ細胞とともに、異なるエフェクター

：標的比（上の報告）でプレーティングし、フローサイトメトリーによって６時間の時点で評価した。生細胞（ＡｎｎｅｘｉｎＶ－ＬｉｖｅＤｅａｄ黄色－）をプロットし、相対％を報告する。
【図２２Ａ－２】上記のとおり。
【図２２Ｂ】共培養から６時間後の各Ｅ：Ｔ比での標的細胞の生存率（ＡｎｎｅｘｉｎＶ－ＬｉｖｅＤｅａｄ黄色－）を報告する。
【図２２Ｃ】共培養から６時間後の各Ｅ：Ｔ比でのＣＤ１０７ａ表面染色によるＴ細胞の脱顆粒を報告する。
【図２３Ａ】標的細胞が未修飾または塩基編集ヒトＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ（編集効率４６％）のいずれかであったＣＡＲ－Ｔ共培養殺傷アッセイを示すフローサイトメトリープロットである。標的細胞を４Ｇ８－ＣＡＲ　Ｔ細胞または未形質導入Ｔ細胞とともに、異なるエフェクター：標的比（上の報告）でプレーティングし、フローサイトメトリーによって４８時間の時点で評価した。
【図２３Ｂ】４８時間での４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞によるＣＤ３４＋細胞の特異的殺傷を報告する。
【図２３Ｃ】４８時間での４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞によるＣＤ３４＋ＣＤ９０＋幹細胞濃縮サブセットの特異的殺傷を報告する。
【図２４Ａ】４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞に対するＦＬＴ３エピトープ操作ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの耐性を評価するためのパイロットインビボ実験の実験設計を報告する。実験のタイムライン及び手順、ならびに治療群の数が報告されている。
【図２４Ｂ】各処理群に関する、　殺時の骨髄（ＢＭ）におけるヒトＣＤ４５＋生着の相対的存在量及び絶対数を報告する棒プロットである。
【図２４Ｃ】異種移植されたＣＤ３４＋　ＨＳＰＣに由来するヒト生着の系統組成を説明する棒プロットであり、ＦＬＴ３遺伝子が未修飾であるか、または塩基編集されている。
【図２５Ａ】　殺時の骨髄におけるヒトＣＤ４５＋生着内のヒトＣＤ３４＋ＣＤ３８－前駆細胞の相対的存在量及び絶対数を報告する棒プロットである（図２４と同じ実験）。未修飾ＣＤ３４＋ＨＳＰＣで異種移植されたマウスは、４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ投与時にＣＤ３４＋ＣＤ３８－前駆細胞の有意な低減を示す。
【図２５Ｂ】処理されたマウスの脾臓におけるＣＡＲ－Ｔ細胞上のＣＤ６９＋細胞（Ｔ細胞活性化マーカー）のパーセンテージを報告する棒プロット（図２４と同じ実験）。
【図２５Ｃ】セントラルメモリ（ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ＋、ＣＭ）、エフェクターメモリ（ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ－、ＥＭ）、ナイーブ（ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）に分けられたＴ細胞表現型（ＣＤ６２Ｌ及びＣＤ４５ＲＡの表面発現によって評価）を報告する棒プロットである。ＣＤ４５ＲＡを再発現するエフェクターメモリ細胞（ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ－、ＴＥＭＲＡ）。
【図２５Ｄ】インビボ異種移植実験からの骨髄試料（図２４と同じ）のフローサイトメトリーの系統陰性ヒト前駆細胞（生存／ｈＣＤ４５＋／ＣＤ３－／ＣＤ１９－／ＣＤ３３－／ＣＤ３４＋／ＣＤ３８－）を特定するためのゲーティング戦略を示す。
【図２５Ｅ】同じ条件（図２４と同じ実験）のマウスのプール事象から得られた累積フローサイトメトリープロットを報告し、　殺時の骨髄中のヒトＣＤ３４＋ＣＤ３８－前駆細胞のパーセンテージを示す。
【図２６Ａ】ＩＶＴ　ｍＲＮＡ及びＦＬＴ３－１８－ＮＲＮ及びＣＤ１２３－Ｎ　ｓｇＲＮＡを使用した、ヒト動員末梢血由来ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣにおけるＦＬＴ３及びＣＤ１２３二重塩基編集実験の実験設計である。培地の組成は右側に報告され、タイムラインはフローサイトメトリー及びｇＤＮＡ収集の時点を報告する。
【図２６Ｂ】編集後０日目、３日目、及び７日目における培養ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの倍率増殖を報告する棒プロットである。
【図２６Ｃ】ＣＤ１２３塩基編集条件におけるＣＤ１２３クローン７Ｇ３認識の喪失を強調する、編集されたＣＤ３４＋　ＨＳＰＣのフローサイトメトリープロットである。細胞を対照ＣＤ１２３抗体（クローン９Ｆ５）及び治療用抗体（７Ｇ３）で共染色した。細胞

をＣＤ３４＋ＣＤ９０＋ＣＤ４５ＲＡ－上で事前にゲーティングした。
【図２７】動員末梢血由来ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣで行った、異なるｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡ用量でのＦＬＴ３－１８－ＮＲＮ及びＣＤ１２３－Ｎ　ｓｇＲＮＡの各アデニン塩基位置における編集効率を報告するヒートマップである（図２６と同じ）。
【図２８Ａ】ＣＤ１２３塩基編集効率の改善を示すために、ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６ＷまたはＳｐＲＹ－Ｋ９１８－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗのいずれかと組み合わせてＦＬＴ３－１８－ＮＲＮ　ｓｇＲＮＡまたはＣＤ１２３－Ｎ　ｓｇＲＮＡで塩基編集されたＫ５６２細胞のフローサイトメトリープロットである。
【図２８Ｂ】ＣＤ１２３　Ｓ５９残基を標的とする３つの異なるｇＲＮＡの配列を報告する。
【図２８Ｃ】より高い忠実度のバリアント（ＨＦ１、Ｓｎｉｐｅｒ）、Ｋ９１８Ｎバリアント、ＢｌａｃｋＪａｃｋバリアント（より長いｇＲＮＡに対してより耐性がある）、及びこれらの変異の組み合わせを含む、修飾ＳｐＣａｓ９を含むいくつかの異なるアデニン塩基エディターの設計を示す。
【図２８Ｄ】図２８Ｂからの３つのｇＲＮＡ（加えて、対照としてＦＬＴ３－１８－ＮＲＮ）及び図２８Ｃからの塩基エディターバリアントを使用した編集効率を報告するヒートマップである。
【図２９Ａ】ＩＶＴ　ｍＲＮＡ及びＦＬＴ３－１８－ＮＲＮ及びＣＤ１２３－Ｒ　ｓｇＲＮＡを使用した、ヒト動員末梢血由来ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣにおけるＦＬＴ３及びＣＤ１２３二重塩基編集実験の実験設計である。培地の組成は右側に報告され、タイムラインはフローサイトメトリー及びｇＤＮＡ収集の時点を報告する。
【図２９Ｂ】培養ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣにおけるＣＤ１２３塩基編集効率を得るためのゲーティング戦略を示すフローサイトメトリープロットである。
【図２９Ｃ】編集後０日目、３日目、及び６日目における培養ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの倍率増殖を報告する棒プロットである。
【図３０－１】ＦＬＴ３－１８－ＮＲＮ及びＣＤ１２３－Ｒ　ｓｇＲＮＡの各アデニン位置での塩基編集効率を報告するヒートマップである（図２９と同じ実験）。標的塩基は、ヒートマップの下部に報告される。右側では、ヒートマップは、フローサイトメトリーによって編集されたＣＤ１２３ベースの割合（％）を報告する。
【図３０－２】上記のとおり。
【図３１】図２９と同じ実験からのＫＩＴ－ｇＲＮＡ－Ｙ標的化残基Ｈ３７８の各アデニン位置におけるＣＤ３４＋ ＨＳＰＣ上での塩基編集効率を報告するヒートマップである。
【図３２Ａ】４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞に対するＦＬＴ３エピトープ操作ヒトＣＤ３４＋ＨＳＰＣの耐性を確認するためのインビボ異種移植実験のための実験設計を報告する。実験タイムライン及び処置群及び数の多さを報告する。
【図３２Ｂ】全てのマウスについての移植後８週間の末梢血試料におけるＦＬＴ３塩基編集効率を報告する。
【図３３Ａ】　殺時の骨髄におけるヒトＣＤ４５＋生着における多形核顆粒球（ＣＤ３－ＣＤ１９－ＣＤ３３＋ＳＳＣｈｉ、ＰＭＮ）及び顆粒単球前駆細胞（系統－ＣＤ３４＋ＣＤ３８＋ＣＤ４５ＲＡ＋ＦＬＴ３＋、ＧＭＰ）のパーセンテージを報告する（図３２と同じ実験）。
【図３３Ｂ】４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞処理マウス及び未処理マウスについての、いくつかの時点でのゲノムＤＮＡに対するＦＬＴ３編集効率を示す。ＬＣ：液体培養（移植前の試料）、Ｗ８、Ｗ１２：８、１２週目の出血、ＢＭ：骨髄、ＣＦＵ：コロニー形成単位由来細胞（　殺時に骨髄試料からプレーティングされた）。
【図３４－１】多形核顆粒球（ＣＤ３－ＣＤ１９－ＣＤ３３＋ＳＳＣｈｉ、ＰＭＮ）、顆粒単球前駆細胞（系統－ＣＤ３４＋ＣＤ３８＋ＣＤ４５ＲＡ＋ＦＬＴ３＋、ＧＭＰ）、及び造血幹細胞（系統－ＣＤ３４）の相対的存在量を示す代表的なフローサイトメトリープロットである。＋ＣＤ３８－ＣＤ９０＋ＣＤ４５ＲＡ－、ＨＳＣ）を、ＦＬＴ３またはＡＡＶＳ１編集ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣで異種移植したマウスの骨髄で行った。

【図３４－２】上記のとおり。
【図３５】２つの別個の構築物としてまたは直列ＣＡＲ（リンカーによって分離された同じ分子上の２つのｓｃＦｖ）のいずれかとして発現した単一または二重特異性キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）のためのいくつかの代替設計を示す。
【図３６Ａ】対照または治療用（マゼンタ）モノクローナル抗体によって認識された細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を有するＩＩＩ型受容体型チロシンキナーゼ（ＦＬＴ３、ＫＩＴ）の概略図である。ＡＦ４８８コンジュゲートＦＬＴ３ＬまたはＳＣＦリガンドを使用して、変異受容体の結合親和性を評価した。
【図３６Ｂ】それぞれ１６または１０個のアミノ酸置換を有するキメラ受容体に対する治療用ｍＡｂ（ＦＬＴ３及びＫＩＴについては、それぞれ４Ｇ８及びＦａｂ７９Ｄ）の喪失を示すフローサイトメトリープロット（上）である。ならびに野生型（ＷＴ）及び変異受容体バリアントについての蛍光リガンド結合アッセイ（下）。
【図３６Ｃ】無刺激または１００ｎｇ／ｍＬのＦＬＴ３ＬもしくはＳＣＦとインキュベートしたＦＬＴ３及びＫＩＴバリアントを発現する細胞株のｐＦＬＴ３　Ｙ５８９－５９１及びｐＫＩＴ　Ｙ７１９のウエスタンブロットである。
【図３６Ｄ】ＥＣＤ４（左上）の１６アミノ酸位置にヒトまたはマウスのいずれかのコドンを有するＦＬＴ３　ｃＤＮＡを含有するスリーピングビューティープラスミドの概略図である。ならびに、ＦＬＴ３ライブラリで形質導入し、ライブラリ領域のＮＧＳ配列決定のためにＦＡＣＳ選別（４Ｇ８－及び４Ｇ８＋）したＫ５６２細胞（右上）、及び３８４～４１３位での相対アミノ酸頻度を示す配列ロゴ（下）。
【図３６Ｅ】ＥＣＤ４の各位置に縮重コドン（ＮＮＮ）を含有するスリーピングビューティープラスミド（左上）の概略図である；ＫＩＴライブラリで形質導入し、ライブラリ領域のＮＧＳ配列決定のためにＦＡＣＳ選別（Ｆａｂ７９Ｄ－及びＦａｂ７９Ｄ＋）したＫ５６２細胞（右上）；ならびにＦａｂ－７９Ｄ低陽性細胞対二重陽性細胞（ａａ．３１４～３８１）で濃縮されたアミノ酸置換の対数倍率変化を示す配列ロゴ（下；複数の濃縮されたアミノ酸置換を有する位置は、以前に予測された接触点と一致する）。
【図３６Ｆ－１】ＦＬＴ３コドンＮ３９９を標的とする試験したｇＲＮＡ（左）の概略図である。ならびに塩基エディター発現プラスミド（ＮＧ－ＡＢＥ８ｅまたはＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ）及びｓｇＲＮＡをエレクトロポレーションし、編集の７２時間後にフローサイトメトリーによって評価したＫ５６２　ＦＬＴ３レポーター細胞の代表的なプロット（右；対照ｍＡｂ　ＢＶ１０Ａ４に陽性であり、クローン４Ｇ８に陰性である細胞の割合（％）が各プロットで報告されている；未編集の条件はゲーティング戦略を示す）。
【図３６Ｆ－２】上記のとおり。
【図３６Ｇ】塩基編集によるＣＤ１２３エピトープのスクリーニングを示す。上：スクリーニングに使用した７Ｇ３接触残基の標的化塩基編集のためのｓｇＲＮＡ。濃青色：ＮＧＧ　ＰＡＭ、灰色：ＮＧＮ　ＰＡＭ、水色：ＮＲＮ　ＰＡＭ。ＰＡＭ位置は矢じりで示されている。下：ＳｐＲＹ－シチジン塩基エディター（上段）またはアデニン塩基エディター（下段）で処理したＣＤ１２３レポーターＫ５６２細胞のＦＡＣＳプロット。対照ｍＡｂ　９Ｆ５に陽性であり、治療用クローン７Ｇ３に陰性である細胞％を各プロットの右下に報告する。
【図３６Ｈ】受容体バリアントを発現するＫ５６２（ＦＬＴ３及びＣＤ１２３の場合）またはＮＩＨ－３Ｔ３（ＫＩＴの場合）で測定したステルス受容体バリアントに対する治療用抗体の親和性を示す。バックグラウンドを差し引いた後、対照ｍＡｂに対して正規化した治療用ｍＡｂのＭＦＩの平均±ＳＤ（Ｎ＝３）。二元配置分散分析による比較。
【図３６Ｉ】ＦＬＴ３、ＳＣＦ、及びＩＬ３の親和性アッセイである。スリーピングビューティートランスポザーゼを介する受容体バリアントを発現する細胞株を蛍光リガンドとインキュベートし、フローサイトメトリーによって評価した。リガンドのＭＦＩの平均±ＳＤ（Ｎ＝３　ＦＬＴ３／ＣＤ１２３、Ｎ＝４　ＫＩＴ）。二元配置分散分析による比較。
【図３７Ａ】ＦＡＣＳで選別された４Ｇ８－及び４Ｇ８＋細胞におけるＥＣＤ４の各位置（３５７～４２１）でのアミノ酸頻度を示すＦＬＴ３　ＥＣ４コンビナトリアルライブラ

リの完全長配列ロゴである。
【図３７Ｂ】ｍＣｈｅｒｒｙ及びピューロマイシンＮ－アセチルトランスフェラーゼ（ＰＡＣ）レポーター／耐性カセット（上）を用いたＦＬＴ３バリアントをコードするスリーピングビューティートランスポゾンの設計（上）、ならびにＫ５６２細胞で発現したＮ３９９Ｄ及びＮ３９９Ｇバリアントに対する４Ｇ８認識の喪失を示すフローサイトメトリープロット（下）を示す。
【図３７Ｃ】遺伝子転写開始部位（ＴＳＳ）の上流のＥＦ１αプロモーターの標的化された相同性指向修復による組み込みを介したＦＬＴ３、ＫＩＴ及びＣＤ１２３レポーターＫ５６２細胞の生成を示す。５０ｂｐ長の相同性アームを有するｄｓＤＮＡドナーを、完全なＥＦ１αプロモーターをコードするプラスミド鋳型に対するＰＣＲによって生成した。Ｋ５６２細胞を、ＳｐＣａｓ９（ＦＬＴ３、ＫＩＴ）またはＡｓＣａｓ１２ａヌクレアーゼ（ＣＤ１２３）及び各遺伝子のコード配列の上流領域を認識するｇＲＮＡでエレクトロポレーションした。０．５～１０ｕｇのｄｓＤＮＡドナー鋳型を、２０μＬのエレクトロポレーション容積でＣａｓ　ＲＮＰと共エレクトロポレーションした。代表的なフローサイトメトリープロットは、ＦＡＣＳで選別し、増殖させた過剰発現遺伝子に陽性の細胞の集団を示す。ＦＬＴ３及びＣＤ１２３については、選別された細胞の単一細胞クローニングを行って、表面発現が最も高いクローンを単離した。別途明記されない限り、全てのエピトープ編集試験及び最適化をＫ５６２レポーター細胞で実施した。ＦＬＴ３／ＣＤ１２３二重レポーターを、ＦＬＴ３発現Ｋ５６２細胞での第２ラウンドのＣＤ１２３標的化ＲＮＰ＋ドナーエレクトロポレーションにより得た（データを図４９Ｂに示す）。
【図３７Ｄ】ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ媒介性の相同性指向修復を介したＦＬＴ３　Ｎ３９９Ｄ変異の導入を示す。Ｋ５６２レポーター細胞に、ＳｐＣａｓ９またはＡｓＣａｓ１２ａヌクレアーゼ、ｇＲＮＡ、及びＮ３９９Ｄ変異をコードする２００ｂｐのｓｓＯＤＮ鋳型ドナー（またはそれらの逆相補体、ｒｅｖ．ｃｏｍｐ．）を用いて、エレクトロポレーションを行った。ＨＤＲ修復後のヌクレアーゼの再切断のリスクを低減するために、追加のサイレント変異を含めた。編集から７２時間後、細胞をフローサイトメトリーにより評価した。ＦＬＴ３＋細胞（対照ｍＡｂ　ＢＶ１０Ａ４による）のパーセンテージ（ただし４Ｇ８－）は、右下隅に報告されている。
【図３７Ｅ】エピトープマッピングに由来するＫＩＴ変異の特徴付けを示す。ＫＩＴエピトープマッピングから得られるアミノ酸位置については、アデニンＢＥ（ＡＢＥ、赤色）またはシチジンＢＥ（ＣＢＥ、青色）で得ることができる置換を、スリーピングビューティートランスポゾンにおいて個別にクローニングし、ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞にエレクトロポレーションを行った。ピューロマイシンでの選択後、細胞をＦａｂ－７９Ｄと対照Ａｂ１０４Ｄ２の両方で染色した。Ｆａｂ－７９Ｄ　ＭＦＩと１０４Ｄ２　ＭＦＩとの比を変異ごとに報告する。ＫＩＴへのＳＣＦ結合に影響を及ぼすバリアントを除外するために、同じバリアントをＡＦ４８８コンジュゲートＳＣＦ及び対照ｍＡｂ　１０４Ｄ２（ＳＣＦ結合を損なわない）とインキュベートした。１０４Ｄ２中央値蛍光に対するＳＣＦの比を棒プロットで報告する。横線は、参照変異Ｈ３７８Ｒを示す。
【図３７Ｆ】ＫＩＴ　Ｈ３７８Ｒアデニン塩基編集の最適化を示す。エクソン７内のコドンＨ３７８を標的とするｓｇＲＮＡを、Ｋ５６２細胞にＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅと共エレクトロポレーションした。ｇＤＮＡ上での編集効率を、プロトスペーサー内の各アデニンについて報告する（ＫＩＴ－Ｙ　ｓｇＲＮＡに対する位置番号を含む）。
【図３７Ｇ－１】ｍＴａｇＢＦＰ２及びピューロマイシンＮ－アセチルトランスフェラーゼ（ＰＡＣ）レポーター／耐性カセットを用いたＫＩＴバリアントをコードするスリーピングビューティートランスポゾンの設計（上）、及びＨＥＫ－２９３Ｔ細胞で発現したＫＩＴ　Ｈ３７８Ｒに対するＦａｂ７９Ｄ認識の喪失を示すフローサイトメトリープロット（下）を示す。
【図３７Ｇ－２】上記のとおり。
【図３７Ｈ－１】塩基編集によるＣＤ１２３エピトープのスクリーニングを示す。図１Ｇに報告された７Ｇ３接触残基の標的化塩基編集のためのｓｇＲＮＡを、ＣＤ１２３レポー

ターＫ５６２細胞にアデニン塩基エディター（ＡＢＥ）またはシチジン塩基エディター（ＣＢＥ）発現プラスミドと共エレクトロポレーションした。対照ｍＡｂ　９Ｆ５に陽性であり、治療用クローン７Ｇ３に陰性である細胞の割合（％）を各プロットで報告する。未編集の条件は、ゲーティング戦略を示す。ＢＥ４、ｅｖｏＡｐｏｂｅｃ－１　ＢＥ４ｍａｘ
【図３７Ｈ－２】上記のとおり。
【図３７Ｉ】ｓｇＲＮＡ－ＦによるＣＤ１２３　ＣＢＥが、クローン６Ｈ６及びＳ１８０１６Ｆの結合の喪失をもたらすことを示す。図３７Ｈで報告したＢＥスクリーニングからの同じ条件を、クローン７Ｇ３とは異なるエピトープを有するＣＤ１２３標的化クローン６Ｈ６及びＳ１８０１６Ｆで染色した。
【図３７Ｊ】細胞内シグナル伝達を可能にするための共通のβ鎖ＣＳＦＲ２Ｂの共発現を伴う、ＣＤ１２３バリアントをコードするスリーピングビューティートランスポゾンの設計を示す。
【図３８Ａ】ＦＬＴ３エピトープ操作バリアントが、キナーゼ活性化を維持することを示す。スリーピングビューティートランスポザーゼによるＦＬＴ３バリアントを発現するＫ５６２細胞からのタンパク質抽出物のウエスタンブロット。細胞を一晩血清飢餓状態とし、異なる濃度のヒトＦＬＴ３Ｌを用いて、３７℃で１０分間刺激した。ｐＦＬＴ３　Ｙ５８９～５９１、総ＦＬＴ３、及びアクチンを同じ溶解物に対してプローブした。ｐＦＬＴ３膜のストリッピング後に、総ＦＬＴ３をプローブした。正規化したｐＦＬＴ３シグナル強度（アクチン上）を右側で報告している。二元配置分散分析による比較。
【図３８Ｂ】ＫＩＴエピトープ操作バリアントが、キナーゼ活性化を維持することを示す。スリーピングビューティートランスポザーゼによるＫＩＴバリアントを発現するＮＩＨ－３Ｔ３細胞からのタンパク質抽出物のウエスタンブロット。細胞を、一晩血清飢餓状態にし、異なる濃度のヒトＳＣＦを用いて、３７℃で１０分間刺激した。ｐＦＬＴ３　Ｙ７１９、総ＫＩＴ、及びアクチンを、同じ溶解物に対してプローブした。正規化したｐＫＩＴシグナル強度（総ＫＩＴに対する）を、右のプロットに報告する。二元配置分散分析による比較。
【図３８Ｃ】ＣＤ１２３エピトープ操作バリアントが、ＳＴＡＴ５活性化を維持することを示す。スリーピングビューティートランスポザーゼによるＣＤ１２３バリアントを発現しているＢａＦ３細胞をマウスＩＬ－３に飢餓状態させ、異なる濃度のヒトＩＬ－３で刺激した。４８時間後に細胞内フローサイトメトリーによって細胞をＳＴＡＴ５リン酸化について評価した（左、代表的なＦＡＣＳプロットは異なるｈＩＬ－３用量でのＣＤ１２３Ｓ５９Ｐ条件を示す、右、ｐＳＴＡＴ５　ＰＥ　ＭＦＩ）。
【図３８Ｄ】ＦＬＴ３、ＫＩＴ、ＣＤ１２３エピトープ操作バリアントが、ＷＴ受容体と同様の増殖性応答を誘導することを示す。スリーピングビューティートランスポザーゼによってＦＬＴ３、ＫＩＴ、及びＣＤ１２３バリアントを発現しているＢａＦ３細胞を、マウスＩＬ－３に対して一晩飢餓状態とし、それぞれ異なる濃度のヒトＦＬＴ３、ＳＣＦ及びＩＬ－３で刺激した。細胞を５日間培養し、フローサイトメトリーで分析して、絶対数を得た（ＣｏｕｎｔＢｅａｄｓ）。プロットは、無刺激条件で正規化された絶対数を報告する。
【図３９Ａ】第２世代ＣＡＲ及び切断型ヒト上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲｔ）を共発現する双方向レンチウイルスベクター（ＬＶ）の概略図（上）、及びＣＡＲ－Ｔ細胞の生成のためのＴ細胞培養、形質導入、及び分析の概略図（下）を示す。
【図３９Ｂ】異なる感染多重度（ＭＯＩ）でＬＶ　４Ｇ８－ＣＡＲを形質導入した後、示された日数（Ｄ）でのＴ細胞上のＥＧＦＲｔ表面発現のパーセンテージ（左）及び増殖倍率（右）を示す。
【図３９Ｃ】ＦＬＴ３　Ｎ３９９ＤまたはＮ３９９Ｇが、４Ｇ８　ＣＡＲ殺傷を回避することを示す。スリーピングビューティートランスポザーゼによってＦＬＴ３バリアントを発現しているＫ５６２細胞を、異なるエフェクター：標的比（Ｅ：Ｔ）で４Ｇ８個のＣＡＲ－Ｔ細胞とともに培養した。左：４Ｇ８　ＣＡＲとの４８時間の共培養後の、ＦＬＴ３ＷＴまたはＮ３９９Ｄのいずれかを発現しているＫ５６２細胞の代表的なフローサイトメ

トリープロット。Ｔ細胞及び標的細胞を、それぞれＣＤ３及びＦＬＴ３染色によって同定する。左から右へ、ｉ）Ｅ：Ｔ＝０に対する持続する生きている標的細胞の割合（ＡｎｎｅｘｉｎＶ－７ＡＡＤ－細胞の絶対数）を報告するプロット、ｉｉ）ＣＤ６９染色（％）によるＴ細胞活性化、及びｉｉｉ）Ｅ：Ｔ＝０で正規化したＢＶ１０Ａ４染色による残留する生きている標的細胞上のＦＬＴ３の表面発現。平均±ＳＤ（Ｎ＝４）。二元配置分散分析による比較。

【図３９Ｄ】ＫＩＴ　Ｈ３７８Ｒが、７９Ｄ　ＣＡＲ殺傷を回避することを示す。左：７９Ｄ　ＣＡＲとの４８時間の共培養後のスリーピングビューティートランスポザーゼによるＫＩＴ　ＷＴまたはＨ３７８Ｒのいずれかを発現しているＫ５６２細胞の代表的なフローサイトメトリープロット。Ｔ細胞及び標的細胞が、それぞれＣＤ３及びＫＩＴ染色によって同定される。左から右へ、ｉ）Ｅ：Ｔ＝０に対する持続する生きている標的細胞の割合（ＡｎｎｅｘｉｎＶ－７ＡＡＤ－細胞の絶対数）を報告するプロット、ｉｉ）ＣＤ６９染色（％）によるＴ細胞活性化、及びｉｉｉ）Ｅ：Ｔ＝０で正規化した１０４Ｄ２染色による残留する生きている標的細胞上のＫＩＴの表面発現。Ｋ５６２：未形質導入。平均±ＳＤ（Ｎ＝４）。二元配置分散分析による比較。

【図３９Ｅ】ＣＤ１２３^{S59}　ＢＥ細胞が、ＣＳＬ３６２　ＣＡＲに耐性であることを示す。左：ＣＤ１２３について、ＣＤ１２３－レポーターＫ５６２塩基で編集された、またはＣＳＬ３６２　ＣＡＲとの４８時間の共培養後の未修飾の代表的なフローサイトメトリープロット。Ｔ細胞をＣＤ３／４／８染色によって同定する。左から右へ、Ｅ：Ｔ＝０に対する持続する生きている標的細胞の割合（ＡｎｎｅｘｉｎＶ－７ＡＡＤ－細胞の絶対数）を報告するプロット、ｉｉ）ＣＤ６９染色（％）によるＴ細胞活性化、及びｉｉｉ）９Ｆ５染色による残留する生きている標的細胞上のＣＤ１２３の表面発現。平均±ＳＤ（Ｎ＝４）。二元配置分散分析による比較。

【図４０Ａ】インビトロ培養中のＣＡＲ－Ｔ細胞のＣＤ４／ＣＤ８組成を示す。新鮮な健常ドナー由来ＰＢＭＣを、ＣＤ３／ＣＤ２８ダイナビーズ（ビーズ：細胞比＝３：１）、ＩＬ－７　５ｎｇ／ｍＬ及びＩＬ－１５　５ｎｇ／ｍＬとともに培養し、２日目（Ｄ）にレンチウイルスを形質導入した。４Ｇ８　ＣＡＲをコードするベクター（ＬＶ）を含む。培養組成を、２、４、６、１２日目にフローサイトメトリーによって評価した。プロットは、異なる感染多重度（ＭＯＩ）でＬＶ形質導入されたＮ＝５の条件を報告する。平均±ＳＤ。

【図４０Ｂ】フローサイトメトリーによるＣＡＲ－Ｔ細胞表現型を示す。Ｔ細胞サブセットを、ＣＤ６２Ｌ及びＣＤ４５ＲＡ染色によって評価した（ＣＤ４５ＲＡ＋６２Ｌ＋、ナイーブ／Ｔ幹細胞、ＣＤ４５ＲＡ－６２Ｌ＋、セントラルメモリ、ＣＭ、ＣＤ４５ＲＡ－６２Ｌ－、エフェクターメモリ、ＥＭ、ＣＤ４５ＲＡ＋６２Ｌ－、最終分化ＥＭ細胞）。ＣＤ４５ＲＡ、ＥＭＲＡを再発現）。代表的なＦＡＣＳプロット（左）ならびにＣＤ４＋及びＣＤ８＋サブセットによる培養組成（右）を報告する。Ｄ０は、フィコール分離後の未培養の末梢血Ｔ細胞を指す。平均±ＳＤ（Ｎ＝５）。

【図４０Ｃ】ＦＬＴ３^{N399}　ＢＥ細胞が保護されている間に、ＦＬＴ３^{WT}細胞が４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞によって排除されることを示す。未修飾または塩基編集されたＦＬＴ３^{N399}のいずれかのＦＬＴ３レポーターＫ５６２細胞との４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞の共培養アッセイ。（左）生細胞（ＡｎｎｅｘｉｎＶ－７ＡＡＤ－）でゲート化された初期時点（６時間）での代表的なフローサイトメトリープロット。Ｔ細胞はＣｅｌｌＴｒａｃｅマーキングによって同定され、一方、Ｋ５６２標的はＦＬＴ３＋である。（左から右）６時間（％）での標的細胞生存率、６時間（％）でのＣＤ１０７ａ表面染色によるＴ細胞脱顆粒、及び４８時間での生存標的細胞におけるＦＬＴ３発現（ＭＦＩ、Ｅ：Ｔ＝０で正規化）。Ｎ＝２。二元配置分散分析による比較。

【図４０Ｄ－１】エピトープ操作受容体が、ＣＡＲ－Ｔ細胞からの保護を提供することを示す。各行は、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及びＫＩＴを発現するＫ５６２細胞との共培養からの追加のプロットを報告する（図３９Ｃ、Ｄ、Ｅで報告した同じ実験）。列ごとに左から右へ：共培養４８時間時点でのＣＡＲ－Ｔ細胞のＣｅｌｌＴｒａｃｅ　ＭＦＩ、ＣＡＲ

－Ｔ細胞との共培養４８時間後の標的細胞生存率（％）、未形質導入との共培養４８時間後の標的細胞生存率。Ｔ細胞（％）、未形質導入Ｔ細胞との４８時間の共培養後の生細胞の絶対数（ＡｎｎｅｘｉｎＶ－７ＡＡＤ－、Ｅ：Ｔ＝０で正規化）、４８時間の共培養後のＣＤ６９＋未形質導入Ｔ細胞（％）、４８時間の未形質導入Ｔ細胞との共培養後の標的細胞上のＦＬＴ３、ＣＤ１２３及びＫＩＴ　ＭＦＩ（非正規化）。平均±ＳＤ（Ｎ＝４）。

【図４０Ｄ－２】上記のとおり。

【図４０Ｄ－３】上記のとおり。

【図４０Ｅ－１】２つの標的細胞集団（一方はＦＬＴ３を発現し、他方はＣＤ１２３を発現する）を用いた共培養アッセイの実験レイアウトを示す。未修飾またはエピトープ編集されたＦＬＴ３及びＣＤ１２３　Ｋ５６２レポーター細胞を約１：１の比で混合し、４Ｇ８　ＣＡＲ、ＣＳＬ３６２　ＣＡＲまたは未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。生きた標的細胞（ＦＬＴ３＋またはＣＤ１２３＋上で事前にゲーティングされた）のＦＬＴ３＋／ＣＤ１２３＋％組成を、異なるエフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比での各組み合わせについての棒プロットとして報告する。平均±ＳＤ（Ｎ＝４）。

【図４０Ｅ－２】上記のとおり。

【図４１Ａ】ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの培養、塩基の編集、及び分析の概略図である。ｍＰＢ：動員末梢血、ＨＳＰＣ：造血幹細胞及び前駆細胞、ＦＬＴ３Ｌ：ＦＬＴ３リガンド、ＳＣＦ：幹細胞因子、ＴＰＯ：トロンボポエチン、ＳＲ－１：ＳｔｅｍＲｅｇｅｎｉｎ。

【図４１Ｂ】異なる用量のアデニンＢＥ　ｍＲＮＡを用いたエレクトロポレーション後に測定した、ＦＬＴ３、ＫＩＴ、及びＣＤ１２３のｇＲＮＡ配列内の各アデニンでのＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの編集ウィンドウ及び編集効率を報告する代表的なプロットである。平均±ＳＤ。

【図４１Ｃ】バルクＣＤ３４＋細胞またはＦＡＣＳで選別されたステム濃縮ＣＤ９０＋もしくはステム枯渇ＣＤ９０－サブセットにおける編集効率を示す。平均±ＳＤ（Ｎ＝２ドナー）。

【図４１Ｄ】エピトープ編集ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの免疫表現型を示す。左：塩基編集後５日目のインビトロ培養中のＣＤ３４＋１３３＋　ＨＳＰＣ内のＣＤ９０／ＣＤ４５ＲＡサブセットを示す代表的なフローサイトメトリープロット。右：ＦＬＴ３^{N399}、ＫＩＴ^{H378R}、ＣＤ１２３^{S59}エピトープ編集ＣＤ３４＋細胞のＣＤ９０／ＣＤ４５ＲＡサブセット組成を示す棒プロット。平均±ＳＤ。試料サイズは棒グラフ内に報告されている。

【図４１Ｅ】ＦＬＴ３^{N399}エピトープ編集ＨＳＰＣに対するインビトロ４Ｇ８　ＣＡＲ殺傷アッセイである。４Ｇ８　ＣＡＲまたは未形質導入Ｔ細胞との共培養から４８時間後の、ＦＬＴ３またはＡＡＶＳ１塩基編集のいずれかの、ＡｎｎｅｘｉｎＶ－７ＡＡＤ染色によるＣＤ３４＋４５ＲＡ＋細胞の持続する生細胞の画分（左）及び生存率（右）。平均±ＳＤ（Ｎ＝４）。二元配置分散分析による比較。

【図４１Ｆ】ＣＤ１２３^{S59}エピトープ編集ＨＳＰＣに対するインビトロＣＳＬ３６２ＣＡＲ殺傷アッセイである。ＣＳＬ３６２　ＣＡＲまたは未形質導入Ｔ細胞との共培養から４８時間後のＣＤ１２３^{S59}またはＡＡＶＳ１－ＢＥ　ＨＳＰＣのＡｎｎｅｘｉｎＶ－７ＡＡＤ染色による持続する生ＣＤ９０＋細胞の画分（左）及びＣＤ３４＋細胞の生存率（右）。Ｎ　＝　２つの異なるＨＳＰＣドナーで８。二元配置分散分析による比較

【図４１Ｇ】Ｆａｂ－７９Ｄ　ｍＡｂの濃度を増加させてプレートし、４８時間培養したＫＩＴ^{H378}　ＢＥまたはＡＡＶＳ１　ＢＥ　ＨＳＰＣのｍＡｂなし対照に対する絶対生ＣＤ３４＋細胞の割合を示す。平均±ＳＤ。Ｎ　＝　２つの異なるＨＳＰＣドナーで６。二元配置分散分析による比較

【図４１Ｈ】塩基編集ＨＳＰＣの総ＣＤ３４＋及びＣＤ９０＋４５ＲＡ－細胞（左上）ならびに骨髄及び赤血球系コロニー（Ｎ＝２、左下）の絶対数を示す。右：プレーティングから１４日後のＣＦＵプレート（２つの複製のうちの１つ）の代表的な画像。

【図４１Ｉ】一次及び二次異種移植及びＦＬＴ３^{N399}またはＡＡＶＳ１　ＢＥ　ＨＳＰＣの分析の概略図である。

【図４１Ｊ】一次レシピエントにおける異なる時点でのフローサイトメトリーによるヒト生着（ｈＣＤ４５＋細胞）（左）、及びフローサイトメトリーによる総ヒト（ｈＣＤ４５＋）細胞のパーセンテージとしてのＢＭ系統組成（右）を示す。ＰＭＮ：多形核顆粒球、ｍｏｎｏ：単球、ｌｉｎ－：系統陰性。平均±ＳＤ。ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}　Ｎ＝７、ＡＡＶＳ１　ＢＥ　Ｎ＝４。二元配置分散分析による比較。

【図４１Ｋ】一次及び二次移植マウスの異なる時点での総循環細胞、造血器官、またはＣＦＵに対して測定されたＦＬＴ３編集レベルを示す。平均±ＳＤ。ＬＣ：液体培養、Ｗ８：８週目、Ｗ１２：１２週目、ＳＰ：脾臓、ＢＭ：骨髄、ＣＦＵ：コロニー形成単位。

【図４２Ａ】塩基エディターｍＲＮＡのインビトロ転写（ＩＶＴ）に使用したプラスミド鋳型の概略図である。ＩＩＳ制限酵素ＢｂｓＩを使用して鋳型を直鎖化した。Ｔ７、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼプロモーター、ＵＴＲ、非翻訳領域、ＨＢＢ、ヘモグロビンβ遺伝子、ｐｏｌｙＡ、ポリアデニン配列（約１１０～１２０ｎｔ）。

【図４２Ｂ】品質管理のためにＡｇｉｌｅｎｔ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　ＲＮＡで分析した、ＩＶＴ　ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ　ｍＲＮＡの代表的なプロットである。＞９０％のＩＶＴ　ｍＲＮＡが、予測サイズに対応する。

【図４２Ｃ】ｓｇＲＮＡ－１８によりＦＬＴ３^{Ｎ３９９}について塩基編集されたＦＬＴ３レポーターＫ５６２細胞に対するＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ　Ｖ１０６Ｗ　ｍＲＮＡ用量探索試験である。右は、フローサイトメトリーによるｍＲＮＡ×ｓｇＲＮＡの用量とのＦＬＴ３編集効率の相関、ならびにフローサイトメトリー及びｇＤＮＡ分析によるＦＬＴ３編集効率の相関。スピアマンr^2　及びｐ値を報告している。

【図４２Ｄ】ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ塩基編集ｍＲＮＡの最適化を示す。いくつかのＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ　ｍＲＮＡバリアントを二重ＦＬＴ３／ＣＤ１２３編集実験で調べた。試験した変数には、ｍＲＮＡ精製方法（ビーズ、ｓｐａｒＱ　ＰｕｒｅＭａｇ磁気ビーズ；カラム、ＮＥＢ　Ｍｏｎａｒｃｈ　ＲＮＡカラム）、脱リン酸化、Ｎ１－メチル－シュードーウリジン（Ｎ１ｍ－Ｕ）または５－メトキシ－ウリジン（５ｍｅ－　Ｕ）でのＵＴＰの置換、キャッピング技術（ＣｌｅａｎＣａｐ、Ｔｒｉｌｉｎｋ　ＣｌｅａｎＣａｐ　ＡＧ；ＡＲＣＡ、ＮＥＢ　３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ　ＲＮＡキャップ構造類似体）、及びＫ９１８Ｎ　ＳｐＣａｓ９変異（報告されたヌクレアーゼ効率を改善するための方法）が含まれる。^{64}ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）分析（％）によるＦＬＴ３及びＣＤ１２３の編集効率、ならびにインビトロ培養の終了時のバルク（ＣＤ３４＋）細胞及びステム濃縮（ＣＤ９０＋４５ＲＡ－）細胞の絶対数を示す棒プロット。

【図４２Ｅ】塩基編集のための培養条件の最適化を示す。ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣを、ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ　ｍＲＮＡ及びＦＬＴ３^{Ｎ３９９}　ｓｇＲＮＡで塩基編集した。エレクトロポレーション中にサプリメント（ＲＮＡｓｉｎ、Ｐｒｏｍｅｇａ　ＲＮＡｓｉｎ　ＲＮＡｓｅ阻害剤；グリセロール）を添加するか、またはサイトカイン濃度の調節（標準：１００ｎｇ／ｍＬのＦＬＴ３Ｌ，ＳＣＦ、及び５０ｎｇ／ｍＬのＴＰＯ；１．５×：１５０ｎｇ／ｍＬのＦＬＴ３Ｌ，ＳＣＦ、及び７５ｎｇ／ｍＬのＴＰＯ；３×：３００ｎｇ／ｍＬのＦＬＴ３Ｌ，ＳＣＦ、及び１５０ｎｇ／ｍＬのＴＰＯ；＋ＩＬ－３：ｈＩＬ－３２０ｎｇ／ｍＬを添加した標準）、異なる幹細胞保存化合物（標準：ＳＲ－１　０．７５μＭ，ＵＭ１７１　３５ｎＭ；ＳＲ－１のみ　０．７５μＭ；ＵＭ１７１のみ　３５ｎＭ；ＳＲ－１／ＵＭ１７１なし）、抗炎症化合物（ＰＧＥ２，プロスタグランジンＥ２　１０μＭ；ＤＥＸ，デキサメタゾン　１μＭ）の添加を含む異なる培養条件を用いた。ｇＤＮＡ分析によるＦＬＴ３編集効率（％）、ならびにインビトロ培養の終了時のバルク（ＣＤ３４＋）細胞及びステム濃縮（ＣＤ９０＋４５ＲＡ－）細胞の絶対数を示す棒プロット。

【図４２Ｆ】棒プロットである。ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣは、解凍後、異なる時点（２４時間、４８時間、７２時間）でエレクトロポレーションを行った。各条件を、選択した標的（ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、ＫＩＴ）のうちの２つの全ての組み合わせについて編集した。ｇＤＮＡ分析（％）による編集効率、ならびにインビトロ培養終了時のバルク（ＣＤ３４＋）細胞及びステム濃縮（ＣＤ９０＋４５ＲＡ－）細胞の絶対数を示す棒プロット。

【図４２Ｇ】編集されたＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの分析のために使用したゲーティング戦略を示す代表的なフローサイトメトリープロットである。左から右の順に、細胞を、シングレット（ＦＳＣ－Ｈ／ＦＳＣ－Ａプロット）、生存（ＰＩ／ＦＳＣ－Ａプロット、ＰＩ、ヨウ化プロピジウム）、物理的パラメータ（ＳＳＣ－Ａ／ＦＳＣ－Ａプロット）、ＣＤ３４＋についてゲーティングした。（ＣＤ３４／ＣＤ９０プロット）、ＣＤ１３３＋　（ＣＤ３４／ＣＤ１３３プロット）、及びＣＤ４５ＲＡ－９０＋、ＣＤ４５ＲＡ－９０－、ＣＤ４５ＲＡ＋９０－（ＣＤ４５ＲＡ／９０プロット）を含む。シングレット（Ｓ）で事前にゲーティングした後、ビーズ（Ｂ）ゲートでＣｏｕｎｔＢｅａｄｓ（ＦＳＣ－Ａ^{低}ＰＩ^{高}）を特定する。デブリを除外するために、これを２つの追加の蛍光パラメータでさらにゲーティングする（図示せず）。

【図４２Ｈ】エピトープ編集ＨＳＰＣが、サイトカイン刺激に対する増殖性応答を保持していることを示す。ＦＬＴ３、ＫＩＴ、及びＣＤ１２３塩基編集ＣＤ３４＋ＨＳＰＣを、異なる濃度のそれぞれのリガンドとともにプレーティングし、４日間培養した。絶対数は、ＣｏｕｎｔＢｅａｄｓを使用してフローサイトメトリーによって得た。

【図４２Ｉ】実験のエンドポイントでの編集効率を示す（ｇＤＮＡ分析のために技術的三連を一緒にプールした）（図４２Ｈを参照されたい）。平均±ＳＤ。２個体の健康なドナーでＮ＝４。二元配置分散分析による多重比較。

【図４３Ａ】図３Ｉに示す実験からのＢＭ細胞を異種移植した二次レシピエントＮＢＳＧＷマウス（各々、１個体の二次レシピエントに一次移植した）のエンドポイントでの１２週目（Ｗ１２）の末梢血及び骨髄（ＢＭ）におけるフローサイトメトリーによるヒト生着（％ｈＣＤ４５＋）を示す。平均±ＳＤ。二元配置分散分析による比較。

【図４３Ｂ】二次異種移植マウスのＢＭにおける骨髄系（左）及びリンパ系（右）系統の絶対数を示す。ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}　Ｎ＝４、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}　Ｎ＝７。平均±ＳＤ。二元配置分散分析による比較。ＨＳＣ：造血幹細胞、ＭＰＰ：多能性前駆細胞、ＬＭＰＰ：リンパ系プライミング多能性前駆細胞、ＣＭＰ：共通骨髄系前駆細胞、ＧＭＰ：顆粒球－単球前駆細胞、骨髄芽細胞：ＣＤ３３／６６ｂ＋１９－１４－１１ｃ－３４－ＳＳＣ^{低}として定義される、ｍｏｎｏ：単球、ｉＰＭＮ：未熟多形核顆粒球、成熟ＰＭＮ：成熟顆粒球。

【図４３Ｃ】９週目、１１週目（Ｗ９、Ｗ１１）での１ＭのＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ（ＡＡＶＳ１またはＫＩＴ^{Ｈ３７８}編集のいずれか）を異種移植したＮＢＳＧＷの末梢血及びＢＭにおけるフローサイトメトリーによるヒト生着（ｈＣＤ４５＋％）を示す。平均±ＳＤ。二元配置分散分析による比較。

【図４３Ｄ】Ｃからのマウスの骨髄系（左）及びリンパ系（右）系統の絶対数を示す。二元配置分散分析による比較。ＡＡＶＳ１　Ｎ＝５、ＫＩＴ^{Ｈ３７８}　Ｎ＝４。

【図４３Ｅ】液体培養（ＬＣ）、移植後９週目（Ｗ９）の総血液細胞、ならびに実験の終了時のＦＡＣＳ選別Ｂ（ＣＤ１９）及び骨髄（ＣＤ３３）ＢＭ細胞に対して測定したＫＩＴ編集効率を示す。平均±ＳＤ。

【図４３Ｆ】ヒトＰＤＸを形質導入するために使用したｈＰＧＫプロモーターの下でｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ蛍光タンパク質をコードするレンチウイルスベクターの概略図（左）、及び骨髄（ＰＤＸ－１）または脾臓（ＰＤＸ－２）試料に対する患者由来ＡＭＬ異種移植片の形質導入効率を示す代表的なフローサイトメトリープロット（右）を示す。ＰＤＸ細胞を、エクスビボで一晩形質導入し、増殖させるためにＮＢＳＧＷマウスに移植し、ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ＋細胞についてＦＡＣＳ選別し、二次レシピエントに注射した。

【図４３Ｇ】インビボ実験に使用したＡＭＬ　ＰＤＸの解凍時の遺伝的特徴（左）及び表面免疫表現型（右）を示す。遺伝子変異及び各マーカーの陽性細胞％は、ヒートマップで報告される。ＩＴＤ、内部直列重複、ＴＫＤ、チロシンキナーゼドメインの変異。

【図４４Ａ】ＡＭＬ　ＰＤＸ－１と共生着させ、４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処理したＦＬＴ３^{Ｎ３９９}またはＡＡＶＳ１　ＢＥ　ＨＳＰＣの異種移植及び分析の概略図である。

【図４４Ｂ】４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処理したマウスまたは未処理のマウスのエンドポイントでの、液体培養（ＬＣ）、総血液細胞（８、９週目）、ならびに選別されたＣＤ３３＋及びＣＤ１９＋骨髄（ＢＭ）細胞に対して測定されたＦＬＴ３塩基編集を示す。複数

の対応のないｔ検定。平均±ＳＤ。
【図４４Ｃ】ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ、ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ　＋　ＡＭＬ　ＰＤＸ－１またはＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ　＋　ＡＭＬ　ＰＤＸ－１を生着させ、４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔで処理したマウスからのＢＭ試料の代表的なフローサイトメトリープロットである。プロットは、ヒトＣＤ４５＋で事前にゲーティングされている。ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ＣＤ３染色によって同定され、ＡＭＬ　ＰＤＸ細胞は、ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ＋　である。平均±ＳＤ。一元配置分散分析による比較。
【図４４Ｄ】ｈＣＤ４５＋ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－　ＢＭ細胞内のＣＤ３＋細胞の割合（％）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。一元配置分散分析による比較。
【図４４Ｅ】ｈＣＤ４５＋ＣＤ３－　ＢＭ細胞内のＡＭＬ細胞のパーセンテージを示す棒プロットである。平均±ＳＤ。
【図４４Ｆ】総ＢＭ由来ＣＦＵに対するフローサイトメトリーによって測定されたＡＭＬ（ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ＋）細胞のパーセントを示す棒プロットである。平均±ＳＤ。一元配置分散分析によるＦＬＴ３^{Ｎ３９９}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件の統計的比較。
【図４４Ｇ】ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}またはＡＡＶＳ１　ＢＥ　ＨＳＰＣを移植したマウスにおける４Ｇ８　ＣＡＲ－ＴによるＢＭ　Ｂ細胞（ＣＤ１９＋）の枯渇を示す代表的なＦＡＣＳプロットである。プロットは、ｈＣＤ４５＋ＣＤ３－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－上で事前にゲーティングされている。
【図４４Ｈ】ｈＣＤ４５＋ＣＤ３－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－内のプレＢ細胞（ＣＤ１９＋１０＋３４－）（図４４Ｈ）、プロＢ細胞（ＣＤ１９＋１０＋３４＋）（図４４Ｉ）の割合（％）、及び骨髄細胞（ＣＤ３３／６６ｂ＋）内の未熟顆粒球（ＣＤ３３／６６ｂ＋１４－１０－１１ｃ－ＳＳＣ^{高}）（図４４Ｉ）の割合（％）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。一元配置分散分析によるＦＬＴ３^{Ｎ３９９}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件の統計的比較。
【図４４Ｉ】ｈＣＤ４５＋ＣＤ３－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－内のプレＢ細胞（ＣＤ１９＋１０＋３４－）（図４４Ｈ）、プロＢ細胞（ＣＤ１９＋１０＋３４＋）（図４４Ｉ）の割合（％）、及び骨髄細胞（ＣＤ３３／６６ｂ＋）内の未熟顆粒球（ＣＤ３３／６６ｂ＋１４－１０－１１ｃ－ＳＳＣ^{高}）（図４４Ｉ）の割合（％）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。一元配置分散分析によるＦＬＴ３^{Ｎ３９９}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件の統計的比較。
【図４４Ｊ】ｈＣＤ４５＋ＣＤ３－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－内のプレＢ細胞（ＣＤ１９＋１０＋３４－）（図４４Ｈ）、プロＢ細胞（ＣＤ１９＋１０＋３４＋）（図４４Ｉ）の割合（％）、及び骨髄細胞（ＣＤ３３／６６ｂ＋）内の未熟顆粒球（ＣＤ３３／６６ｂ＋１４－１０－１１ｃ－ＳＳＣ^{高}）（図４４Ｉ）の割合（％）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。一元配置分散分析によるＦＬＴ３^{Ｎ３９９}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件の統計的比較。
【図４４Ｋ】系統－ＣＤ３４＋３８＋１０－前駆細胞の組成を示す代表的なＦＡＣＳプロットである。顆粒前駆細胞（ＧＭＰ）はＣＤ４５ＲＡ＋ＦＬＴ３＋として定義され、共通骨髄系前駆細胞（ＣＭＰ）はＣＤ４５ＲＡ－ＦＬＴ３＋として、及びメガ赤血球系前駆細胞（ＭＥＰ）はＣＤ４５ＲＡ－ＦＬＴ３－として定義される。
【図４４Ｌ】ｌｉｎ－ＣＤ３４＋３８＋内のＧＭＰ％を示す棒ブロットである。平均±ＳＤ。
【図４４Ｍ】ＨＳＣから分化した白血球までの、ＢＭにおける骨髄系サブセットの絶対数を示す。未処理マウスを一緒にプールした（灰色の棒）。４Ｇ８処理ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}及びＡＡＶＳ１　ＢＥマウスを、それぞれ桃色及び黄色で報告する。平均±ＳＤ。ＣＡＲ処理群の絶対数の倍率変化（ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}／ＡＡＶＳ１）を、各集団の棒プロットの上に報告する。多重比較を伴う一元配置分散分析。４Ｇ８　ＣＡＲで処理したＦＬＴ３^{Ｎ３９９}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件間の比較のＦＤＲ調整ｐ値を報告する（ｐ＜０．０５は太字）。
【図４４Ｎ】系統－ＣＤ３４＋３８－１０－前駆細胞の組成を示す代表的なＦＡＣＳプロットである。幹細胞（ＨＳＣ）は、ＣＤ４５ＲＡ－９０＋として定義され、複能性前駆細胞（ＭＰＰ）は、ＣＤ４５ＲＡ－９０－として定義され、リンパ系プライミングＭＰＰ（ＬＭＰＰ）は、ＣＤ４５ＲＡ＋９０－として定義される。

【図４４Ｏ】ｌｉｎ－ＣＤ３４＋３８－内のＬＭＰＰ（％）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。
【図４４Ｐ】ＨＳＣから分化した白血球までの、ＢＭにおけるリンパ系統サブセットの絶対数を示す。プレＢ／ＮＫは、ＣＤ３３／６６ｂ－１９－５６－３４＋３８＋１０＋として定義され、プロＢリンパ球は、ＣＤ３３／６６ｂ－１９－５６－３４－１０＋として定義され、プロＢ細胞は、ＣＤ３３／６６ｂ－１９＋１０＋３４＋として定義され、プレＢ細胞は、ＣＤ３３／６６ｂ－１９＋１０＋３４－として定義され、成熟Ｂ細胞は、ＣＤ３３／６６ｂ－１９＋１０－３４－として定義される。未処理マウスを一緒にプールした（灰色の棒）。４Ｇ８処理ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}及びＡＡＶＳ１　ＢＥマウスを、それぞれ桃色及び黄色で報告する。ＣＡＲ処理群の絶対数の倍率変化（ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}／ＡＡＶＳ１）を、各集団の棒プロットの上に報告する。平均±ＳＤ。多重比較を伴う一元配置分散分析。４Ｇ８　ＣＡＲで処理したＦＬＴ３^{Ｎ３９９}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件間の比較のＦＤＲ調整ｐ値を報告する（ｐ＜０．０５は太字）。
【図４５Ａ】ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}及びＦＬＴ３^{Ｎ３９９}ＨＳＰＣを異種移植したＮＢＳＧＷマウスの８週目の末梢血系統組成を示す。平均±ＳＤ。ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}　Ｎ＝１３、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}　Ｎ＝１８。対応のないｔ検定による統計的比較。
【図４５Ｂ】系統陰性ＣＤ３４＋前駆細胞が、インビボで４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔによって枯渇され、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}編集によって保護されることを示す（図４４からの実験）。ＣＤ３４＋前駆細胞のゲーティングを伴う系統樹－ｎｅｇ細胞（ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－ＣＤ３－１９－１４－１１ｃ－５６－）の代表的なフローサイトメトリープロット（ゲート内で報告される％）。
【図４５Ｃ】ｈＣＤ４５＋３－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－　ＢＭ細胞内のｌｉｎ－ＣＤ３４＋細胞の割合（％）を示す。平均±ＳＤ。一元配置分散分析による比較。
【図４５Ｄ】図４４からのマウスのＢＭ　ｌｉｎ－ＣＤ３４＋の相対組成を示す。平均±ＳＤ。多重比較を伴う二元配置分散分析（ＡＡＶＳ１対ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}の比較のみを報告する）。ＨＳＣ：造血幹細胞、ＭＰＰ：多能性前駆細胞、ＬＭＰＰ：リンパ系プライミング多能性前駆細胞、ＣＭＰ：共通骨髄系前駆細胞、ＧＭＰ：顆粒球－単球前駆細胞、ＭＥＰ：巨赤血球系前駆細胞。
【図４５Ｅ】エンドポイントでの骨髄系（左）及びリンパ系（右）ＢＭサブセット上のＦＬＴ３発現（ＭＦＩ）を示す。４Ｇ８　ＣＡＲ処理ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}条件からのＬＭＰＰ、ＭＰＰ、及びＨＳＣは、細胞数が少ないため評価可能ではない（ＮＥ）。平均±ＳＤ。複数の対応のないｔ検定による統計学的差異を報告する。
【図４５Ｆ】図４４からのマウスのＢＭにおける、フローサイトメトリーによるＣＡＲ細胞表現型を示す。ＣＤ４５ＲＡ＋６２Ｌ＋：ナイーブ、ＣＤ４５ＲＡ－６２Ｌ＋：セントラルメモリ（ＣＭ）、ＣＤ４５ＲＡ－６２Ｌ－：エフェクターメモリ（ＥＭ）、ＣＤ４５ＲＡ＋６２Ｌ：ＣＤ４５ＲＡを再発現する最終分化ＥＭ細胞（ＥＭＲＡ）。
【図４５Ｇ】（左から右に）ＢＭ　ＣＤ３＋細胞内のＥＧＦＲｔ＋の割合（％）、ＢＭ　ＣＤ８＋　ＣＡＲ　Ｔ細胞上のＰＤ１（ＣＤ２７９）のＭＦＩ、及びＢＭ　ＣＤ４＋　ＣＡＲ　Ｔ細胞上のＰＤ１（ＣＤ２７９）のＭＦＩを報告する棒プロットである。平均±ＳＤ。一元配置分散分析によるＡＡＶＳ１^{ＢＥ}及びＦＬＴ３^{Ｎ３９９}条件間の比較を報告する。
【図４５Ｈ】１０週目にＡＡＶＳ１^{ＢＥ}及びＣＤ１２３^{Ｓ５９}　ＨＳＰＣを異種移植したＮＢＳＧＷマウスの末梢血系統組成を示す（図４６からの実験）。平均±ＳＤ（Ｎ＝１１）。対応のないｔ検定による統計的比較を報告する。
【図４５Ｉ】系統陰性ＣＤ３４＋前駆細胞が、インビボでＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔによって枯渇されることを示す（図４６からの実験）。左、ＣＤ３４＋前駆細胞のゲーティングを行った系統陰性細胞（ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－ＣＤ３－１９－１４－１１ｃ－５６－）の代表的なフローサイトメトリープロット。右は、ＨＳＣ（ＣＤ４５ＲＡ－９０＋）、ＭＰＰ（ＣＤ４５ＲＡ－９０－）、ＬＭＰＰ（ＣＤ４５ＲＡ＋９０－）サブセットのゲーティングを伴うｌｉｎ－ＣＤ３４＋３８－１０－細胞の代表的なフローサイトメトリープ

ロットである。
【図４５Ｊ】図４６からのマウスのＢＭ　ｌｉｎ－ＣＤ３４＋の相対組成を示す。平均±ＳＤ。多重比較を伴う二元配置分散分析（ＡＡＶＳ１対ＣＤ１２３^{S59}の比較のみを報告する）。ＨＳＣ：造血幹細胞、ＭＰＰ：多能性前駆細胞、ＬＭＰＰ：リンパ系プライミング多能性前駆細胞、ＣＭＰ：共通骨髄系前駆細胞、ＧＭＰ：顆粒球－単球前駆細胞、ＭＥＰ：巨赤血球系前駆細胞。
【図４６Ａ】ＡＭＬ　ＰＤＸ－１と共生着させ、５ＭのＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処理したＣＤ１２３^{S59}またはＡＡＶＳ１　ＢＥ　ＨＳＰＣの異種移植及び分析の概略図である。
【図４６Ｂ】ＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処理された、または未処理のマウスのエンドポイントでの総血液細胞（８、１０週目）、ならびに選別されたＣＤ３３＋及びＣＤ１９＋骨髄（ＢＭ）細胞に対して測定されたＣＤ１２３塩基編集を示す。ＣＤ１２３^{S59}Ｎ＝６、ＡＡＶＳ１　ＢＥ　Ｎ＝５。平均±ＳＤ。複数の対応のないｔ検定による統計的比較。
【図４６Ｃ】ＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔで処理されたか、または未処理のいずれかのＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ　＋　ＡＭＬ　ＰＤＸ－１を生着したマウス、及びＡＭＬ　ＰＤＸ－１のみを生着したマウスからのＢＭ試料の代表的なフローサイトメトリープロットを示す。プロットは、総ヒトＣＤ４５＋で事前にゲーティングされている。ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ＣＤ３染色によって同定され、一方、ＡＭＬ　ＰＤＸ細胞は、ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ＋である。
【図４６Ｄ】ｈＣＤ４５＋ＣＤ３－　ＢＭ細胞内のＡＭＬ　ＰＤＸ細胞の割合（％）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。
【図４６Ｅ】ｈＣＤ４５＋ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－　ＢＭ細胞内のＣＤ３＋細胞の割合（％）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。
【図４６Ｆ】ＢＭにおける総ｈＣＤ４５＋３－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－細胞の絶対数を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。
【図４６Ｇ】ヒトＣＤ４５＋３－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－　ＢＭ細胞内のプロＢ細胞（ＣＤ１９＋１０－３４－）の割合（％）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。一元配置分散分析によるＣＤ１２３^{S59}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件の統計的比較。
【図４６Ｈ】ＣＤ１２３^{S59}またはＡＡＶＳ１　ＢＥ　ＨＳＰＣを移植したマウスにおけるＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－ＴによるＢＭ骨髄細胞（ＣＤ３３／６６ｂ＋１９－、橙色のゲーティングで強調表示）の枯渇を示す代表的なＦＡＣＳプロット（左）、及び顆粒球（ＰＭＮ、ＣＤ３３／６６ｂ＋１９－１４－ＳＳＣ^{高}、橙色のゲーティング）の枯渇を示す代表的なＦＡＣＳプロットを示す
【図４６Ｉ】総骨髄細胞（ｈＣＤ４５＋細胞内のＣＤ３３／６６ｂ＋１９－）（図４６Ｉ）、ＰＭＮ（ＣＤ３３／６６ｂ＋１９－細胞内のＣＤ３３／６６ｂ＋１９－）（図４６Ｊ）、未熟ＰＭＮ（ＣＤ３３／６６ｂ＋１９－細胞内のＣＤ３３／６６ｂ＋１９－１４－１０－１１ｃ－ＳＳＣ^{高}）（図４６Ｋ）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。一元配置分散分析によるＣＤ１２３^{S59}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件の統計的比較。
【図４６Ｊ】総骨髄細胞（ｈＣＤ４５＋細胞内のＣＤ３３／６６ｂ＋１９－）（図４６Ｉ）、ＰＭＮ（ＣＤ３３／６６ｂ＋１９－細胞内のＣＤ３３／６６ｂ＋１９－）（図４６Ｊ）、未熟ＰＭＮ（ＣＤ３３／６６ｂ＋１９－細胞内のＣＤ３３／６６ｂ＋１９－１４－１０－１１ｃ－ＳＳＣ^{高}）（図４６Ｋ）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。一元配置分散分析によるＣＤ１２３^{S59}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件の統計的比較。
【図４６Ｋ】総骨髄細胞（ｈＣＤ４５＋細胞内のＣＤ３３／６６ｂ＋１９－）（図４６Ｉ）、ＰＭＮ（ＣＤ３３／６６ｂ＋１９－細胞内のＣＤ３３／６６ｂ＋１９－）（図４６Ｊ）、未熟ＰＭＮ（ＣＤ３３／６６ｂ＋１９－細胞内のＣＤ３３／６６ｂ＋１９－１４－１０－１１ｃ－ＳＳＣ^{高}）（図４６Ｋ）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。一元配置分散分析によるＣＤ１２３^{S59}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件の統計的比較。
【図４６Ｌ】ＣＤ１２３^{S59}またはＡＡＶＳ１　ＢＥ　ＨＳＰＣを移植したマウスにお

けるＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔによる樹状細胞（ＤＣ）サブセットの喪失を示す代表的なフローサイトメトリープロットである。左：従来のＤＣ（ｃＤＣ、ＣＤ３３／６６ｂ＋１４－１１ｃ＋ＦＬＴ３＋ＳＳＣ^{低}）、プロットはＣＤ３３／６６ｂ＋１４－ＳＳＣ^{低}　細胞上でゲート化される。右：血漿細胞様ＤＣ（ｐＤＣ、ＣＤ３３／６６ｂ＋１４－１１ｃ－ＦＬＴ３＋ＣＤ１２３^{高}ＳＳＣ^{低}）、プロットはＣＤ３３／６６ｂ＋１４－１１ｃ－ＳＳＣ^{低}　細胞上でゲート化される。

【図４６Ｍ】それぞれ、ｈＣＤ４５＋３－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－細胞内のｃＤＣ及びｐＤＣのパーセンテージを示す棒ブロットである。

【図４６Ｎ】それぞれ、ｈＣＤ４５＋３－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－細胞内のｃＤＣ及びｐＤＣのパーセンテージを示す棒ブロットである。

【図４６Ｏ】ｈＣＤ４５＋３－ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ－細胞内の系統－ＣＤ３４＋前駆細胞のパーセンテージを示す。平均±ＳＤ。一元配置分散分析によるＣＤ１２３^{Ｓ５９}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件の統計的比較。

【図４６Ｐ】ＨＳＣから分化した白血球までの、ＢＭにおける骨髄（Ｐ）及びリンパ球（Ｑ）系統サブセットの絶対数を示す。未処理マウスを一緒にプールし（灰色の棒）、一方、ＣＳＬ３６２処理ＣＤ１２３^{Ｓ５９}及びＡＡＶＳ１　ＢＥマウスを、それぞれ桃色及び青色で報告する。ＣＡＲ処理群の絶対数の倍率変化（ＣＤ１２３^{Ｓ５９}／ＡＡＶＳ１）を、各集団の棒プロットの上に報告する。平均±ＳＤ。多重比較を伴う一元配置分散分析。４Ｇ８　ＣＡＲで処理したＣＤ１２３^{Ｓ５９}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件間の比較のＦＤＲ調整ｐ値を報告する（ｐ＜０．０５は太字）。

【図４６Ｑ】ＨＳＣから分化した白血球までの、ＢＭにおける骨髄（Ｐ）及びリンパ球（Ｑ）系統サブセットの絶対数を示す。未処理マウスを一緒にプールし（灰色の棒）、一方、ＣＳＬ３６２処理ＣＤ１２３^{Ｓ５９}及びＡＡＶＳ１　ＢＥマウスを、それぞれ桃色及び青色で報告する。ＣＡＲ処理群の絶対数の倍率変化（ＣＤ１２３^{Ｓ５９}／ＡＡＶＳ１）を、各集団の棒プロットの上に報告する。平均±ＳＤ。多重比較を伴う一元配置分散分析。４Ｇ８　ＣＡＲで処理したＣＤ１２３^{Ｓ５９}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件間の比較のＦＤＲ調整ｐ値を報告する（ｐ＜０．０５は太字）。

【図４７Ａ】エンドポイントでの骨髄系（左）及びリンパ系（右）ＢＭサブセット上のＣＤ１２３発現（ＭＦＩ）を示す。平均±ＳＤ。複数の対応のないｔ検定による統計学的差異を報告する。

【図４７Ｂ】４Ｇ８　ＣＡＲ　Ｔ細胞が、インビボでＰＤＸ－１を枯渇させるが、ＰＤＸ－２を根絶させないことを示す。ＮＳＢＧＷ雌マウスにＡＭＬ　ＰＤＸ細胞を異種移植し、１０日後、４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処理した。実験評価項目は、ＣＡＲ－Ｔ投与の１４日後であった。左から右へ、骨髄（ＢＭ）における総ＣＤ４５＋細胞内のＡＭＬ　ＰＤＸ細胞の％、脾臓（ＳＰ）における総ＣＤ４５＋細胞内のＡＭＬ　ＰＤＸ細胞の％、ＢＭＴ細胞の絶対数、ＦＬＴ３を示す棒プロット。ＢＭの生存ＡＭＬ細胞上のＭＦＩ及びＳＰの生存ＡＭＬ細胞上のＦＬＴ３　ＭＦＩ。平均±ＳＤ。一元配置分散分析による比較。

【図４７Ｃ】４Ｇ８　ＣＡＲ　Ｔ細胞がインビボでＰＤＸ－１を枯渇させるが、ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}　及びＦＬＴ３^{Ｎ３９９}ＨＳＰＣを事前に生着させたマウスではＰＤＸ－２を根絶させないことを示す。ＮＢＳＧＷマウスに編集されたＨＳＰＣを異種移植し、１１週間後にＰＤＸ－１またはＰＤＸ－２細胞を注射した。１０日後、マウスを２．５Ｍの４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処置し、２週間後に結果を評価した。総ＢＭ　ｈＣＤ４５＋細胞内のＡＭＬ細胞の割合（％）を棒プロットで報告する。平均±ＳＤ。一元配置分散分析による比較。

【図４７Ｄ】ＣＡＲ　Ｔ細胞の組み合わせが、インビボでＰＤＸ－２に対して改善された有効性を有することを示す。ＮＢＳＧＷマウスに０．７５ＭのＰＤＸ－２細胞を異種移植し、１０日後、２．５Ｍの４Ｇ８　ＣＡＲまたは４Ｇ８＋ＣＳＬ３６２、４Ｇ８＋Ｆａｂ７９ＤまたはＣＳＬ３６２＋Ｆａｂ７９Ｄ　ＣＡＲ　Ｔ細胞の組み合わせ（各２．５Ｍ）で処理した。結果は２週間後に評価した。棒プロットは、総ＢＭ　ｈＣＤ４５＋細胞内のＡＭＬ細胞の割合（％）を示す。平均±ＳＤ。一元配置分散分析による未処理条件に対す

る多重比較。
【図４７Ｅ】９週目にＡＡＶＳ１^{ＢＥ}及び二重編集ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}／ＣＤ１２３^{Ｓ５９}ＨＳＰＣを異種移植したＮＢＳＧＷマウスの末梢血系統組成を示す（図４９Ｄからの実験）。対応のないｔ検定による統計的比較。平均±ＳＤ。
【図４８Ａ－１】編集ＨＳＰＣ及び／またはＡＭＬ　ＰＤＸを異種移植したマウスの骨髄分析のための代表的なフローサイトメトリーゲーティング戦略である（図４６からの実験）。細胞は、シングル、ライブ、及び物理パラメータゲーティングで事前にゲーティングされている。集団：１．ヒトＣＤ４５＋；２．Ｔ細胞（ＣＡＲ）；３．ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ＋（ＡＭＬ　ＰＤＸ）；４．ＣＡＲまたはＡＭＬなしのヒトＣＤ４５＋；５．総ＣＤ１９＋；６．総骨髄細胞（ＣＤ３３／６６ｂ＋）；７．顆粒球＋マスト細胞；８．単球；９．マスト細胞；１０．総顆粒球；１１．成熟顆粒球（ＣＤ１０＋／１１ｃ＋）；１２．未熟顆粒球（ＣＤ１０－／１１ｃ－）；１３．古典的樹状細胞，ｃＤＣ；１４．プロＢ細胞；１５．プレＢ細胞；１６．成熟Ｂ細胞；１７．ナチュラルキラー細胞，ＮＫ；１８．プロリンパ球；１９．骨髄芽細胞；２０．ｌｉｎ－ＣＤ３４＋（ＣＤ３３／６６＋　ｌｉｎ－ＣＤ３４＋及びＣＤ３３／６６－ｌｉｎ－ＣＤ３４＋は下流のゲーティング用にプールされる）；２１．Ｌｉｎ－ＣＤ３４＋３８＋；２２．Ｌｉｎ－ＣＤ３４＋３８－；２３．プレＢ／ＮＫ；２４．顆粒球－単球，ＧＭＰ；２５．共通骨髄系前駆細胞，ＣＭＰ；２６．巨赤血球系前駆細胞，ＭＥＰ；２７．造血幹細胞，ＨＳＣ；２８．多能性前駆細胞，ＭＰＰ；２９．リンパ系プライミング多能性前駆細胞，ＬＭＰＰ；３０．ビーズゲーティング；３１．マウスＣＤ４５＋；３２．形質細胞様ＤＣ；３３．多能性リンパ系前駆細胞，ＭＬＰ。ＣｏｕｎｔＢｅａｄｓは最初に、ＦＳＣ－Ａ^{低}ＰＩ^{高}としてシングレットでゲート化され、次に２つの追加の蛍光パラメータ（左下隅のプロット）でゲート化される。
【図４８Ａ－２】上記のとおり。
【図４８Ａ－３】上記のとおり。
【図４８Ａ－４】上記のとおり。
【図４８Ｂ－１】骨髄及び脾臓上のＴ細胞パネルの代表的なフローサイトメトリーゲーティング戦略である。セルは、シングル、ライブ、及び物理パラメータゲートで事前にゲーティングされている。ヒトＣＤ４５＋細胞は、ＣＤ３＋（Ｔ細胞）とＣＤ３－とに分離され、その中で残留ＡＭＬはｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ＋としてゲート化される。ＣＡＲ＋細胞は、ＥＧＦＲ染色によって同定される。Ｔ細胞表現型は、ゲーティングＣＤ８＋及びＣＤ４＋細胞でＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ６２Ｌによって評価される。
【図４８Ｂ－２】上記のとおり。
【図４９Ａ】バルク細胞またはＦＡＣＳ選別ＣＤ９０＋原始前駆細胞に対して測定した、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}単独またはＫＩＴ^{Ｈ３７８Ｒ}と組み合わせたＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ塩基編集の効率を示す。比較のために、図４１ＣからのＫＩＴ^{Ｈ３７８Ｒ}単一編集を報告する。平均±ＳＤ。
【図４９Ｂ】多重エピトープ編集後の４Ｇ８及び７Ｇ３　ｍＡｂによる認識の喪失を示す二重ＦＬＴ３／ＣＤ１２３レポーターＫ５６２細胞の代表的なフローサイトメトリープロットである。
【図４９Ｃ】Ｂの各象限における編集された細胞をＦＡＣＳ選別し、次いで、二重特異性ＦＬＴ３／ＣＤ１２３　ＣＡＲ－Ｔ細胞と共培養したことを示す。生きた標的細胞の割合（左）、Ｔ細胞活性化（ＣＤ６９発現、中央）及び脱顆粒（ＣＤ１０７ａ表面発現、右）の％、Ｔ細胞及びＦＬＴ３上のＣｅｌｌＴｒａｃｅマーキングの中央値蛍光強度（ＭＦＩ）を示すプロット。標的細胞上のＣＤ１２３表面発現（ＭＦＩ）は、異なるＥ：Ｔ比で報告されている。平均±ＳＤ（Ｎ＝４）。二元配置分散分析による統計的比較。
【図４９Ｄ】ＡＭＬ　ＰＤＸ－２を共生着させ、４Ｇ８及びＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔ細胞の１：１プールで処理した二重ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}／ＣＤ１２３^{Ｓ５９}エピトープ編集またはＡＡＶＳ１　ＢＥ　ＨＳＰＣの異種移植及び分析の概略図である。
【図４９Ｅ】４Ｇ８／ＣＳＬ３６２　ＣＡＲで処理した、ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ、ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ　＋　ＡＭＬ　ＰＤＸ－２、またはＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ　＋　ＡＭＬ　Ｐ

ＤＸ－２を生着したマウスからのＢＭ試料の代表的なフローサイトメトリープロットを示す。プロットは、総ヒトＣＤ４５＋に対して事前にゲーティングされている。ＣＡＲ　Ｔ細胞は、ＣＤ３染色によって同定され、ＡＭＬ　ＰＤＸ細胞は、ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ＋である。

【図４９Ｆ】ｈＣＤ４５＋ＣＤ３－　ＢＭ細胞内のＡＭＬ　ＰＤＸ細胞の割合（％）を示す棒プロットである。平均±ＳＤ。一元配置分散分析による統計的比較。

【図４９Ｇ】Ｄからのマウスのエンドポイントでの総血液細胞（９、１０週）ならびに選別されたＣＤ３３＋及びＣＤ１９＋　ＢＭ細胞に対して測定されたＦＬＴ３（左）及びＣＤ１２３（右）の塩基編集を示す。平均±ＳＤ。複数の対応のないｔ検定による統計的比較。

【図４９Ｈ】ＨＳＣから分化した白血球までの、ＢＭにおける骨髄系（左）及びリンパ系（右）系統のサブセットの絶対数を示す。未処理マウスをプールし（灰色の棒）、ＣＡＲ処理したＦＬＴ３^{Ｎ３９９}＋ＣＤ１２３^{Ｓ５９}マウスを桃色で報告し、ＣＡＲ処理したＡＡＶＳ１^{ＢＥ}マウスを青色で報告する。ＣＡＲ処理群における絶対数の倍率変化（ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}＋ＣＤ１２３^{Ｓ５９}／ＡＡＶＳ１）を、各集団の棒プロットの上で報告する。平均±ＳＤ。多重比較を伴う一元配置分散分析。４Ｇ８　ＣＡＲで処理したＦＬＴ３^{Ｎ３９９}／ＣＤ１２３^{Ｓ５９}対ＡＡＶＳ１　ＢＥ条件間の比較のＦＤＲ調整ｐ値を報告する（ｐ＜０．０５は太字）。

【発明を実施するための形態】

【００２８】

標的がん治療に好適なタンパク質を特定することは非常に困難である。多くの潜在的な標的タンパク質は、がん細胞の細胞表面と、正常な非がん細胞の細胞表面との両方に存在し、これらは、対象の発生及び／または生存に必要であるか、または決定的に関与し得る。標的タンパク質の多くは、かかる必須細胞の機能性に寄与している。したがって、これらのタンパク質を標的とする治療は、対象において、重大な毒性及び／または他の副作用などの有害な効果をもたらす可能性がある。さらに、ＣＡＲ－Ｔ療法に対する耐性は、がん細胞上のがん抗原のスイッチが原因でＣＡＲ－Ｔ療法を回避することに起因する急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）などの造血器悪性腫瘍の治療における課題のままである。

【００２９】

したがって、本開示は、少なくとも上記の問題に対処することを目的とした方法、細胞、組成物、及びキットを提供する。本明細書に記載の方法、細胞、組成物、及びキットは、血液悪性腫瘍の安全かつ有効な治療を提供し、がん細胞上だけでなく、その発生に不可欠な細胞上にも存在する１つ以上の細胞表面タンパク質の標的化を可能にし、及び／または対象の生存。いくつかの事例では、本明細書に記載されるのは、細胞表面タンパク質、例えば、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及び／またはＫＩＴをコードする１つ以上の遺伝子における遺伝子編集を有する造血幹細胞（ＨＳＰＣ）などの遺伝子操作された造血細胞、例えば、特異的ガイドＲＮＡを使用したＣＲＩＳＰＲアプローチによってそれを産生する方法、単独で、または野生型細胞表面抗原を標的とするが操作された造血細胞における編集された遺伝子によってコードされるものは標的化できない１つ以上の細胞傷害性薬剤（例えば、ＣＡＲ－Ｔ細胞）と組み合わせて、操作された造血細胞を使用して造血器悪性腫瘍を治療する方法、及び操作された造血細胞を含むキットである。

【００３０】

Ｉ．遺伝子操作された造血細胞

いくつかの実施形態では、遺伝子操作された造血細胞は、編集されたＦＬＴ３遺伝子、ＣＤ１２３遺伝子、またはＫＩＴ遺伝子を有する。一部では、これらの遺伝子の１つ以上が変異している。いくつかの事例では、変異したＦＬＴ３遺伝子、ＣＤ１２３遺伝子、またはキット遺伝子は、ＦＬＴ３遺伝子、ＣＤ１２３遺伝子、またはキット遺伝子の生物活性を（全体的または部分的に）保持するように、１つ以上の非必須エピトープにおいて変異または欠失を含む。

【００３１】

ｉ．造血幹細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の造血細胞は、造血幹細胞である。造血幹細胞／前駆細胞（ＨＳＰＣ）は、骨髄細胞及びリンパ球の両方の前駆細胞を生じさせることができ、これらの前駆細胞は、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）及びリンパ球をさらに生じさせる。細胞（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）と、をそれぞれ含む。ＨＳＰＣは、細胞表面マーカーＣＤ３４（例えば、ＣＤ３４＋）の発現によって特徴付けられ、これはＨＳＰＣの同定及び／または単離に使用することができる。

【００３２】

いくつかの実施形態では、ＨＳＰＣは、哺乳動物対象などの対象から得られる。いくつかの実施形態では、哺乳動物対象は、非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）、ウシ、ブタ、ウマ、または家畜である。いくつかの実施形態では、ＨＳＰＣは、造血器悪性腫瘍に罹患しているヒト患者などのヒト患者から得られる。いくつかの実施形態では、ＨＳＰＣは、健康なドナーから得られる。いくつかの実施形態では、ＨＳＰＣは、遺伝子操作されたＨＳＰＣ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ＨＳＰＣは、自家細胞と呼ばれ、一方、細胞が投与される対象ではない対象から得られるＨＳＰＣは、同種他家細胞と呼ばれる（方法：拒絶反応の発生率を低減させることは、標準的であり、当該技術分野で周知である）。

【００３３】

ＨＳＰＣは、当該技術分野で既知の従来の手段を使用して、任意の好適な供給源から得られ得る。いくつかの実施形態では、ＨＳＰＣは、対象（またはドナー）由来の試料から、例えば、骨髄試料または血液試料から得られる。代替的に、または加えて、ＨＳＰＣは、臍帯（すなわち、臍帯血細胞）から得ることができる。いくつかの実施形態では、ＨＳＰＣは、骨髄、臍帯血細胞、または末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）に由来する。一般に、骨髄細胞は、対象（またはドナー）の腸骨隆起、大腿骨、脛骨、脊椎、肋骨、または他の髄腔から得ることができる。骨髄は、患者から採取され、当該技術分野で既知の様々な分離及び洗浄手順を通して単離することができる。骨髄細胞を単離するための例示的な手順は、以下のステップ：ａ）骨髄試料を抽出することと、ｂ）骨髄懸濁液を３つの画分に遠心分離し、中間画分またはバフィーコートを回収することと、ｃ）ステップ（ｂ）からのバフィーコート画分を、分離液（一般的にＦｉｃｏｌｌ（商標））中でもう一度遠心分離し、骨髄細胞を含有する中間画分を回収することと、ｄ）再注入可能な骨髄細胞を回収するために、ステップ（ｃ）で回収した画分を洗浄することと、を含む。

【００３４】

ＨＳＰＣは通常、骨髄に存在するが、末梢血からＨＳＰＣを採取するために動員剤を投与することによって循環血液中に動員することができる。いくつかの実施形態では、ＨＳＰＣが得られる対象（またはドナー）は、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）などの動員剤を投与される。動員剤を使用した動員後に収集されたＨＳＰＣの数は、典型的には、動員剤を使用せずに得られた細胞の数よりも多い。

【００３５】

いくつかの実施形態では、試料は、対象（またはドナー）から得られ、その後、所望の細胞型（例えば、ＣＤ３４＋、ＣＤ３４＋ＣＤ３８－、ＣＤ１３３＋、ＣＤ９０＋、ＣＤ４９ｆ＋）について濃縮される。例えば、ＰＢＭＣ及び／またはＣＤ３４＋造血細胞は、本明細書に記載されるように血液から単離され得る。細胞はまた、例えば、単離及び／または所望の細胞型の細胞表面上のエピトープに結合する抗体による活性化によって、他の細胞から単離することができる。使用され得る別の方法には、受容体の結合によって細胞を活性化することなく特定の細胞型を選択的に濃縮する細胞表面マーカーに対する抗体を使用する負の選択が含まれる。

【００３６】

ｉｉ．変異細胞表面抗原

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の造血幹細胞（ＨＳＰＣ）は、１つ以上の目

的の細胞表面タンパク質（例えば、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、ＫＩＴ）をコードする変異形態（変異体またはバリアント、本明細書では互換的に使用される）の編集された遺伝子を含有し得、変異形態は、本明細書に記載のる細胞傷害性薬剤（例えば、抗ＦＬＴ３抗体、抗ＣＤ１２３抗体、抗ＫＩＴ抗体）への結合が低減しているか、または結合しない。変異体は、細胞傷害性薬剤への結合が、天然または野生型細胞表面タンパク質の対応物と比較して低減または消失するように、細胞傷害性薬剤が結合するエピトープの１つ以上の変異を保有し得る。かかる変異体は、野生型対応物と実質的に同様の生物活性を維持するために好ましい。

【００３７】

本明細書で使用される場合、「低減された結合」という用語は、少なくとも２５％低減される結合を指す。結合レベルは、野生型（すなわち、非操作、非変異）タンパク質と比較した場合、造血幹細胞への細胞傷害性薬剤の結合の量、または細胞表面タンパク質への細胞傷害性薬剤の結合の量を指し得る。いくつかの実施形態では、結合は、少なくとも２５％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％低減される。いくつかの実施形態では、結合は、従来のアッセイにおいて検出可能な結合が実質的にないように低減される。本明細書で使用される場合、「結合なし」は、実質的に結合がないこと、例えば、検出可能な結合がないこと、または従来の結合アッセイにおいて決定されるベースライン結合のみを指す。

【００３８】

いくつかの事例では、バリアントは、目的のエピトープ内で１つ以上のアミノ酸残基置換（例えば、２、３、４、５つ、またはそれ以上）を含有し、その結果、細胞傷害性薬剤は、変異したエピトープに結合しないか、またはその変異したエピトープに対する結合が低減している。かかる変異体は、細胞傷害性薬剤に対する結合親和性が実質的に低減している（例えば、その野生型対応物よりも少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％低い結合親和性を有する）可能性がある。いくつかの例では、かかるバリアントは、細胞傷害性薬剤に対する結合活性が無効になり得る。他の事例では、変異体は、目的のエピトープを含む領域の欠失を含有する。かかる領域は、エクソンによってコードされ得る。いくつかの実施形態では、領域は、エピトープをコードする目的の細胞表面タンパク質のドメインである。一例では、バリアントは、エピトープのみが削除されている。欠失領域の長さは、３～６０アミノ酸、例えば、５～５０、５～４０、１０～３０、１０～２０などの範囲であり得る。

【００３９】

細胞表面抗原の変異体における変異（複数可）または欠失は、変異（複数可）または欠失（複数可）がタンパク質の生物活性に実質的に影響を及ぼさないように、非必須エピトープ内にある場合もあれば、その周囲にある場合もある。

【００４０】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗体のＣＤＲによって結合される細胞表面抗原などのタンパク質のアミノ酸配列（直鎖状または立体構造的）を指す。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬剤は、細胞表面抗原の１つ以上（例えば、少なくとも２、３、４、５またはそれ以上）のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬剤は、細胞表面抗原の複数のエピトープに結合し、造血細胞は、エピトープの各々が存在せず、及び／または細胞傷害性薬剤による結合に利用できないように操作される。

【００４１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の遺伝子操作されたＨＳＰＣは、細胞表面抗原の１つ以上の編集された遺伝子を有し、その結果、編集された遺伝子は、１つ以上の非必須エピトープに変異を有する変異細胞表面抗原を発現する。「非必須エピトープ」（またはそれを含む断片）とは、細胞表面タンパク質／抗原内のドメインであって、その変異

が細胞表面タンパク質の生物活性に実質的に影響を与える可能性が低い、ドメインを指す。例えば、細胞表面抗原の非必須エピトープの欠失または変異を含む造血細胞、かかる造血細胞は、増殖することができ、及び／または野生型細胞を発現する造血細胞と同様のレベルまで赤血球化分化を経ることができる。表面抗原。

【００４２】

細胞表面抗原における非必須エピトープを特定する方法及び／または検証する方法は、当業者によって既知かつ認識され、やはり本開示の範囲内である。さらに、細胞表面抗原及び造血細胞の機能性を評価する方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、増殖アッセイ、分化アッセイ、コロニー形成、発現分析（例えば、遺伝子及び／またはタンパク質）、タンパク質局在化、細胞内シグナル伝達、機能アッセイ、及びｉｎ　ｖｉｖｏヒト化マウスモデル。

【００４３】

ｉｉｉ．遺伝子操作された造血細胞の調製

１つ以上の細胞表面抗原の編集された遺伝子を有する、ＨＳＰＣなどの遺伝子操作造血細胞のうちのいずれも、常法による方法または本明細書に記載の方法によって調製することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子操作は、ゲノム編集を使用して行われる。本明細書で使用される場合、「ゲノム編集」とは、標的遺伝子の発現を改変するために、生物の任意のタンパク質コードまたは非コードヌクレオチド配列を含む、ゲノムを改変する方法を指す。一般に、ゲノム編集法は、ゲノムの核酸を、例えば標的ヌクレオチド配列において切断することができるエンドヌクレアーゼの使用を含む。いくつかの事例では、ゲノム編集法は、死滅ヌクレアーゼまたはニッカーゼであるヌクレアーゼの使用を含む。ゲノムにおける二本鎖切断の修復は、変異を導入して修復することができ、及び／または外因性核酸を標的部位に挿入することができる。場合によっては、ゲノム編集法は、機能的ドメイン、例えば、塩基エディターの場合は、アデニンまたはシチジンデアミナーゼドメインに融合した触媒的に不活性なまたは部分的に不活性なエンドヌクレアーゼの使用を含む。他の機能的ドメインには、プライムエディター、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ活性化因子またはリプレッサーなどが含まれる。

【００４４】

ゲノム編集方法は、一般に、標的核酸に二本鎖切断を生成するのに関与するエンドヌクレアーゼのタイプに基づいて分類される。これらの方法には、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様エフェクターベースのヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、メガヌクレアーゼ、及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムの使用が含まれる。

【００４５】

本開示の１つの態様では、正常細胞の改変集団によるがん細胞の置き換えは、細胞が細胞傷害性薬剤に結合しないように操作された正常細胞を使用して行われる。かかる修飾には、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを使用した特定の細胞表面タンパク質のエピトープの欠失または変異が含まれ得、ここで、クラスター化して規則的な間隔を空けられた短い回文構造の繰り返し（ＣＲＩＳＰＲ）－Ｃａｓシステムは、操作された、非天然起源のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムである。システム。

【００４６】

ＣＲＩＳＰＲ系は、細菌の適応免疫に不可欠なＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼをコードする。ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）ヌクレアーゼは、様々なゲノム編集のための標的ＤＮＡ配列を切断するように容易にプログラムすることができる。Ｃａｓ９タンパク質と呼ばれるこれらのヌクレアーゼの１つのクラスは、２つの短いＲＮＡ、すなわち、ｃｒＲＮＡ及びトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）と複合体を形成する。最も一般的に使用されているＣａｓ９オルソログであるＳｐＣａｓ９は、標的ＤＮＡ部位の「プロトスペーサー」領域に相補的である２０ヌクレオチド（ｎｔ）を５’末端に有するｃｒＲＮＡを使用する。効率的な切断には、ＳｐＣａｓ９がプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を認識することも必要である。ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは通常、ＳｐＣａｓ９のＤＮＡ切断活性を指示する単一の約１００ｎｔのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）へと組み

合わされる。Ｃｐｆ１と呼ばれるＣａｓタンパク質が同定されており、これも標的ＤＮＡ配列を切断するようにプログラムすることができる。ＳｐＣａｓ９とは異なり、Ｃｐｆ１は単一の４２ｎｔのｃｒＲＮＡのみを必要とし、これは、標的ＤＮＡ配列のプロトスペーサーに相補的である２３ｎｔをその３’末端に有する。

【００４７】

一部の実施形態では、Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、Ｃａｓ９ヌクレアーゼまたはそのバリアントである。Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、標的核酸の二本鎖ＤＮＡを切断して、平滑末端をもたらす。一部の実施形態では、Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１ヌクレアーゼまたはそのバリアントである。Ｃｐｆ１ヌクレアーゼによる切断は、核酸の末端配置をもたらす。

【００４８】

Ｃａｓ９

いくつかの実施形態では、Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、Ｃａｓ９酵素またはそのバリアントである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ（ＳｐＣａｓ９）またはＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ（ＳａＣａｓ９）に由来する。

【００４９】

ＳｐＣａｓ９野生型配列は、以下の通りである（配列番号１）：

【化１－１】

MDKKYSIGLD IGTNSVGWAV ITDEYKVPSK KFKVLGNTDR HSIKKNLIGA
LLFDSGETAE ATRLKRTARR RYTRRKNRIC YLQEIFSNEM AKVDDSFFHR
LEESFLVEED KKHERHPIFG NIVDEVAYHE KYPTIYHLRK KLVDSTDKAD
LRLIYLALAH MIKFRGHFLI EGDLNPDNSD VDKLFIQLVQ TYNQLFEENP
INASGVDAKA ILSARLSKSR RLENLIAQLP GEKKNGLFGN LIALSLGLTP
NFKSNFDLAE DAKLQLSKDT YDDDLDNLLA QIGDQYADLF LAAKNLSDAI
LLSDILRVNT EITKAPLSAS MIKRYDEHHQ DLTLLKALVR QQLPEKYKEI
FFDQSKNGYA GYIDGGASQE EFYKFIKPIL EKMDGTEELL VKLNREDLLR
KQRTFDNGSI PHQIHLGELH AILRRQEDFY PFLKDNREKI EKILTFRIPY
YVGPLARGNS RFAWMTRKSE ETITPWNFEE VVDKGASAQS FIERMTNFDK
NLPNEKVLPK HSLLYEYFTV YNELTKVKYV TEGMRKPAFL SGEQKKAIVD
LLFKTNRKVT VKQLKEDYFK KIECFDSVEI SGVEDRFNAS LGTYHDLLKI
IKDKDFLDNE ENEDILEDIV LTLTLFEDRE MIEERLKTYA HLFDDKVMKQ

【化１－２】

LKRRRYTGWG RLSRKLINGI RDKQSGKTIL DFLKSDGFAN RNFMQLIHDD
SLTFKEDIQK AQVSGQGDSL HEHIANLAGS PAIKKGILQT VKVVDELVKV
MGRHKPENIV IEMARENQTT QKGQKNSRER MKRIEEGIKE LGSQILKEHP
VENTQLQNEK LYLYYLQNGR DMYVDQELDI NRLSDYDVDH IVPQSFLKDD
SIDNKVLTRS DKNRGKSDNV PSEEVVKKMK NYWRQLLNAK LITQRKFDNL
TKAERGGLSE LDKAGFIKRQ LVETRQITKH VAQILDSRMN TKYDENDKLI
REVKVITLKS KLVSDFRKDF QFYKVREINN YHHAHDAYLN AVVGTALIKK
YPKLESEFVY GDYKVYDVRK MIAKSEQEIG KATAKYFFYS NIMNFFKTEI
TLANGEIRKR PLIETNGETG EIVWDKGRDF ATVRKVLSMP QVNIVKKTEV
QTGGFSKESI LPKRNSDKLI ARKKDWDPKK YGGFDSPTVA YSVLVVAKVE
KGKSKKLKSV KELLGITIME RSSFEKNPID FLEAKGYKEV KKDLIIKLPK
YSLFELENGR KRMLASAGEL QKGNELALPS KYVNFLYLAS HYEKLKGSPE
DNEQKQLFVE QHKHYLDEII EQISEFSKRV ILADANLDKV LSAYNKHRDK
PIREQAENII HLFTLTNLGA PAAFKYFDTT IDRKRYTSTK EVLDATLIHQ
SITGLYETRI DLSQLGGD

【００５０】

ＳａＣａｓ９野生型配列は、以下の通りである（配列番号２）：

【化２－１】

MKRNYILGLD IGITSVGYGI IDYETRDVID AGVRLFKEAN VENNEGRRSK
RGARRLKRRR RHRIQRVKKL LFDYNLLTDH SELSGINPYE ARVKGLSQKL
SEEEFSAALL HLAKRRGVHN VNEVEEDTGN ELSTKEQISR NSKALEEKYV
AELQLERLKK DGEVRGSINR FKTSDYVKEA KQLLKVQKAY HQLDQSFIDT
YIDLLETRRT YYEGPGEGSP FGWKDIKEWY EMLMGHCTYF PEELRSVKYA
YNADLYNALN DLNNLVITRD ENEKLEYYEK FQIIENVFKQ KKKPTLKQIA
KEILVNEEDI KGYRVTSTGK PEFTNLKVYH DIKDITARKE IIENAELLDQ
IAKILTIYQS SEDIQEELTN LNSELTQEEI EQISNLKGYT GTHNLSLKAI
NLILDELWHT NDNQIAIFNR LKLVPKKVDL SQQKEIPTTL VDDFILSPVV
KRSFIQSIKV INAIIKKYGL PNDIIIELAR EKNSKDAQKM INEMQKRNRQ
TNERIEEIIR TTGKENAKYL IEKIKLHDMQ EGKCLYSLEA IPLEDLLNNP
FNYEVDHIIP RSVSFDNSFN NKVLVKQEEN SKKGNRTPFQ YLSSSDSKIS

【化２－２】

YETFKKHILN LAKGKGRISK TKKEYLLEER DINRFSVQKD FINRNLVDTR
YATRGLMNLL RSYFRVNNLD VKVKSINGGF TSFLRRKWKF KKERNKGYKH
HAEDALIIAN ADFIFKEWKK LDKAKKVMEN QMFEEKQAES MPEIETEQEY
KEIFITPHQI KHIKDFKDYK YSHRVDKKPN RELINDTLYS TRKDDKGNTL
IVNNLNGLYD KDNDKLKKLI NKSPEKLLMY HHDPQTYQKL KLIMEQYGDE
KNPLYKYYEE TGNYLTKYSK KDNGPVIKKI KYYGNKLNAH LDITDDYPNS
RNKVVKLSLK PYRFDVYLDN GVYKFVTVKN LDVIKKENYY EVNSKCYEEA
KKLKKISNQA EFIASFYNND LIKINGELYR VIGVNNDLLN RIEVNMIDIT
YREYLENMND KRPPRIIKTI ASKTQSIKKY STDILGNLYE VKSKKHPQII KKG

【００５１】

一般に、標的核酸は、エンドヌクレアーゼと相互作用し、エンドヌクレアーゼ活性を標的核酸に標的化することにさらに関与し得るプロトスペーサーモチーフ隣接（ＰＡＭ）に３’側または５’側で隣接している。一般に、標的核酸に隣接するＰＡＭ配列は、エンドヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼの由来する供給源に依存すると考えられている。例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓに由来するＣａｓ９エンドヌクレアーゼの場合、ＰＡＭ配列はＮＧＧであるが、ＰＡＭ配列ＮＡＧ及びＮＧＡは、より低い効率で認識され得る。Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓに由来するＣａｓ９エンドヌクレアーゼの場合、ＰＡＭ配列は、ＮＮＧＲＲＴ（配列番号３）である。

【００５２】

したがって、いくつかの事例では、エンドヌクレアーゼは、それが１つ以上のＰＡＭ配列を認識することができるように操作／修飾される。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼが操作／修飾なしで認識する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、エンドヌクレアーゼは、酵素のオフターゲット活性を低減するように操作／修飾されている。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼ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認識を変化させるように改変される。例えば、Ｃａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、ＳｐＣａｓ９）は、以下の位置のうちの１つ以上に変異を有する：Ａ６１、Ｌ１１１１、Ｄ１１３５、Ｓ１１３６、Ｇ１２１８、Ｅ１２１９、Ｎ１３１７、Ａ１３２２、Ｒ１３３３、Ｒ１３３５、Ｔ１３３７。例えば、国際特許出願公開第ＷＯ２０１６／１４１２２４号及び同第ＷＯ２０１７／０４０３４８号、米国特許出願公開第２０２１／０２８４９７８Ａ１号を参照されたい（これらは全て、参照により本明細書に援用される）。

【００５３】

一部の実施形態では、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、ヌクレアーゼの野生型バージョンである。例えば、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、上記の配列番号１に示される配列を有するＳｐＣａｓ９エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、ＳｐＣａｓ９エンドヌクレアーゼは、例えば、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも８０％同一、例えば、８５％、９０％、または９５％同一であり、例えば、配列番号１の残基と最大５％、１０％、１５％、または２０％の差異を有し、例えば、保存的変異で置き換えられている。好ましい実施形態では、エンドヌクレアーゼは、親の所望の活性、例えば、ヌクレアーゼ活性（親がニッカーゼまたは死Ｃａｓ９である場合を除く）、及び／またはガイドＲＮＡ及び標的ＤＮＡと相互作用する能力を保持する。他の事例では、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、上記の配列番号２に示される配列を有するＳａＣａｓ９エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、ＳａＣａｓ９エンドヌクレアーゼは、例えば、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも８０％同一、例えば、８５％、９０％、または９５％同

ーであり、例えば、配列番号２の残基と最大５％、１０％、１５％、または２０％の差異を有し、例えば、保存的変異で置き換えられている。好ましい実施形態では、エンドヌクレアーゼは、親の所望の活性、例えば、ヌクレアーゼ活性（親がニッカーゼまたは死Ｃａｓ９である場合を除く）、及び／またはガイドＲＮＡ及び標的ＤＮＡと相互作用する能力を保持する。

【００５４】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、触媒的に不活性なＣａｓ９である。例えば、ｄＣａｓ９は触媒活性残基（Ｄ１０、Ｅ７６２、Ｄ８３９、Ｈ９８３、もしくはＤ９８６、及び／またはＨ８４０もしくはＮ８６３）に変異を含有し、ヌクレアーゼ活性を有さない。例えば、変異は、以下の通りである：（ｉ）Ｄ１０ＡもしくはＤ１０Ｎ、及び／または（ｉｉ）Ｈ８４０Ａ、Ｈ８４０Ｎ、もしくはＨ８４０Ｙ。

【００５５】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、Ｋ９１８に変異を含む。例えば、変異はＫ９１８Ｎである。

【００５６】

いくつかの実施形態では、タンパク質の活性を変化させるために、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに改変する。一部の実施形態では、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼの１つ以上の触媒残基を不活性化するように修飾されている。一部の実施形態では、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、「ニッカーゼ」または「Ｃａｓ９ｎ」と称される、エンドヌクレアーゼの触媒残基のうちの１つを不活性化するように修飾されている。Ｃａｓ９ニッカーゼエンドヌクレアーゼは、標的核酸の１つのＤＮＡ鎖を切断する。

【００５７】

いくつかの事例では、エンドヌクレアーゼは、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９ニッカーゼであり、以下の変異を有する：Ｄ１０Ａ、Ｌ１１１１Ｒ、Ｄ１１３５Ｖ、Ｇ１２１８Ｒ、Ｅ１２１９Ｆ、Ａ１３２２Ｒ、Ｒ１３３５Ｖ、Ｔ１３３７Ｒ　（野生型ＳｐＣａｓ９に対して）。いくつかの事例では、エンドヌクレアーゼは、ＳｐＲＹ－Ｃａｓ９ニッカーゼであり、以下の変異を有する：Ｄ１０Ａ、Ａ６１Ｒ、Ｌ１１１１Ｒ、Ｄ１１３５Ｌ、Ｓ１１３６Ｗ、Ｇ１２１８Ｋ、Ｅ１２１９Ｑ、Ｎ１３１７Ｒ、Ａ１３２２Ｒ、Ｒ１３３３Ｐ、Ｒ１３３５Ｑ、Ｔ１３３７Ｒ　（野生型ＳｐＣａｓ９に対して）。

【００５８】

Ｃｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）

一部の実施形態では、Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、Ｃｐｆ１ヌクレアーゼまたはそのバリアントである。Ｃｐｆ１エンドヌクレアーゼは、一般に、標的核酸の５’末端に位置するＰＡＭ配列を認識する。Ｃｐｆ１ヌクレアーゼの場合、ＰＡＭ配列はＴＴＴＮである。当業者には理解されようが、ＣａｓエンドヌクレアーゼＣｐｆ１ヌクレアーゼは、Ｃａｓ１２ａとも呼ばれ得る。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌（ＬｂＣｐｆ１）、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．（ＡｓＣｐｆ１）、またはＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ（ＦｎＣｐｆ１）に由来するＣｐｆ１ヌクレアーゼを発現する。各々の野生型配列を以下に示す。

【００５９】

Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質Ｃｐｆ１［Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌ＮＤ２００６］、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＷＰ＿０５１６６６１２８．１（配列番号４）

【化３－１】

MLKNVGIDRL DVEKGRKNMS KLEKFTNCYS LSKTLRFKAI PVGKTQENID
NKRLLVEDEK RAEDYKGVKK LLDRYYLSFI NDVLHSIKLK NLNNYISLFR
KKTRTEKENK ELENLEINLR KEIAKAFKGN EGYKSLFKKD IIETILPEFL
DDKDEIALVN SFNGFTTAFT GFFDNRENMF SEEAKSTSIA FRCINENLTR
YISNMDIFEK VDAIFDKHEV QEIKEKILNS DYDVEDFFEG EFFNFVLTQE
GIDVYNAIIG GFVTESGEKI KGLNEYINLY NQKTKQKLPK FKPLYKQVLS

【化３－２】

DRESLSFYGE GYTSDEEVLE VFRNTLNKNS EIFSSIKKLE KLFKNFDEYS
SAGIFVKNGP AISTISKDIF GEWNVIRDKW NAEYDDIHLK KKAVVTEKYE
DDRRKSFKKI GSFSLEQLQE YADADLSVVE KLKEIIIQKV DEIYKVYGSS
EKLFDADFVL EKSLKKNDAV VAIMKDLLDS VKSFENYIKA FFGEGKETNR
DESFYGDFVL AYDILLKVDH IYDAIRNYVT QKPYSKDKFK LYFQNPQFMG
GWDKDKETDY RATILRYGSK YYLAIMDKKY AKCLQKIDKD DVNGNYEKIN
YKLLPGPNKM LPKVFFSKKW MAYYNPSEDI QKIYKNGTFK KGDMFNLNDC
HKLIDFFKDS ISRYPKWSNA YDFNFSETEK YKDIAGFYRE VEEQGYKVSF
ESASKKEVDK LVEEGKLYMF QIYNKDFSDK SHGTPNLHTM YFKLLFDENN
HGQIRLSGGA ELFMRRASLK KEELVVHPAN SPIANKNPDN PKKTTTLSYD
VYKDKRFSED QYELHIPIAI NKCPKNIFKI NTEVRVLLKH DDNPYVIGID
RGERNLLYIV VVDGKGNIVE QYSLNEIINN FNGIRIKTDY HSLLDKKEKE
RFEARQNWTS IENIKELKAG YISQVVHKIC ELVEKYDAVI ALEDLNSGFK
NSRVKVEKQV YQKFEKMLID KLNYMVDKKS NPCATGGALK GYQITNKFES
FKSMSTQNGF IFYIPAWLTS KIDPSTGFVN LLKTKYTSIA DSKKFISSFD
RIMYVPEEDL FEFALDYKNF SRTDADYIKK WKLYSYGNRI RIFRNPKKNN
VFDWEEVCLT SAYKELFNKY GINYQQGDIR ALLCEQSDKA FYSSFMALMS
LMLQMRNSIT GRTDVDFLIS PVKNSDGIFY DSRNYEAQEN AILPKNADAN
GAYNIARKVL WAIGQFKKAE DEKLDKVKIA ISNKEWLEYA QTSVKH

【００６０】

Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質Ｃｐｆ１［Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６］、ＮＣＢＩ参照配列：ＷＰ＿０２１７３６７２２．１（配列番号５）

【化４－１】

MTQFEGFTNL YQVSKTLRFE LIPQGKTLKH IQEQGFIEED KARNDHYKEL
KPIIDRIYKT YADQCLQLVQ LDWENLSAAI DSYRKEKTEE TRNALIEEQA
TYRNAIHDYF IGRTDNLTDA INKRHAEIYK GLFKAELFNG KVLKQLGTVT
TTEHENALLR SFDKFTTYFS GFYENRKNVF SAEDISTAIP HRIVQDNFPK
FKENCHIFTR LITAVPSLRE HFENVKKAIG IFVSTSIEEV FSFPFYNQLL
TQTQIDLYNQ LLGGISREAG TEKIKGLNEV LNLAIQKNDE TAHIIASLPH
RFIPLFKQIL SDRNTLSFIL EEFKSDEEVI QSFCKYKTLL RNENVLETAE

【化４－２】

ALFNELNSID LTHIFISHKK LETISSALCD HWDTLRNALY ERRISELTGK
ITKSAKEKVQ RSLKHEDINL QEIISAAGKE LSEAFKQKTS EILSHAHAAL
DQPLPTTLKK QEEKEILKSQ LDSLLGLYHL LDWFAVDESN EVDPEFSARL
TGIKLEMEPS LSFYNKARNY ATKKPYSVEK FKLNFQMPTL ASGWDVNKEK
NNGAILFVKN GLYYLGIMPK QKGRYKALSF EPTEKTSEGF DKMYYDYFPD
AAKMIPKCST QLKAVTAHFQ THTTPILLSN NFIEPLEITK EIYDLNNPEK
EPKKFQTAYA KKTGDQKGYR EALCKWIDFT RDFLSKYTKT TSIDLSSLRP
SSQYKDLGEY YAELNPLLYH ISFQRIAEKE IMDAVETGKL YLFQIYNKDF
AKGHHGKPNL HTLYWTGLFS PENLAKTSIK LNGQAELFYR PKSRMKRMAH
RLGEKMLNKK LKDQKTPIPD TLYQELYDYV NHRLSHDLSD EARALLPNVI
TKEVSHEIIK DRRFTSDKFF FHVPITLNYQ AANSPSKFNQ RVNAYLKEHP
ETPIIGIDRG ERNLIYITVI DSTGKILEQR SLNTIQQFDY QKKLDNREKE
RVAARQAWSV VGTIKDLKQG YLSQVIHEIV DLMIHYQAVV VLENLNFGFK
SKRTGIAEKA VYQQFEKMLI DKLNCLVLKD YPAEKVGGVL NPYQLTDQFT
SFAKMGTQSG FLFYVPAPYT SKIDPLTGFV DPFVWKTIKN HESRKHFLEG
FDFLHYDVKT GDFILHFKMN RNLSFQRGLP GFMPAWDIVF EKNETQFDAK
GTPFIAGKRI VPVIENHRFT GRYRDLYPAN ELIALLEEKG IVFRDGSNIL
PKLLENDDSH AIDTMVALIR SVLQMRNSNA ATGEDYINSP VRDLNGVCFD
SRFQNPEWPM DADANGAYHI ALKGQLLLNH LKESKDLKLQ NGISNQDWLA
YIQELRN

【００６１】

Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質Ｃｐｆ１［Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ］、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＷＰ＿００３０４０２８９．１（配列番号６）

【化５－１】

MSIYQEFVNK YSLSKTLRFE LIPQGKTLEN IKARGLILDD EKRAKDYKKA
KQIIDKYHQF FIEEILSSVC ISEDLLQNYS DVYFKLKKSD DDNLQKDFKS
AKDTIKKQIS EYIKDSEKFK NLFNQNLIDA KKGQESDLIL WLKQSKDNGI
ELFKANSDIT DIDEALEIIK SFKGWTTYFK GFHENRKNVY SSNDIPTSII
YRIVDDNLPK FLENKAKYES LKDKAPEAIN YEQIKKDLAE ELTFDIDYKT
SEVNQRVFSL DEVFEIANFN NYLNQSGITK FNTIIGGKFV NGENTKRKGI

【化５－２】

NEYINLYSQQ INDKTLKKYK MSVLFKQILS DTESKSFVID KLEDDSDVVT
TMQSFYEQIA AFKTVEEKSI KETLSLLFDD LKAQKLDLSK IYFKNDKSLT
DLSQQVFDDY SVIGTAVLEY ITQQIAPKNL DNPSKKEQEL IAKKTEKAKY
LSLETIKLAL EEFNKHRDID KQCRFEEILA NFAAIPMIFD EIAQNKDNLA
QISIKYQNQG KKDLLQASAE DDVKAIKDLL DQTNNLLHKL KIFHISQSED
KANILDKDEH FYLVFEECYF ELANIVPLYN KIRNYITQKP YSDEKFKLNF
ENSTLANGWD KNKEPDNTAI LFIKDDKYYL GVMNKKNNKI FDDKAIKENK
GEGYKKIVYK LLPGANKMLP KVFFSAKSIK FYNPSEDILR IRNHSTHTKN
GSPQKGYEKF EFNIEDCRKF IDFYKQSISK HPEWKDFGFR FSDTQRYNSI
DEFYREVENQ GYKLTFENIS ESYIDSVVNQ GKLYLFQIYN KDFSAYSKGR
PNLHTLYWKA LFDERNLQDV VYKLNGEAEL FYRKQSIPKK ITHPAKEAIA
NKNKDNPKKE SVFEYDLIKD KRFTEDKFFF HCPITINFKS SGANKFNDEI
NLLLKEKAND VHILSIDRGE RHLAYYTLVD GKGNIIKQDT FNIIGNDRMK
TNYHDKLAAI EKDRDSARKD WKKINNIKEM KEGYLSQVVH EIAKLVIEYN
AIVVFEDLNF GFKRGRFKVE KQVYQKLEKM LIEKLNYLVF KDNEFDKTGG
VLRAYQLTAP FETFKKMGKQ TGIIYYVPAG FTSKICPVTG FVNQLYPKYE
SVSKSQEFFS KFDKICYNLD KGYFEFSFDY KNFGDKAAKG KWTIASFGSR
LINFRNSDKN HNWDTREVYP TKELEKLLKD YSIEYGHGEC IKAAICGESD
KKFFAKLTSV LNTILQMRNS KTGTELDYLI SPVADVNGNF FDSRQAPKNM
PQDADANGAY HIGLKGLMLL GRIKNNQEGK KLNLVIKNEE YFEFVQNRNN

【００６２】

一部の実施形態では、Ｃｐｆ１エンドヌクレアーゼは、ヌクレアーゼの野生型バージョンである。例えば、Ｃｐｆ１エンドヌクレアーゼは、上記の配列番号４、配列番号５、または配列番号６に示される配列を有するＣｐｆ１エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Ｃｐｆ１エンドヌクレアーゼは、例えば、配列番号４、配列番号５、または配列番号６のアミノ酸配列と少なくとも８０％同一、例えば、８５％、９０％、または９５％同一であり、例えば、配列番号４、配列番号５、または配列番号６の残基と最大５％、１０％、１５％、または２０％の差異を有し、例えば、保存的変異で置き換えられている。好ましい実施形態では、エンドヌクレアーゼは、親の所望の活性、例えば、ヌクレアーゼ活性（親がニッカーゼまたは死Ｃａｓ９である場合を除く）、及び／またはガイド

ＲＮＡ及び標的ＤＮＡと相互作用する能力を保持する。
【００６３】
Ｃｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）の触媒的に不活性なバリアントは、ｄＣａｓ１２ａと呼ばれ得る。したがって、いくつかの実施形態では、ＡｓＣｐｆ１の場合、触媒活性破壊型変異は、Ｄ９０８及びＥ９９３、例えば、Ｄ９０８Ａ及びＥ９９３Ａで行われる。ならびにＤ８３２及びＥ９２５、例えば、Ｄ８３２Ａ及びＥ９２５Ａにおける ＬｂＣｐｆ１触媒活性破壊的変異について、ならびにＤ９１７Ａ及びＥ１００６Ａにおける ＦｎＣｐｆ１触媒活性破壊的変異についてである。
【００６４】
機能的ドメイン
代替的に、または加えて、Ｃａｓエンドヌクレアーゼ（すなわち、Ｃａｓ９またはＣａｓ１２ａ）は、別のタンパク質またはその一部、例えば、異種の機能的ドメインと融合され得る。いくつかの実施形態では、異種の機能的ドメインは、転写活性化ドメイン（例えば、ＶＰ６４またはＮＦ－ＫＢ　ｐ６５）である。いくつかの実施形態では、異種の機能的ドメインは、転写サイレンサーまたは転写抑制ドメインである（例えば、転写抑制ドメインは、クルーペル随伴ボックス（ＫＲＡＢ）ドメイン、ＥＲＦリプレッサードメイン（ＥＲＤ）、またはｍＳｉｎ３Ａ相互作用ドメイン（ＳＩＤ）であり、転写サイレンサーは、ヘテロクロマチンタンパク質１（ＨＰ１）である）。いくつかの実施形態では、異種の機能的ドメインは、ＤＮＡのメチル化状態を修飾する酵素（例えば、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ（ＤＮＭＴ）またはＴＥＴタンパク質（ＴＥＴ１など））である。いくつかの実施形態では、異種の機能的ドメインは、ヒストンサブユニットを修飾する酵素（例えば、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（ＨＡＴ）、ヒストンデアセチラーゼ（ＨＤＡＣ）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ（ＨＭＴ）、またはヒストンデメチラーゼ）である。一部の実施形態では、異種の機能的ドメインは、生物学的テザー（例えば、ＭＳ２、Ｃｓｙ４、またはラムダＮ）である。いくつかの実施形態では、異種の機能的ドメインはＦｏｋＩである。
【００６５】
一部の実施形態では、異種の機能的ドメインは、シトシンＤＮＡ塩基を修飾するデアミナーゼ、例えば、アポリポタンパク質Ｂ　ｍＲＮＡ編集酵素由来のシチジンデアミナーゼ、ＡＰＯＢＥＣ１を含むデアミナーゼの触媒ポリペプチド様（ＡＰＯＢＥＣ）ファミリーなどの塩基エディターである、ＡＰＯＢＥＣ２、ＡＰＯＢＥＣ３Ａ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｂ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｃ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｄ／Ｅ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｆ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｇ、ＡＰＯＢＥＣ３Ｈ、ＡＰＯＢＥＣ４、活性化誘導シチジンデアミナーゼ（ＡＩＤ）、シトシンデアミナーゼ１（ＣＤＡ１）、及びＣＤＡ２、ならびにｔＲＮＡに作用するシトシンデアミナーゼ（ＣＤＡＴ）を含む。具体的には、ｅｖｏＡＰＯＢＥＣ１－ＢＥ４ｍａｘ、ｅＡ３Ａ－ＢＥ５、及びＥＡ－ＢＥ４ｍａｘが挙げられる。
【００６６】
いくつかの実施形態では、異種の機能的ドメインは、アデノシンＤＮＡ塩基を修飾するデアミナーゼであり、例えば、デアミナーゼは、アデノシンデアミナーゼ１（ＡＤＡ１）、ＡＤＡ２であり、ＲＮＡ１（ＡＤＡＲ１）、ＡＤＡＲ２、ＡＤＡＲ３に作用するアデノシンデアミナーゼ；ｔＲＮＡ１（ＡＤＡＴ１）、ＡＤＡＴ２、ＡＤＡＴ３に作用するアデノシンデアミナーゼ、及び天然に存在するまたは操作されたｔＲＮＡ特異的アデノシンデアミナーゼ（ＴａｄＡ）を含む。例えば、ＡＢＥ８ｅ－ＴａｄＡ－８ｅである。いくつかの実施形態では、ＴａｄＡアデノシンデアミナーゼドメインは、Ｖ１０６Ｗの置換を含む。
【００６７】
いくつかの実施形態では、異種の機能的ドメインは、内因性ＤＮＡ修復または塩基切除修復（ＢＥＲ）経路を阻害または増強する酵素、ドメイン、またはペプチド、例えば、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（ＵＤＧ）を阻害するウラシルＤＮＡグリコシラーゼ阻害剤（ＵＧＩ）である。ウラシルＮ－グリコシラーゼ、またはＵＮＧとして知られる）ウラシ

ルの媒介された切除によるＢＥＲの開始、またはバクテリオファージＭｕ由来のＧａｍなどのＤＮＡ末端結合タンパク質。

【００６８】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、塩基エディターである。塩基エディターエンドヌクレアーゼは一般に、塩基エディターに融合された触媒的に不活性なＣａｓエンドヌクレアーゼを含む。例えば、エンドヌクレアーゼは、Ｄ１０、Ｅ７６２、Ｄ８３９、Ｈ９８３、またはＤ９８６に変異を有するＳｐＣａｓ９であり、及び／またはＨ８４０もしくはＮ８６３で、上述したような塩基エディターに融合される。

【００６９】

いくつかの事例では、エンドヌクレアーゼ（Ｃａｓ９またはＣａｓ１２ａ）は、核局在化配列、細胞透過ペプチド配列、アフィニティータグ、及び／または蛍光タンパク質のうちの１つ以上に融合されている。例えば、核局在化配列は、ＳＶ４０ラージＴ抗原核局在化配列（ＰＫＫＫＲＫＶ、配列番号８２）、ヌクレオプラスミン核局在化配列（ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ、配列番号８３）、またはｃ－Ｍｙｃ核局在化配列（ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ；配列番号８４）である。例えば、核局在化配列（複数可）は、Ｃａｓ９またはＣａｓ１２ａタンパク質のＮ末端及び／またはＣ末端に融合される。いくつかの実施形態では、異種の機能的ドメインがＣａｓ９またはＣａｓ１２ａタンパク質のＮ末端及び／またはＣ末端に融合される場合、核局在化配列（複数可）は、Ｎ末端及び／または異種の機能的ドメイン－Ｃａｓタンパク質複合体のＣ末端、または異種の機能的ドメインとＣａｓタンパク質との間に挿入される。

【００７０】

例示的なＣａｓエンドヌクレアーゼの配列を下記で提供する：

配列番号７（ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　３ｘＮＬＳアデニン塩基エディターのアミノ酸配列）：

【化６－１】

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVI
GEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIG
RVVFGWRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQ
KKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAV
ITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTRLKRTARRRYTRRKNRI
CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFE
ENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF
DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA
PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYK
FIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFL
KDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDL
LFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNE
ENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLING
IRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA
GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG
IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF

【化６－２】

LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAER
GGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVS
DFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA
KSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT
VRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPTVAY
SVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFV
EQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTRL
GAPRAFKYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTAD
GSEFEPKKKRKVGSGSKRPAATKKAGQAKKKKLE

【００７１】

配列番号８５（ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ　３ｘＮＬＳアデニン塩基エディターのアミノ酸配列）：

【化７－１】

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVI
GEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCWMCAGAMIHSRIG
RVVFGWRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQ
KKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAV
ITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTRLKRTARRRYTRRKNRI
CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFE
ENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF
DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA
PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYK
FIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFL
KDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDL
LFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNE
ENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLING
IRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA
GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG

【化７－２】

IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF
LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAER
GGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVS
DFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA
KSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT
VRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPTVAY
SVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFV
EQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTRL
GAPRAFKYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTAD
GSEFEPKKKRKVGSGSKRPAATKKAGQAKKKKLE

【００７２】

配列番号８－ＳｐＲＹ－ｅｖｏＡＰＯＢＥＣ１－ＢＥ４　３ｘＮＬＳアデニン塩基エディターのアミノ酸配列

【化８－１】

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSKTGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYE
INWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAI
TEFLSRYPNVTLFIYIARLYHLANPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWHNFVNY
SPSNESHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQSQLTSFTIALQSCHYQRL
PPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVG
WAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTRLKRTARRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTI
YHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQ
LFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFK
SNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI
TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEE
FYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY
PFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQ
SFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAI
VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFL

【化８－２】

DNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKL
INGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIA
NLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRI
EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVP
QSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK
LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK
MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRD
FATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPT
VAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK
LPKYSLFELENGRKRMLASAKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TRLGAPRAFKYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSGG
SGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVM
LLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESI
LMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKI
KMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKVGSGSKRPAATKKAGQAKKKKLE

【００７３】

配列番号９－ＳｐＲＹ－Ｋ９１８Ｎ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　３ｘＮＬＳアデニン塩基

エディターのアミノ酸配列

【化９－１】

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVI
GEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIG
RVVFGWRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQ
KKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAV
ITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTRLKRTARRRYTRRKNRI
CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFE
ENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF
DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA

【化９－２】

PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYK
FIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFL
KDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDL
LFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNE
ENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLING
IRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA
GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG
IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF
LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAER
GGLSELDKAGFINRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVS
DFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA
KSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT
VRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPTVAY
SVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFV
EQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTRL
GAPRAFKYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTAD
GSEFEPKKKRKVGSGSKRPAATKKAGQAKKKKLE

【００７４】

配列番号１０－ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　３ｘＮＬＳアデニン塩基エディターのヌクレオチド配列：

【化１０－１】

atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtctc
tgaggtggagttttcccacgagtactggatgagacatgccctgaccctggccaagaggg
cacgggatgagagggaggtgcctgtgggagccgtgctggtgctgaacaatagagtgatc
ggcgagggctggaacagagccatcggcctgcacgacccaacagcccatgccgaaattat
ggccctgagacagggcggcctggtcatgcagaactacagactgattgacgccaccctgt
acgtgacattcgagccttgcgtgatgtgcgccggcgccatgatccactctaggatcggc
cgcgtggtgtttggatggagaaattctaaaagaggcgccgcaggctccctgatgaacgt

【化１０－２】

gctgaactaccccggcatgaatcaccgcgtcgaaattaccgagggaatcctggcagatg
aatgtgccgccctgctgtgcgatttctatcggatgcctagacaggtgttcaatgctcag
aagaaggcccagagctccatcaactccggaggatctagcggaggctcctctggctctga
gacacctggcacaagcgagagcgcaacacctgaaagcagcgggggcagcagcggggggt
cagacaagaagtacagcatcggcctggccatcggcaccaactctgtgggctgggccgtg
atcaccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccg
gcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccg
agAGAacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggatc
tgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttcca
cagactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatct
tcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatctaccacctg
agaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggctgatctatctggccct
ggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgaca
acagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgag
gaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgag
caagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgcccggcgagaagaagaatggcc
tgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgacccccaacttcaagagcaacttc
gacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga
caacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacc
tgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcc
cccctgagcgcctctatgatcaagagatacgacgagcaccaccaggacctgaccctgct
gaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagattttcttcgaccaga
gcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaag
ttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaa
cagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccccaccaga
tccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttacccattcctg
aaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcccctactacgtggg
ccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaacca
tcacccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatc

【化１０－３】

gagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacag
cctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaaatacgtgaccg
agggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctg
ctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaa
aatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccc
tgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgag
gaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttgaggacagaga
gatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagtgatgaagc
agctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggc
atccgggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgc
caacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgacctttaaagaggacatcc
agaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgccaatctggcc
ggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtggacgagctcgt
gaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaacc
agaccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggc
atcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgca
gaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacgtggaccagg
aactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccatatcgtgcctcagagcttt
ctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaa
gagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagc
tgctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagaga
ggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctggtggaaacccg
gcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgacg
agaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtcc
gatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgc
ccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagc
tggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgcc
aagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttctacagcaacatcat
gaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctga

【化１０－４】

tcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccacc
gtgcggaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagac
aggcggcttcagcaaagagtctatcAGAcccaagaggaacagcgataagctgatcgcca
gaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcCTTTGGcccaccgtggcctat
tctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaa
agagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgact
ttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaag
tactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgccAAGCaact
gcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctgtacctggcca
gccactatgagaagctgaagggctcccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtg
gaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagag
agtgatcctggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccggg
ataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctgaccaGActg
ggagcccctAGAgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccCTaagCAAtacaGAag
caccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgaga
cacggatcgacctgtctcagctgggaggtgactctggcggctcaaaaagaaccgccgac
ggcagcgaattcgagcccaagaagaagaggaaagtcggcagcggaagcaaaaggccggc
ggccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaagctcgagtaa

【００７５】

配列番号１１－ＳｐＲＹ－ｅｖｏＡＰＯＢＥＣ１－ＢＥ４　３ｘＮＬＳアデニン塩基エディターのヌクレオチド配列：

【化１１－１】

atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtcag
ttcaaagactgggcctgtcgccgtcgatccaaccctgcgccgccggattgaacctcacg
agtttgaagtgttctttgacccccgggagctgagaaaggagacatgcctgctgtacgag
atcaactggggaggcaggcactccatctggaggcacacctctcagaacacaaataagca
cgtggaggtgaacttcatcgagaagtttaccacagagcggtacttctgccccaatacca
gatgtagcatcacatggtttctgagctggtccccttgcggagagtgtagcagggccatc
accgagttcctgtccagatatccaaatgtgacactgtttatctacatcgccaggctgta
tcacctggcaaacccaaggaataggcagggcctgcgcgatctgatcagctccggcgtga

【化１１－２】

ccatccagatcatgacagagcaggagtccggctactgctggcacaacttcgtgaattat
tctcctagcaacgagtcccactggcctaggtacccacacctgtgggtgcgcctgtacgt
gctggagctgtattgcatcatcctgggcctgccccttgtctgaatatcctgcggagaa
agcagagccagctgacctcctttacaatcgccctgcagtcttgtcactatcagaggctg
ccaccccacatcctgtgggccacaggcctgaagtctggcggatctagcggaggatcctc
tggcagcgagacaccaggaacaagcgagtcagcaacaccagagagcagtggcggcagca
gcggcggcagcgacaagaagtacagcatcggcctggccatcggcaccaactctgtgggc
tgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaa
caccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcg
aaacagccgagAGAacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaag
aaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacag
cttcttccacagactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggc
accccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatc
taccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggctgatcta
tctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctga
accccgacaacagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccag
ctgttcgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgc
cagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgcccggcgagaaga
agaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgacccccaacttcaag
agcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacga
cgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccg
ccaagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatc
accaaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacgacgagcaccaccaggacct
gaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagattttct
tcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagag
ttctacaagttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgt
gaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatcc
cccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttac
ccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatccccta

【化１１－３】

ctacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcg
aggaaaccatcacccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccag
agcttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcc
caagcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaaat
acgtgaccgagggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaaggccatc
gtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggacta
cttcaagaaaatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttca
acgcctccctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctg
gacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttga
ggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaag
tgatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctg
atcaacggcatccgggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccga
cggcttcgccaacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgacctttaaag
aggacatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgcc
aatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtgga
cgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggcca
gagagaaccagaccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatc
gaagagggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacac
ccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacg
tggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccatatcgtgcct
cagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaa
ccggggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactact
ggcggcagctgctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaag
gccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctggt
ggaaacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacacta
agtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaag
ctggtgtccgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaacta
ccaccacgcccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagt
accctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaag

【化１１－４】

atgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttctacag
caacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagc
ggcctctgatcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggat
tttgccaccgtgcggaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccga
ggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcAGgcccaagaggaacagcgataagc
tgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcCTGTGGcccacc
gtggcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaa
gagtgtgaaagagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatc
ccatcgactttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaag
ctgcctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgc
cAAGCAGctgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctgt
acctggccagccactatgagaagctgaagggctcccccgaggataatgagcagaaacag
ctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagtt
ctccaagagagtgatcctggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaaca
agcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctg
accaGGctgggagcccctAGAgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccCCaagCA
gtacaGGagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcc
tgtacgagacacggatcgacctgtctcagctgggaggtgacagcggcgggagcggcggg
agcgggggagcactaatctgagcgacatcattgagaaggagactgggaaacagctggt
cattcaggagtccatcctgatgctgcctgaggaggtggaggaagtgatcggcaacaagc
cagagtctgacatcctggtgcacaccgcctacgacgagtccacagatgagaatgtgatg
ctgctgacctctgacgcccccgagtataagccttgggccctggtcatccaggattctaa
cggcgagaataagatcaagatgctgagcggaggatccggaggatctggaggcagcacca
acctgtctgacatcatcgagaaggagacaggcaagcagctggtcatccaggagagcatc
ctgatgctgcccgaagaagtcgaagaagtgatcggaaacaagcctgagagcgatatcct
ggtccataccgcctacgacgagagtaccgacgaaaatgtgatgctgctgacatccgacg
ccccagagtataagccctgggctctggtcatccaggattccaacggagagaacaaaatc
aaaatgctgtctggcggctcaaaaagaaccgccgacggcagcgaattcgagcccaagaa
gaagaggaaagtcggcagcggaagcaaaaggccggcggccacgaaaaaggccggccagg
caaaaaagaaaaagctcgagtaa

【００７６】

配列番号１２－ＳｐＲＹ－Ｋ９１８Ｎ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　３ｘＮＬＳアデニン塩基エディターのヌクレオチド配列

【化１２－１】

atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtctc
tgaggtggagttttcccacgagtactggatgagacatgccctgaccctggccaagaggg
cacgggatgagagggaggtgcctgtgggagccgtgctggtgctgaacaatagagtgatc
ggcgagggctggaacagagccatcggcctgcacgacccaacagcccatgccgaaattat
ggccctgagacagggcggcctggtcatgcagaactacagactgattgacgccaccctgt
acgtgacattcgagccttgcgtgatgtgcgccggcgccatgatccactctaggatcggc
cgcgtggtgtttggatggagaaattctaaaagaggcgccgcaggctccctgatgaacgt
gctgaactaccccggcatgaatcaccgcgtcgaaattaccgagggaatcctggcagatg
aatgtgccgccctgctgtgcgatttctatcggatgcctagacaggtgttcaatgctcag
aagaaggcccagagctccatcaactccggaggatctagcggaggctcctctggctctga
gacacctggcacaagcgagagcgcaacacctgaaagcagcgggggcagcagcgggggt
cagacaagaagtacagcatcggcctggccatcggcaccaactctgtgggctgggccgtg
atcaccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccg
gcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccg
agAGAacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggatc
tgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttcca
cagactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatct
tcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatctaccacctg
agaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggctgatctatctggccct
ggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgaca
acagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgag
gaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgag
caagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgcccggcgagaagaagaatggcc
tgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgacccccaacttcaagagcaacttc

【化１２－２】

gacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga
caacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacc
tgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcc
cccctgagcgcctctatgatcaagagatacgacgagcaccaccaggacctgaccctgct
gaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagattttcttcgaccaga
gcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaag
ttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaa
cagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccaccaga
tccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttacccattcctg
aaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcccctactacgtggg
ccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaacca
tcaccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatc
gagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacag
cctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaaatacgtgaccg
agggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctg
ctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaa
aatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccc
tgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgag
gaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttgaggacagaga
gatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagtgatgaagc
agctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggc
atccgggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgc
caacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgacctttaaagaggacatcc
agaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgccaatctggcc
ggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtggacgagctcgt
gaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaacc
agaccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggc
atcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgca
gaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacgtggaccagg

【化１２－３】

aactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccatatcgtgcctcagagcttt
ctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaa
gagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagc
tgctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagaga
ggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaaCagacagctggtggaaacccg
gcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgacg
agaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtcc
gatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgc
ccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagc
tggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgcc
aagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttctacagcaacatcat
gaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctga
tcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccacc
gtgcggaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagac
aggcggcttcagcaaagagtctatcAGAcccaagaggaacagcgataagctgatcgcca
gaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcCTTTGGcccaccgtggcctat
tctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaa
agagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgact
ttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaag
tactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgccAAGCaact
gcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctgtacctggcca
gccactatgagaagctgaagggctcccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtg
gaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagag
agtgatcctggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccggg
ataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctgaccaGActg
ggagcccctAGAgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccCTaagCAAtacaGAag
caccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgaga
cacggatcgacctgtctcagctgggaggtgactctggcggctcaaaaagaaccgccgac

【化１２－４】

ggcagcgaattcgagcccaagaagaagaggaaagtcggcagcggaagcaaaaggccggc
ggccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaagctcgag

【００７７】

ｇＲＮＡ

「ｇＲＮＡ」、「ガイドＲＮＡ」、及び「ＣＲＩＳＰＲガイド配列」という用語は、全体を通して互換的に使用され得、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓシステムのＣａｓ　ＤＮＡ結合タンパク質の特異性を決定する配列を含む核酸を指す。ｇＲＮＡは、宿主細胞のゲノム内の

標的核酸配列に（部分的にまたは完全に相補的に）ハイブリダイズする。いくつかの事例では、ｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを合わせて指す（例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼが使用されている場合－それらの事例では、ガイドＲＮＡは、シングルガイドＲＮＡ、すなわち、ｓｇＲＮＡと称され得る）。他の事例では、ｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡのみを指す（例えば、Ｃｐｆ１エンドヌクレアーゼが使用されている場合）。標的核酸にハイブリダイズするｇＲＮＡまたはその部分は、１５～２５ヌクレオチド、１８～２２ヌクレオチド、または１９～２１ヌクレオチドの長さであり得る。一部の実施形態では、標的核酸にハイブリダイズするｇＲＮＡ配列は、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、標的核酸にハイブリダイズするｇＲＮＡ配列は、１０～３０ヌクレオチド長、または１５～２５ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡ配列は、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または少なくとも１００％相補的である、標的核酸。

【００７８】

ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及びキットを編集するための例示的なガイドＲＮＡを以下の表１に示す。当業者には明らかなように、ｇＲＮＡ配列の選択は、予測されるオンターゲット及び／またはオフターゲット結合部位の数などの要因に依存し得る。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡ配列は、潜在的なオンターゲット部位を最大化し、潜在的なオフターゲット部位を最小化するように選択される。

【表１－１】

表１：

標的遺伝子	gRNA 名	配列番号	配列	変異(複数可)	塩基エディターータイプ	PAM 配列	Cas 要件
FLT3(CD135)	FLT3_e9_Cas9-4	13	GAGCAAAAGGGTCTTGATAA	N399 及びその近傍領域	Cas9 ヌクレアーゼ		Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_Cas9-13	14	AGGGTCTTGATAACGGATAC	N399 及びその近傍領域	Cas9 ヌクレアーゼ		Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_Cas12a-15	15	TGGTCTCACCTGTATCCGTTATC	N399 及びその近傍領域	Cas12a ヌクレアーゼ		Cas12a
FLT3(CD135)	FLT3_e9_Cas12a-15	16	CTTGTGAGCAAAAGGGTCTTGAT	N399 及びその近傍領域	Cas12a ヌクレアーゼ		Cas12a
FLT3(CD135)	FLT3_e9_15	17	GTCTTGATAACGGATACAGG	N399D、N399G	アデニン塩基エディター	TGA	NG-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_16	18	CTTGATAACGGATACAGGTG	N399D、N399G	アデニン塩基エディター	AGA	NG-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_17	19	TCTTGATAACGGATACAGGT	N399D、N399G	アデニン塩基エディター	GAG	SpRY-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_18	20	TTGATAACGGATACAGGTGA	N399D、N399G	アデニン塩基エディター	GAC	SpRY-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_1821	21	CTTGATAACGGATACAGGTGA	N399D、N399G	アデニン塩基エディター	GAC	SpRY-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_1819	22	TGATAACGGATACAGGTGA	N399D、N399G	アデニン塩基エディター	GAC	SpRY-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_19	23	ATAACGGATACAGGTGAGAC	N399D、N399G	アデニン塩基エディター	CAC	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_N	24	CATAGAATAGTCGGCGTCTT	S59P、Y58H	アデニン塩基エディター	TAA	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_N21	25	GCATAGAATAGTCGGCGTCTT	S59P、Y58H	アデニン塩基エディター	TAA	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_N19	26	ATAGAATAGTCGGCGTCTT	S59P、Y58H	アデニン塩基エディター	TAA	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_R	27	ATAGAATAGTCGGCGTCTTT	S59P、Y58H	アデニン塩基エディター	AAC	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_R21	28	CATAGAATAGTCGGCGTCTTT	S59P、Y58H	アデニン塩基エディター	AAC	SpRY-Cas9

【表１－２】

IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_R19	29	TAGAATAGTCGGCGTCTTT	S59P、Y58H	アデニン塩基エディター	AAC	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_H	30	GGCCACTCGGACGGTGTAGT	R84Q、V85M/I、A86T	シチジン塩基エディター	TGG	SpCas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_Q	31	GCCACTCGGACGGTGTAGTT	R84Q、V85M/I、A86T	シチジン塩基エディター	GGT	SpCas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_L	32	TATTCTATGCCGGTAAATCA	S59F	シチジン塩基エディター	TAC	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_M	33	ACTATTCTATGCCGGTAAAT	S59F	シチジン塩基エディター	触媒	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_F	34	CCAACCCACCATTCTCCACG	P88L/S、P89L/S	シチジン塩基エディター	TGG	SpCas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_Z	35	CAACCCACCATTCTCCACGT	P88L/S、P89L/S	シチジン塩基エディター	GGA	NG-Cas9
キット(CD117)	キット-e7-X	36	AACTTCATCTAACGAGATTA	H378R	アデニン塩基エディター	AAA	SpRY-Cas9
キット(CD117)	キット-e7-Y	37	ACTTCATCTAACGAGATTAA	H378R	アデニン塩基エディター	AAG	SpRY-Cas9
キット(CD117)	キット-e7-3	38	CTTCATCTAACGAGATTAAA	H378R	アデニン塩基エディター	AGG	SpCas9
キット(CD117)	キット-e7-Z	39	TTCATCTAACGAGATTAAAA	H378R	アデニン塩基エディター	GGC	NG-Cas9

【００７９】

いくつかの実施形態では、複数のｇＲＮＡが細胞に導入される（例えば、１つはＦＬＴ３用であり、１つはＣＤ１２３用である）。いくつかの実施形態では、２つ以上のガイドＲＮＡは、等モル量で細胞にトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、２つ以上のガイドＲＮＡは、等モルでない量で提供される。いくつかの実施形態では、２つ以上のガイドＲＮＡは、各標的の編集が等頻度で生じるように最適化される量で提供される。いくつかの実施形態では、２つ以上のガイドＲＮＡは、各標的の編集が最適な頻度で生じるように最適化される量で提供される。

【００８０】

鋳型ドナー配列

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、「鋳型」ドナー配列である。鋳型ドナー配列は、１００～５００ヌクレオチド（例えば、２００ヌクレオチド）の長い一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）を含み、これは、相同性指向修復（ＨＤＲ）のためのドナー鋳型として機能し、それにより、所望の変異は、遺伝子各ドナー鋳型は、ＤＮＡ修復が成功した後にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓリボ核タンパク質ヌクレアーゼ複合体によって再切断されるリスクを低減させるために、バイスタンダーアミノ酸に選択されたサイレント変異をさらに含む。

【００８１】

ＦＬＴにおいて変異Ｎ３９９Ｄを導入するための例示的な鋳型ドナー配列を以下の表２に示す。

【表２】

表 2:CRISPR-Cas ヌクレアーゼ相同性指向修復を介した FLT3　N399D 導入のための鋳型として機能する ssODN　200-bp 長のオリゴドナー

ドナー鋳型名	配列番号	配列
FLT3-N399D-A	40	aagagttttgtttttctgtcaggtttaaagcctacccacaaatcagatgtacgtggaccttctctcgaaaatcatttccttgtgagcaaaagggtcttgatGacggatacaggtgagaccacaaaggactctaagataccatttttagcataattctccttgcttgtcgcccttgagaaggacagtttttatacttatgga
FLT3-N399D-C	41	aagagttttgtttttctgtcaggtttaaagcctacccacaaatcagatgtacgtggaccttctctcgaaaatcatttccttgtgagcaaaagggtTtGgaCGacggatacaggtgagaccacaaaggactctaagataccatttttagcataattctccttgcttgtcgcccttgagaaggacagtttttatacttatgga
FLT3-N399D-F	42	tgaagagttttgtttttctgtcaggtttaaagcctacccacaaatcagatgtacgtggaccttctctcgaaaatcattCccAtgCgaAcaaaagggATtGgaCGaTggatacaggtgagaccacaaaggactctaagataccatttttagcataattctccttgcttgtcgcccttgagaaggacagttttatacttatg
FLT3-N399D-H	43	agagttttgtttttctgtcaggtttaaagcctacccacaaatcagatgtacgtggaccttctctcgaaaatcatttccttgtgagcaaaagggtcttgaCGaTggTtaTaggtgagaccacaCaggactctaagataccatttttagcataattctccttgcttgtcgcccttgagaaggacagttttatacttatggaa
FLT3-N399D-A　RC	44	tccataagtataaaactgtccttctcaagggcgacaagcaaggagaattatgctaaaaatggtatcttagagtcctttgtggtctcacctgtatccgtCatcaagacccttttgctcacaaggaaatgattttcgagagaaggtccacgtacatctgatttgtgggtaggctttaaacctgacagaaaacaaaactctt
FLT3-N399D-C　RC	45	tccataagtataaaactgtccttctcaagggcgacaagcaaggagaattatgctaaaaatggtatcttagagtcctttgtggtctcacctgtatccgtCGtcCaAacccttttgctcacaaggaaatgattttcgagagaaggtccacgtacatctgatttgtgggtaggctttaaacctgacagaaaaacaaaactctt
FLT3-N399D-F　RC	46	cataagtataaaactgtccttctcaagggcgacaagcaaggagaattatgctaaaaatggtatcttagagtcctttgtggtctcacctgtatccAtCGtcCaATccctttgTtcGcaTggGaatgattttcgagagaaggtccacgtacatctgatttgtgggtaggctttaaacctgacagaaaaacaaaactcttca
FLT3-N399D-H　RC	47	ttccataagtataaaactgtccttctcaagggcgacaagcaaggagaattatgctaaaaatggtatcttagagtcctGtgtggtctcacctAtaAccAtCGtcaagacccttttgctcacaaggaaatgattttcgagagaaggtccacgtacatctgatttgtgggtaggctttaaacctgacagaaaaacaaaactct

【００８２】

ｉｖ．遺伝子操作された造血細胞

本明細書では、本明細書に記載の遺伝子操作された造血細胞を産生する方法が提供され、１つ以上の細胞表面抗原を変異形態で発現するための編集された遺伝子を保有する。かかる方法は、細胞を提供することと、ゲノム編集のためのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓシステムの細胞構成要素を細胞に導入することとを含み得る。一部の実施形態では、細胞表面抗原をコードするヌクレオチド配列の部分にハイブリダイズする、またはハイブリダイズすることが予測されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド ＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む核酸が、細胞に導入される。いくつかの実施形態では、ベクターは、エレクトロポレーション法によって

細胞に導入される。一部の実施形態では、Ｃａｓエンドヌクレアーゼが細胞に導入される。一部の実施形態では、Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、Ｃａｓエンドヌクレアーゼをコードする核酸として細胞に導入される。一部の実施形態では、ｇＲＮＡ及びＣａｓエンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、同じ核酸（例えば、同じベクター）上で細胞に導入される。一部の実施形態では、Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、タンパク質の形態で細胞に導入される。一部の実施形態では、Ｃａｓエンドヌクレアーゼ及びｇＲＮＡは、インビトロで予め形成され、リボ核タンパク質複合体として細胞に導入される。

【００８３】

ｖ．変異体ＦＬＴ３

いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質は、ＦＬＴ３である。野生型ＦＬＴ３のアミノ酸配列を以下に示す。

配列番号４８（ＦＬＴ３野生型アミノ酸配列）

【化１３－１】

MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSES
PEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHF
DLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKME
NQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNE
LGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEG
NYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATN
SSEDYEIDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQP

【化１３－２】

GEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP
NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYF
YVDFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEK
ADSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKRE
KFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIE
YENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVK
ICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLG
VNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLG
CQLADAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS

【００８４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、Ｃａｓヌクレアーゼまたはそのバリアントを使用して造血細胞の集団を遺伝子操作することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、Ｃａｓヌクレアーゼまたはそのバリアント（例えば、ＳｐＣａｓ９またはＡｓＣｐｆ１）を使用して、造血細胞の集団における細胞表面抗原をコードする遺伝子を遺伝子操作することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、集団において、ＦＬＴ３遺伝子を遺伝子改変もしくは編集すること、またはＣＤ１２３遺伝子を遺伝子改変もしくは編集すること、またはキット遺伝子を遺伝子改変もしくは編集すること、またはＦＬＴ３遺伝子及びＣＤ１２３遺伝子を遺伝子改変もしくは編集することを含む。Ｃａｓヌクレアーゼを使用した造血細胞の減少。

【００８５】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、Ｃａｓヌクレアーゼまたはそのバリアントを使用して造血細胞の集団における変異体ＦＬＴ３遺伝子を遺伝子操作することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、Ｃａｓヌクレアーゼまたはそのバリアントを使用して、造血細胞の集団においてＦＬＴ３のエクソン９の変異（例えば、それによりコードされるポリペプチドのＮ３９９位の変異をもたらす）を遺伝子操作することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、Ｃａｓヌクレアーゼまたはそのバリアント、及び配列番号１３～２３のうちのいずれか１つによって提供されるガイド配列を使用して、造血細胞集団における変異体ＦＬＴ３遺伝子を遺伝子操作することを含む。いくつかの実施形態では、鋳型ドナーＤＮＡ配列も提供される。例えば、鋳型ドナーＤＮＡ配列は、配列番号４０～４３のうちのいずれか１つによって提供される。

【００８６】
いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子は、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子は、ＦＬＴ３遺伝子のエクソン９に少なくとも１つの変異を含む。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子のエクソン９における少なくとも１つの変異により、Ｎ３９９位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。いくつかの事例では、Ｎ３９９位の変異は、Ｎ３９９ＤまたはＮ３９９Ｇである。遺伝子操作されたＦＬＴ３のアミノ酸配列の例を以下に示す。

配列番号４９　ＦＬＴ３　Ｎ３５４Ｓ、Ｓ３５６Ｑ、Ｄ３５８Ｅ、Ｑ３６３Ｐ、Ｅ３６６Ｋ、Ｑ３７８Ｒ、Ｔ３８４Ｉ、Ｒ３８７Ｑ、Ｋ３８９Ａ、Ｋ３９５Ｒ、Ｄ３９８Ｅ、Ｎ３９９Ｄ、Ｎ４０８Ｄ、Ｈ４１１Ｎ、Ｑ４１２Ｋ、Ｈ４１９Ｙ、ＦＬＴ３－ＥＣＤ４バリアント（細胞外ドメイン４内に１６個のアミノ酸置換を有する。これは、Ｎ３９９Ｄを含めたクローン４Ｇ８の結合を低下させる）

【化１４】

MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSES
PEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHF
DLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKME
NQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNE
LGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEG
NYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATS
SQEEYEIDPYEKFCFSVRFKAYPRIRCTWIFSQASFPCEQRGLEDGYSISKFCDHKNKP
GEYIFYAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP
NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYF
YVDFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEK
ADSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKRE
KFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIE
YENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVK
ICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLG
VNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLG
CQLADAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS

【００８７】
配列番号５０　ＦＬＴ３　Ｎ３５４Ｓ、Ｓ３５６Ｑ、Ｄ３５８Ｅ、Ｑ３６３Ｐ、Ｅ３６６Ｋ、Ｑ３７８Ｒ、Ｔ３８４Ｉ、Ｒ３８７Ｑ、Ｋ３８９Ａ、Ｋ３９５Ｒ、Ｄ３９８Ｅ、Ｎ３９９Ｄ（ＦＬＴ３エクソン９変異）
【化１５】
MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSES
PEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHF
DLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKME
NQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNE
LGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEG
NYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATS
SQEEYEIDPYEKFCFSVRFKAYPRIRCTWIFSQASFPCEQRGLEDGYSISKFCNHKHQP
GEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP
NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYF
YVDFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEK
ADSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKRE
KFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIE
YENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVK
ICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLG
VNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLG
CQLADAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS

【００８８】
配列番号５１（ＦＬＴ３　Ｎ３９９Ｄバリアントアミノ酸配列）
【化１６－１】
MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSES
PEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHF
DLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKME
NQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNE
LGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEG

【化１６－２】

NYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATN
SSEDYEIDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDDGYSISKFCNHKHQP
GEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP
NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYF
YVDFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEK
ADSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKRE
KFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIE
YENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVK
ICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLG
VNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLG
CQLADAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS

【００８９】

配列番号５２（ＦＬＴ３　Ｎ３９９Ｇバリアントアミノ酸配列）

【化１７】

MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSES
PEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHF
DLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKME
NQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNE
LGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEG
NYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATN
SSEDYEIDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDGGYSISKFCNHKHQP
GEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP
NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYF
YVDFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEK
ADSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKRE
KFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIE
YENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVK
ICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLG

VNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLG
CQLADAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS

【００９０】

いくつかの実施形態では、配列番号５１に示される配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、

または１００％同一であるポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｎ３９９Ｄに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減している。栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も、本明細書において提供される。

【００９１】

いくつかの実施形態では、配列番号５２に示される配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｎ３９９Ｇに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減している。栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も、本明細書において提供される。

【００９２】

ｖｉ．変異体ＣＤ１２３

いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質は、ＣＤ１２３である。野生型ＣＤ１２３のアミノ酸配列を以下に示す。

配列番号５３（ＣＤ１２３野生型アミノ酸配列）

【化１８】

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYS
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS
QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

【００９３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、Ｃａｓヌクレアーゼまたはそのバリアントを使用して造血細胞の集団における変異体ＣＤ１２３遺伝子を遺伝子操作することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、ＣＤ１２３のエクソン２における変異（例えば、それによりコードされるポリペプチドのＳ５９位の変異をもたらす）またはＣＤ１２３のエクソン３における変異（例えば、コードされたポリペプチドのＰ８８、Ｃａｓヌクレアーゼまたはそのバリアントを使用して、造血細胞の集団で実施した。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、Ｃａｓヌクレアーゼまたはそのバリアント、及び配列番号２４～３５のうちのいずれか１つによって提供されるガイド配列を使用して、造血細胞集団における変異体ＣＤ１２３遺伝子を遺伝子操作することを含む。

【００９４】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたＨＳＰＣは、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子を含み、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子は、ＣＤ１２３遺伝子のエクソン２及び／またはエクソン３に少なくとも１つの変異を含む。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン２における少なくとも１つの変異により、Ｓ５９位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。いくつかの事例では、Ｓ５９位の変異は、Ｓ５９ＰまたはＳ５９Ｆである。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン３における少なくとも１つの変異により、Ｐ８８位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。いくつかの事例では、Ｐ８８位の変異は、Ｐ８８ＬまたはＰ８８Ｓである。遺伝子操作されたＣＤ１２３のアミノ酸

配列の例を以下に示す。

【００９５】

配列番号５４（ＣＤ１２３　Ｓ５９Ｐバリアントアミノ酸配列）

【化１９】

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYP
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS
QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

【００９６】

配列番号５５（ＣＤ１２３　Ｙ５８Ｈ　Ｓ５９Ｐバリアントアミノ酸配列）

【化２０】

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADHP
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS
QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

【００９７】

配列番号５６（ＣＤ１２３　Ｓ５９Ｆバリアントアミノ酸配列）

【化２１】

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYF
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS
QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

【００９８】

配列番号５７（ＣＤ１２３　Ｐ８８Ｓバリアントアミノ酸配列）

【化２２】

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYS
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANSPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS
QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

【００９９】

配列番号５８（ＣＤ１２３　Ｐ８８Ｌバリアントアミノ酸配列）

【化２３】

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYS
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANLPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS
QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

【０１００】

ヌクレオチド配列は、以下の通りである：

ＣＤ１２３エクソン２野生型配列（配列番号　５９）

【化２４】

Atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg
gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactattctatgcc
g

【０１０１】

ＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿ＮまたはＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿Ｒ及びＳｐＲＹ＿ＡＢＥ８ｅ＿Ｖ１０６Ｗによって誘導された塩基編集を伴うＣＤ１２３エクソン２配列（Ｉバリアント）（配列番号６０）

【化２５】

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg
gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactaCtctatgcc
g

【０１０２】

ＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿ＮまたはＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿Ｒ及びＳｐＲＹ＿ＡＢＥ８ｅ＿Ｖ１０６Ｗによって誘導された塩基編集を伴うＣＤ１２３エクソン２配列（ＩＩバリアント）（配列番号６１）

【化２６】

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg
gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactatCctatgcc
g

【０１０３】

ＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿ＮまたはＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿Ｒ及びＳｐＲＹ＿ＡＢＥ８ｅ＿Ｖ１０６Ｗによって誘導された塩基編集を伴うＣＤ１２３エクソン２配列（ＩＩＩバリアント）（配列番号６２）

【化２７】

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg
gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactaCCctatgcc
g

【０１０４】

ＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿ＮまたはＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿Ｒ及びＳｐＲＹ＿ＡＢＥ８ｅ＿Ｖ１０６Ｗによって誘導された塩基編集を伴うＣＤ１２３エクソン２配列（ＩＶバリアント）（配列番号６３）

【化２８】

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg
gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactaCCcCatgcc
g

【０１０５】

ＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿ＮまたはＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿Ｒ及びＳｐＲＹ＿ＡＢＥ８ｅ＿Ｖ１０６Ｗによって誘導された塩基編集を伴うＣＤ１２３エクソン２配列（Ｖバリアント）（配列番号６４）

【化２９】

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg
gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactatCcCatgcc
g

【０１０６】

ＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿ＮまたはＩＬ３ＲＡ＿ｇＲＮＡ＿Ｒ及びＳｐＲＹ＿ＡＢＥ８ｅ＿Ｖ１０６Ｗによって誘導された塩基編集を伴うＣＤ１２３エクソン２配列（ＶＩバリアント）（配列番号６５）

【化３０】

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg
gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactattcCatgcc
g

【０１０７】

いくつかの実施形態では、配列番号５４に示される配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、

または１００％同一であるポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｓ５９Ｐに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している。栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も、本明細書において提供される。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、配列番号５５に示される配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｙ５８Ｈ及びＳ５９Ｐに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している。栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も、本明細書において提供される。栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も、本明細書において提供される。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、配列番号５６に示される配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｓ５９Ｆに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している。栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も、本明細書において提供される。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、配列番号５７に示される配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｐ８８Ｓに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している。栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も、本明細書において提供される。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、配列番号５８に示される配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｐ８８Ｌに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減している。栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も、本明細書において提供される。

【０１１２】

ｖｉｉ．　変異体ＫＩＴ

いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質は、ＫＩＴである。野生型ＫＩＴのアミノ酸配列を以下に示す。

【０１１３】

配列番号６６（ＫＩＴ野生型アミノ酸配列）

【化３１】

MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCT
DPGFVKWTFEILDETNENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLF
LVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKR
AYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLREGEEFTVTCTIK
DVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYANNT
FGSANVTTTLEVVDKGFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRT
FTDKWEDYPKSENESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKP
EILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKL
VVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVI
VAGMMCIIVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLS
FGKTLGAGAFGKVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLSYLGN
HMNIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEAALYKNLLH
SKESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVPTKADKRRSVRIGSYIERDVTPAIMEDDELALDLE
DLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIKNDSNYVVK
GNARLPVKWMAPESIFNCVYTFESDVWSYGIFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKE
GFRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSP
NRQKPVVDHSVRINSVGSTASSSQPLLVHDDV

【０１１４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、Ｃａｓヌクレアーゼまたはそのバリアントを使用して造血細胞の集団における変異体ＫＩＴ遺伝子を遺伝子操作することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、Ｃａｓヌクレアーゼまたはそのバリアントを使用して、造血細胞の集団においてＫＩＴのエクソン７の変異（例えば、変異位置Ｈ３７８）を遺伝子操作することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、Ｃａｓヌクレアーゼまたはそのバリアント、及び配列番号３６～４７のうちのいずれか１つによって提供されるガイド配列を使用して、造血細胞集団における変異体ＫＩＴ遺伝子を遺伝子操作することを含む。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたＨＳＰＣは、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子を含み、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子は、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減したタンパク質をコードする。いくつかの事例では、遺伝子操作されたキット遺伝子は、キット遺伝子のエクソン６及び／またはエクソン７に少なくとも１つの変異を含む。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子のエクソン７における少なくとも１つの変異により、Ｈ３７８位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。いくつかの事例では、Ｈ３７８位の変異は、Ｈ３７８ＲまたはＨ３７８ＳまたはＨ３７８ＰまたはＨ３７８ＡまたはＨ３７８Ｆまたは Ｈ３７８ＫまたはＨ３７８ＧまたはＨ３７８ＬまたはＨ３７８Ｍである。いくつかの事例では、キットのエクソン６における変異により、コードされたポリペプチドは、以下の変異Ｆ３１６Ｓ、Ｍ３１８Ｖ、Ｉ３１９Ｋ、Ｖ３２３Ｉ、Ｉ３３４Ｖ、Ｅ３６０Ｋ、Ｐ３６３Ｖ、Ｅ３６６Ｄの１つ以上を有する。いくつかの事例では、キットエクソン７変異は、Ｅ３７６Ｑ及び／またはＨ３７８Ｒに変異を有するポリペプチドをもたらす。

【０１１６】

遺伝子操作されたＫＩＴの例示的なアミノ酸配列を以下に示す：

配列番号６７　ＫＩＴ　Ｆ３１６Ｓ、Ｍ３１８Ｖ、Ｉ３１９Ｋ、Ｖ３２３Ｉ、Ｉ３３４Ｖ、Ｅ３６０Ｋ、Ｐ３６３Ｖ、Ｅ３６６Ｄ、Ｅ３７６Ｑ、Ｈ３７８Ｒ（ＫＩＴ－ＥＣＤ４バリアントアミノ酸配列）

【化３２－１】

MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCT
DPGFVKWTFEILDETNENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLF
LVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKR
AYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLREGEEFTVTCTIK
DVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYANNT
FGSANVTTTLEVVDKGFINISPVKNTTIFVNDGENVDLVVEYEAFPKPEHQQWIYMNRT
FTDKWKDYVKSDNESNIRYVSQLRLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKP
EILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKL
VVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVI

【化３２－２】

VAGMMCIIVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLS
FGKTLGAGAFGKVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLSYLGN
HMNIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEAALYKNLLH
SKESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVPTKADKRRSVRIGSYIERDVTPAIMEDDELALDLE
DLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIKNDSNYVVK
GNARLPVKWMAPESIFNCVYTFESDVWSYGIFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKE
GFRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSP
NRQKPVVDHSVRINSVGSTASSSQPLLVHDDV

【０１１７】

配列番号６８（ＫＩＴ　Ｈ３７８Ｒバリアントアミノ酸配列）

【化３３】

MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCT
DPGFVKWTFEILDETNENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLF
LVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKR
AYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLREGEEFTVTCTIK
DVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYANNT
FGSANVTTTLEVVDKGFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRT
FTDKWEDYPKSENESNIRYVSELRLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKP
EILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKL
VVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVI
VAGMMCIIVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLS
FGKTLGAGAFGKVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLSYLGN
HMNIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEAALYKNLLH
SKESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVPTKADKRRSVRIGSYIERDVTPAIMEDDELALDLE
DLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIKNDSNYVVK
GNARLPVKWMAPESIFNCVYTFESDVWSYGIFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKE
GFRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSP
NRQKPVVDHSVRINSVGSTASSSQPLLVHDDV

【０１１８】

いくつかの実施形態では、配列番号６７に示される配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｆ３１６Ｓ、Ｍ３１８Ｖ、Ｉ３１９Ｋ、Ｖ３２３Ｉ、Ｉ３３４Ｖ、Ｅ３６０Ｋ、Ｐ３６３Ｖ、Ｅ３６６Ｄ、Ｅ３７６Ｑ、及びＨ３７８Ｒに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減している。栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も、本明細書において提供される。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、配列番号６８に示される配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるポリペプチド配列が本明細書で提供され、ポリペプチド配列は、Ｈ３７８Ｒに変異を含み、ポリペプチド配列は、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減している。栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も、本明細書において提供される。

【０１２０】

ｖｉｉｉ．変異体ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及び／またはキット遺伝子を発現する遺伝子操作された造血細胞

いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質は、ＦＬＴ３及びＣＤ１２３である。いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質は、ＦＬＴ３及びＫＩＴである。いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質は、ＫＩＴ及びＣＤ１２３である。いくつかの実施形態では、２つ以上のガイドは、互いに同時にトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、２つ以上のガイドは、連続してまたは連続して、すなわち、２つ以上の別々のトランスフェクションで提供される。例えば、ＦＬＴ３ガイドＲＮＡ（配列番号１３～２３のうちのいずれか１つ）、ＣＤ１２３ガイドＲＮＡ（配列番号２４～３５のうちのいずれ

か１つ）、ＫＩＴガイドＲＮＡ（配列番号３６～４７のうちのいずれか１つ）。
【０１２１】
いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたＨＳＰＣは、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子を含み、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子は、治療用抗ＦＬＴ３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子は、ＦＬＴ３遺伝子のエクソン９に少なくとも１つの変異を含む。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＦＬＴ３遺伝子のエクソン９における少なくとも１つの変異により、Ｎ３９９位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。いくつかの事例では、Ｎ３９９位の変異は、Ｎ３９９ＤまたはＮ３９９Ｇである。遺伝子操作されたＦＬＴ３の例示的なアミノ酸配列は上に示されている（配列番号４９～５２を参照されたい）。
【０１２２】
いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたＨＳＰＣは、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子を含み、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子は、治療用抗ＣＤ１２３抗体への結合が低減したタンパク質をコードする。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子は、ＣＤ１２３遺伝子のエクソン２及び／またはエクソン３に少なくとも１つの変異を含む。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン２における変異により、Ｓ５９位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。いくつかの事例では、Ｓ５９位の変異は、Ｓ５９ＰまたはＳ５９Ｆである。いくつかの事例では、変異は、Ｓ５９Ｐ及びＹ５８Ｈである。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＣＤ１２３遺伝子のエクソン３における少なくとも１つの変異により、Ｐ８８位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。いくつかの事例では、Ｐ８８位の変異は、Ｐ８８ＬまたはＰ８８Ｓである。遺伝子操作されたＣＤ１２３の例示的なアミノ酸配列は上に示されている（配列番号５４～５８を参照されたい）。
【０１２３】
いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたＨＳＰＣは、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子を含み、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子は、治療用抗ＫＩＴ抗体への結合が低減したタンパク質をコードする。いくつかの事例では、遺伝子操作されたキット遺伝子は、キット遺伝子のエクソン６及び／またはエクソン７に少なくとも１つの変異を含む。いくつかの事例では、遺伝子操作されたＫＩＴ遺伝子のエクソン７における少なくとも１つの変異により、Ｈ３７８位に変異を有するポリペプチドがもたらされる。いくつかの事例では、Ｈ３７８位の変異は、Ｈ３７８ＲまたはＨ３７８ＳまたはＨ３７８ＰまたはＨ３７８ＡまたはＨ３７８ＦまたはＨ３７８ＫまたはＨ３７８ＧまたはＨ３７８ＬまたはＨ３７８Ｍである。いくつかの事例では、ＫＩＴのエクソン６における変異により、以下の変異のうちの１つ以上を有するコードされたポリペプチドがもたらされる：Ｆ３１６Ｓ、Ｍ３１８Ｖ、Ｉ３１９Ｋ、Ｖ３２３Ｉ、Ｉ３３４Ｖ、Ｅ３６０Ｋ、Ｐ３６３Ｖ、Ｅ３６６Ｄ。いくつかの事例では、キットにおけるエクソン７の変異は、Ｅ３７６Ｑ及びＨ３７８Ｒのうちの１つ以上において変異を有するポリペプチドをもたらす。遺伝子操作されたＫＩＴの例示的なアミノ酸配列は、上に示されている（配列番号６７～６８を参照されたい）。
【０１２４】
ＩＩ．細胞表面抗原に特異的な免疫療法剤
細胞表面抗原を発現する細胞（例えば、がん細胞）を標的とする細胞傷害性薬剤は、本明細書に記載されるように遺伝子操作された造血細胞と併用することができる。本明細書で使用される場合、「細胞傷害性薬剤」という用語は、特定の細胞表面抗原を発現する標的細胞（例えば、標的がん細胞）の細胞傷害性を直接的または間接的に誘導することができる任意の薬剤を指す。かかる細胞傷害性薬剤は、特定の細胞表面抗原のエピトープに結合し、それを標的とするタンパク質結合断片を含み得る。
【０１２５】
ｉ．治療用抗体／抗体－薬物コンジュゲート
いくつかの事例では、細胞傷害性薬剤には、治療用抗体が含まれ、これは薬物（例えば、抗がん薬）にコンジュゲートされて抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）を形成するこ

とができる。いくつかの実施形態では、薬剤は、抗体－薬物コンジュゲートである。いくつかの実施形態では、抗体－薬物コンジュゲートは、エピトープ結合断片及び標的細胞において細胞傷害性を誘導する毒素または薬物を含む。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、治療用抗ＦＬＴ３抗体は、抗ＦＬＴ３クローン４Ｇ８抗体である。いくつかの実施形態では、治療用抗ＣＤ１２３抗体は、クローン７Ｇ３抗体またはそのヒト化対応物ＣＳＬ３６２（「タラコツズマブ」）である。いくつかの実施形態では、治療用抗ＣＤ１２３抗体は、抗ＣＤ１２３クローン６Ｈ６抗体または抗ＣＤ１２３クローンＳ１８０１６Ｆ抗体である。いくつかの実施形態では、治療用抗ＫＩＴ抗体は、抗ＫＩＴクローンＦａｂ７９Ｄ抗体である。

【０１２７】

抗体－薬物コンジュゲートでの使用に適合する毒素または薬物は、当該技術分野で周知であり、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。一部の実施形態では、抗体－薬物コンジュゲートは、抗体及び薬物分子を結合させるリンカー（例えば、切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカーなどのペプチドリンカー）をさらに含み得る。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、グレンバツムマブベドチン／ＣＤＸ－０１１、デパツキシズマブマホドチン／ＡＢＴ－４１４、ＰＳＭＡ ＡＤＣ、ポラツズマブベドチン／ＲＧ７５９６／ＤＣＤＳ４５０１Ａ、デニンツズマブマホドチン／ＳＧＮ－ＣＤ１９Ａ、ＡＧＳ－１６Ｃ３Ｆ、ＣＤＸ－０１４、ＲＧ７８４１／ＤＬＹＥ５９５３Ａ、ＲＧ７８８２／ＤＭＵＣ４０６Ａ、ＲＧ７９８６／ＤＣＤＳ０７８０Ａ、ＳＧＮ－ＬＩＶ１Ａ、エンフォルツマブベドチン／ＡＳＧ－２２ＭＥ、ＡＧ－１５ＭＥ、ＡＧＳ６７Ｅ、テリソツズマブベドチン／ＡＢＢＶ－３９９、ＡＢＢＶ－２２１、ＡＢＢＶ－０８５、ＧＳＫ－２８５７９１６、チソツマブベドチン／ＨｕＭａｘ－ＴＦ－ＡＤＣ、ＨｕＭａｘ－Ａｘｌ－ＡＤＣ、ピナツズマブベドチン／ＲＧ７５９３／ＤＣＤＴ２９８０Ｓ、リファスツズマブベドチン／ＲＧ７５９９／ＤＮＩＢ０６００Ａ、インデュサツマブベドチン／ＭＬＮ－０２６４／ＴＡＫ－２６４、バンドルツズマブベドチン／ＲＧ７４５０／ＤＳＴＰ３０８６Ｓ、ソフィツズマブベドチン／ＲＧ７４５８／ＤＭＵＣ５７５４Ａ、ＲＧ７６００／ＤＭＯＴ４０３９Ａ、ＲＧ７３３６／ＤＥＤＮ６５２６Ａ、ＭＥ１５４７、ＰＦ－０６２６３５０７／ＡＤＣ５Ｔ４、トラスツズマブエムタンシン／Ｔ－ＤＭ１、ミルベツキシマブソラブタンシン／ＩＭＧＮ８５３、コルツキシマブラブタンシン／ＳＡＲ３４１９、ナラツキシマブエムタンシン／ＩＭＧＮ５２９、インダツキシマブラブタンシン／ＢＴ－０６２、アネツマブラブタンシン／ＢＡＹ９４－９３４３、ＳＡＲ４０８７０１、ＳＡＲ４２８９２６、ＡＭＧ２２４、ＰＣＡ０６２、ＨＫＴ２８８、ＬＹ３０７６２２６、ＳＡＲ５６６６５８、ロルボツズマブメルタンシン／ＩＭＧＮ９０１、カンツズマブメルタンシン／ＳＢ－４０８０７５、カンツズマブラブタンシン／ＩＭＧＮ２４２、ラプリツキシマブエムタンシン／ＩＭＧＮ２８９、ＩＭＧＮ３８８、ビバツズマブメルタンシン、ＡＶＥ９６３３、ＢＩＩＢ０１５、ＭＬＮ２７０４、ＡＭＧ１７２、ＡＭＧ５９５、ＬＯＰ６２８、バダスツキシマブタリリン／ＳＧＮ－ＣＤ３３Ａ、ＳＧＮ－ＣＤ７０Ａ、ＳＧＮ－ＣＤ１９Ｂ、ＳＧＮ－ＣＤ１２３Ａ、ＳＧＮ－ＣＤ３５２Ａ、ロバルピツズマブテシリン／ＳＣ１６ＬＤ６．５、ＳＣ－００２、ＳＣ－００３、ＡＤＣＴ－３０１／ＨｕＭａｘ－ＴＡＣ－ＰＢＤ、ＡＤＣＴ－４０２、ＭＥＤＩ３７２６／ＡＤＣ－４０１、ＩＭＧＮ７７９、ＩＭＧＮ６３２、ゲムツズマブオゾガマイシン、イノツズマブオゾガマイシン／ＣＭＣ－５４４、ＰＦ－０６６４７２６３、ＣＭＤ－１９３、ＣＭＢ－４０１、トラスツズマブデュオカルマジン／ＳＹＤ９８５、ＢＭＳ－９３６５６１／ＭＤＸ－１２０３、サシツズマブゴビテカン／ＩＭＭＵ－

１３２、ラベツズマブゴビテカン／ＩＭＭＵ－１３０、ＤＳ－８２０１ａ、Ｕ３－１４０２、ミラツズマブドキソルビシン／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、アプ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－薬物コンジュゲートは、ゲムツズマブオゾガマイシンである。

【０１２８】

一部の実施形態では、抗体－薬物コンジュゲートの細胞表面タンパク質のエピトープへの結合は、抗体－薬物コンジュゲートの内部移行を誘導し、薬物（または毒素）を細胞内で放出することができる。一部の実施形態では、抗体－薬物コンジュゲートの細胞表面タンパク質のエピトープへの結合は、毒素または薬物の内部移行を誘導し、これにより毒素または薬物は、細胞表面タンパク質を発現している細胞（標的細胞）を殺傷することができる。いくつかの実施形態では、抗体－薬物コンジュゲートの細胞表面タンパク質のエピトープへの結合は、毒素または薬物の内部移行を誘導し、これは、細胞表面タンパク質を発現する細胞（標的細胞）の活性を調節することができる。本明細書に記載の抗体－薬物コンジュゲートにおいて使用される毒素または薬物のタイプは、いずれの特定のタイプにも限定されない。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、細胞表面抗原の２つ以上（例えば、２、３、４、５つ以上）のエピトープが修飾されており、２つ以上（例えば、２、３、４、５つ以上）の異なる細胞傷害性薬剤（例えば、２つのＡＤＣ）が２つ以上のエピトープに対して標的化されることを可能にする。一部の実施形態では、ＡＤＣによって保有される毒素は、有効性（例えば、標的細胞の死）を増強するために相乗的に作用し得る。いくつかの実施形態では、２つ以上の（例えば、２、３、４、５つ以上）細胞表面タンパク質のエピトープが修飾されており、２つ以上（例えば、２、３、４、５つ以上）の異なる細胞傷害性薬剤（例えば、２つのＡＤＣ）が２つ以上の細胞表面抗原のエピトープを標的とすることを可能にする。いくつかの実施形態では、細胞表面抗原の１つ以上（例えば、１、２、３、４、５またはそれ以上）のエピトープが修飾されており、１つ以上（例えば、１、２、３、４、５またはそれ以上）が修飾されており、追加の細胞表面タンパク質のエピトープが修飾されており、２つ以上（例えば、２、３、４、５またはそれ以上）の異なる細胞傷害性薬剤（例えば、２つのＡＤＣ）が細胞表面抗原のエピトープに対して標的化されることを可能にする及び追加の細胞表面抗原のエピトープからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、複数の細胞表面抗原、または細胞表面抗原及び１つ以上の追加の細胞表面タンパク質／抗原の標的化により、造血器悪性腫瘍の再発を低減することができる。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、遺伝子操作された造血細胞の集団において変異している細胞表面抗原のエピトープを標的とするＡＤＣを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、遺伝子操作された造血細胞の集団において変異している細胞表面抗原のエピトープを標的とするＡＤＣと、１つ以上のさらなる細胞表面タンパク質を標的とし得る１つ以上のさらなる細胞傷害性薬剤と、を投与することを伴う。いくつかの実施形態では、薬剤は、複数の細胞表面タンパク質を標的化することによって有効性を増強するために相乗的に作用し得る。

【０１３１】

本明細書に記載のＡＤＣは、本明細書に記載の併用療法を受けた対象に対する後続処置として使用され得る。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象に、細胞表面抗原における非必須エピトープを欠く遺伝子操作された細胞の集団と、細胞表面抗原を発現する細胞を標

的とする１つ以上の免疫療法剤（例えば、ＡＤＣ）と、を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象に、１型細胞表面抗原における非必須エピトープを欠く遺伝子操作された細胞の集団と、細胞表面抗原を発現する細胞を標的とする１つ以上の免疫療法剤（例えば、ＡＤＣ）と、を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象に、２型細胞表面抗原における非必須エピトープを欠く遺伝子操作された細胞の集団と、細胞表面抗原を発現する細胞を標的とする１つ以上の免疫療法剤（例えば、ＡＤＣ）と、を投与することを含む。本明細書に記載の実施形態のいずれでも、例えば造血器悪性腫瘍が再発する場合、１種以上の追加の免疫療法剤が対象にさらに投与される（例えば１種以上の追加のエピトープ及び／または抗原を標的とする）ことができる。

【０１３３】

ｉｉ．キメラ抗原受容体を発現する免疫細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている、特定の細胞表面抗原のエピトープを標的とする細胞傷害性薬剤は、キメラ受容体を発現する免疫細胞であり、キメラ受容体は、細胞表面タンパク質のエピトープ（例えば、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、またはキット）に結合することができるエピトープ結合断片を含む。キメラ受容体のエピトープ結合断片による、その細胞表面に特定のタンパク質のエピトープを有する標的細胞（例えば、がん細胞）の認識は、活性化シグナルをシグナル伝達ドメイン（複数可）に伝達する（例えば、共刺激シグナル伝達キメラ受容体のドメイン及び／または細胞質シグナル伝達ドメイン）に見出すことができ、これは、キメラ受容体を発現する免疫細胞におけるエフェクター機能を活性化し得る。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、二重特異性または多重特異性免疫細胞と呼ばれる、複数のキメラ受容体（例えば、２、３、４、５つまたはそれ以上）を発現する。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、複数のキメラ受容体を発現し、そのうちの少なくとも１つは、細胞表面抗原のエピトープを標的とする。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、複数のキメラ受容体を発現し、その各々は、細胞表面抗原のエピトープを標的とする。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、複数のキメラ受容体を発現しており、その少なくとも１つは、細胞表面抗原のエピトープを標的とし、これらのうちの少なくとも１つは、追加の細胞表面抗原のエピトープを標的とする。いくつかの実施形態では、複数の細胞表面タンパク質、または細胞表面タンパク質及び１つ以上の追加の細胞表面タンパク質の標的化により、造血器悪性腫瘍の再発を低減することができる。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、二重特異性キメラ受容体と呼ばれる、複数のエピトープ（例えば、１つの抗原の複数のエピトープ、または複数の抗原のエピトープ）を標的とするキメラ受容体を発現する。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、２つ以上の系統特異的細胞表面タンパク質のエピトープが細胞傷害性薬剤によって標的化される。いくつかの実施形態では、２つ以上のキメラ受容体、例えば、二重特異性キメラ受容体が同じ免疫細胞で発現される。かかる細胞は、本明細書に記載の方法のいずれにおいても使用され得る。いくつかの実施形態では、キメラ受容体を発現する細胞は「プール」され、すなわち、２つ以上の細胞群は、２つ以上の異なるキメラ受容体を発現する。いくつかの実施形態では、異なるキメラ抗原受容体を発現する２つ以上の細胞は、同時に投与される。いくつかの実施形態では、異なるキメラ抗原受容体を発現する２つ以上の細胞は、順次投与される。いくつかの実施形態では、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及び／またはキットのエピトープは、細胞傷害性薬剤によって標的化される。いくつかの実施形態では、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及び／またはＫＩＴを標的とするキメラ受容体は、同じ免疫細胞で発現される（すなわち、二重特異性免疫細胞）。かかる細胞は、本明細書に記載の方法のいずれにおいても使用され得る。いくつかの実施形態では、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及び／またはＫＩＴを標的とするキメラ受容体を発現する細胞は、「プール」され、すなわち、２つ以上の細胞群が、２つ以上の異なるキメラ受容体を

発現する。いくつかの実施形態では、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及び／またはキットを標的とするキメラ受容体を発現している２つ以上の細胞群が同時に投与される。いくつかの実施形態では、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及び／またはＫＩＴを標的とするキメラ受容体を発現する２つ以上の細胞群が順次投与される。

【０１３６】

本明細書で使用される場合、キメラ受容体とは、宿主細胞の表面で発現され得る非天然起源の分子を指し、キメラ受容体の特異性を提供する結合ドメインを含む（例えば、細胞表面系統特異的タンパク質）によってモニタリングされる。一般に、キメラ受容体は、異なる分子に由来する少なくとも２つのドメインを含む。本明細書に記載のエピトープ結合断片に加えて、キメラ受容体は、以下のうちの１つ以上をさらに含み得る：ヒンジドメイン（例えば、ＣＤ２８ヒンジ、ＩｇＧ４ヒンジ、またはＣＤ８αヒンジ）、膜貫通ドメイン（例えば、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ８α　ＴＭ、４－１ＢＢ　ＴＭ）、共刺激ドメイン（例えば、ＣＤ２８ｚ、４－１ＢＢ、ＩＣＯＳ、ＯＸ４０）、細胞質シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ３ｚ）、及びそれらの組み合わせ。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のキメラ受容体は、１つ以上のヒンジドメイン（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、エピトープ結合断片と膜貫通ドメインとの間に位置し得る。ヒンジドメインは、一般に、タンパク質の２つのドメインの間に見出されるアミノ酸セグメントであり、タンパク質の柔軟性及びドメインの一方または両方の互いに対する移動を可能にし得る。キメラ受容体の別のドメインと比較して、エピトープ結合断片のかかる柔軟性及び移動性を提供する任意のアミノ酸配列が使用され得る。

【０１３８】

ヒンジドメインは、約１０～２００個のアミノ酸、例えば、約１５～１５０個のアミノ酸、２０～１００個のアミノ酸、または３０～６０個のアミノ酸のうちのいずれか１つを含有し得る。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、少なくとも約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０または２００アミノ酸長のうちのいずれか１つであり得る。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、天然に存在するタンパク質のヒンジドメインである。ヒンジドメインを含む、当該技術分野で既知の任意のタンパク質のヒンジドメインが、本明細書に記載のキメラ受容体での使用に適合する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、天然に存在するタンパク質のヒンジドメインの少なくとも一部であり、キメラ受容体に柔軟性を付与する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ＣＤ８αまたはＣＤ２８に由来する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、ＣＤ８αのヒンジドメインの一部、例えば、少なくとも１５個（例えば、２０、２５、３０、３５、または４０個）の連続アミノ酸を含有するＣＤ８αまたはＣＤ２８のヒンジドメインの断片である。

【０１４０】

ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、またはＩｇＤ抗体などの抗体のヒンジドメインは、本明細書に記載のキメラ受容体での使用にも適合性がある。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、抗体の定常ドメインＣＨ１及びＣＨ２を結合するヒンジドメインである。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、抗体のものであり、抗体のヒンジドメイン及び抗体の１つ以上の定常領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、抗体のヒンジドメイン及び抗体のＣＨ３定常領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、抗体のヒンジドメイン及び抗体のＣＨ２及びＣＨ３定常領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、またはＩｇＤ抗体であ

る。いくつかの実施形態では、抗体は、ＩｇＧ抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４抗体である。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、ＩｇＧ１抗体のヒンジ領域及びＣＨ２及びＣＨ３定常領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、ＩｇＧ１抗体のヒンジ領域及びＣＨ３定常領域を含む。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のキメラ受容体は、１つ以上の膜貫通ドメイン（複数可）を含む。キメラ受容体で使用するための膜貫通ドメインは、当該技術分野で既知の任意の形態であり得る。本明細書で使用される場合、「膜貫通ドメイン」とは、細胞膜、好ましくは真核細胞膜において熱力学的に安定である任意のタンパク質構造を指す。本明細書に記載のキメラ受容体での使用に適合性のある膜貫通ドメインは、天然に存在するタンパク質から得られ得る。あるいは、それは、合成の天然に存在しないタンパク質セグメント、例えば、細胞膜内で熱力学的に安定している疎水性タンパク質セグメントであり得る。

【０１４２】

さらに、膜貫通ドメインは、加えて、または代替的に、膜貫通ドメインが膜を通過する回数及びタンパク質の配向を含む膜貫通ドメイントポロジーに基づいて分類され得る。例えば、シングルパス膜タンパク質は、細胞膜を１回横断し、マルチパス膜タンパク質は、細胞膜を少なくとも２回（例えば、２、３、４、５、６、７回、またはそれ以上）横断する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、シングルパス膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、キメラ受容体のＮ末端を細胞の細胞外側に配向させ、キメラ受容体のＣ末端を細胞の細胞内側に配向させるシングルパス膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、シングルパス膜タンパク質から得られる。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、ＣＤ２８または４－１ＢＢまたはＣＤ８αに由来する。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のキメラ受容体は、１つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。本明細書で使用される「共刺激シグナル伝達ドメイン」という用語は、細胞内のシグナル形質導入を媒介してエフェクター機能などの免疫応答を誘導するタンパク質の少なくとも一部を指す。本明細書に記載のキメラ受容体の共刺激シグナル伝達ドメインは、共刺激タンパク質由来の細胞質シグナル伝達ドメインであり得、これは、シグナルを伝達し、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、マクロファージ、好中球、または好酸球などの免疫細胞によって媒介される応答を調節する。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、複数（少なくとも２、３、４つまたはそれ以上）の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、異なる共刺激タンパク質から得られる複数の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、キメラ受容体は、共刺激シグナル伝達ドメインを含まない。

【０１４５】

多くの免疫エフェクター細胞は、細胞増殖、分化、及び生存を促進し、細胞のエフェクター機能を活性化するために、抗原特異的シグナルの刺激に加えて共刺激を必要とする。宿主細胞（例えば、免疫細胞）における共刺激シグナル伝達ドメインの活性化は、細胞を誘導して、サイトカインの産生及び分泌、食作用、増殖、分化、生存、及び／または細胞傷害性を増加または減少させ得る。任意の共刺激分子の共刺激シグナル伝達ドメインは、本明細書に記載のキメラ受容体での使用に適合性があり得る。共刺激シグナル伝達ドメインのタイプ（複数可）は、キメラ受容体が発現されるであろう免疫細胞のタイプ（例えば、一次Ｔ細胞、Ｔ細胞株、ＮＫ細胞株）、及び所望の免疫エフェクター機能（例えば、細胞傷害性）などの因子に基づいて選択される。キメラ受容体で使用するための共刺激シグナル伝達ドメインの例は、限定されないが、ＣＤ２７、ＣＤ２８ζ（ＣＤ２８ｚ）、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＩＣＯＳ、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ

７－Ｈ３を含む、共刺激タンパク質の細胞質シグナル伝達ドメインであり得る。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のキメラ受容体は、１つ以上の細胞質シグナル伝達ドメイン（複数可）を含む。任意の細胞質シグナル伝達ドメインが、本明細書に記載のキメラ受容体において使用され得る。一般に、細胞質シグナル伝達ドメインは、細胞外リガンド結合ドメインとそのリガンドとの相互作用などのシグナルを中継して、細胞のエフェクター機能（例えば、細胞傷害性）を誘導するなどの細胞応答を刺激する。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、ＣＤ３ζ（ＣＤ３ｚ）に由来する。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、ＦＬＴ３＋ＣＤ１２３、キット、ＦＬＴ３＋キット、またはキット＋ＣＤ１２３を標的とするキメラ受容体構築物が本明細書で提供される。構築物は、さらに、少なくともヒンジドメイン（例えば、ＣＤ２８、ＣＤ８α、または抗体由来）、膜貫通ドメイン（例えば、ＣＤ２８由来）、１つ以上の共刺激ドメイン（ＣＤ２８ｚのうちの１つ以上由来）、細胞質シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ３ｚ由来）、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施例では、本明細書に記載の方法は、対象に、遺伝子操作された造血細胞の集団（変異体ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、ＦＬＴ３＋ＣＤ１２３、ＫＩＴ、ＦＬＴ３＋ＫＩＴ、またはＣＤ１２３＋ＫＩＴを有するように操作された）と、それぞれＦＬＴ３、ＣＤ１２３、ＦＬＴ３＋ＣＤ１２３、ＫＩＴ、ＦＬＴ３＋ＫＩＴ、またはＣＤ１２３＋ＫＩＴを標的とするキメラ受容体を発現する免疫細胞の集団（これらは、少なくともヒンジドメイン（例えば、ＣＤ２８、ＣＤ８α、または抗体由来）、膜貫通ドメイン（例えば、ＣＤ２８由来）、１つ以上の共刺激ドメイン（ＣＤ２８ｚのうちの１つ以上に由来）、及び細胞質シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ３ｚ由来）、またはそれらの組み合わせをさらに含む）と、を投与することを含む。いくつかの実施形態では、投与された免疫療法製品は、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、及び／またはＫＩＴを標的とする個々のキメラ受容体を発現する免疫細胞の組み合わせである。

【０１４８】

本明細書に記載のキメラ受容体のいずれも、組換え技術などの日常的な方法によって調製され得る。本明細書におけるキメラ受容体を調製する方法は、エピトープ結合断片及び任意選択でヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、少なくとも１つの共刺激シグナル伝達を含めたキメラ受容体のドメインの各々を含むポリペプチドをコードする核酸の生成を含む。ドメイン、及び細胞質シグナル伝達ドメインからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、キメラ受容体の構成要素をコードする核酸を、組換え技術を使用して連結する。

【０１４９】

さらに、キメラ受容体のいずれも、免疫細胞で発現させ、定型的な方法で対象（例えば、ヒト対象）に投与することができる。例えば、Ｔ細胞は、対象自身の血液中のＴ細胞に由来するもの（自家）、または別の健康なドナーのＴ細胞に由来するもの（同種異系）のいずれかであり得る。これらのＴ細胞は、対象から単離されたら、特定のＣＡＲを発現するように遺伝子操作され、腫瘍の表面に存在する抗原を標的とするようにプログラムされる。次いで、慣例によりＣＡＲ－Ｔ細胞が対象に注入される。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、ＣＡＲは、配列番号６９、７１、７３、７５、７７、７９、８６、または８７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であり、ＣＡＲが、そのそれぞれの細胞表面系統特異的タンパク質（例えば、ＫＩＴ、ＣＤ１２３、ＦＬＴ３、またはそれらの組み合わせ）に結合する能力を保持する。

【０１５１】

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は、ＫＩＴであり、エピトープ結合断片は、以下のＣＤＲ配列：ＧＦＮＩＳＶＹＭＭＨ（配列番号８８）、ＳＩＹＰＹ

ＳＧＹＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号８９）、ＡＲＹＶＹＨＡＬＤＹ（配列番号９０）、ＲＡＳＱＲＧＬＲＮＶＡＶＡ（配列番号９１）、ＳＡＳＳＬＹＳ（配列番号９２）、及びＱＱＷＡＶＨＳＬＩＴ（配列番号９３）を含む。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、ＧＦＮＩＳＶＹＭＭＨＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＳＩＹＰＹＳＧＹＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＹＶＹＨＡＬＤＹ（配列番号９４）と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含み、エピトープ結合断片は、そのそれぞれのＫＩＴエピトープに結合する能力を保持している。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、ＲＡＳＱＲＧＬＲＮＶＡＶＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＳＡＳＳＬＹＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＲＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＷＡＶＨＳＬＩＴ（配列番号９５）と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含み、エピトープ結合断片は、そのそれぞれのＫＩＴエピトープに結合する能力を保持している。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、配列番号９４と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列、及び配列番号９５と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エピトープ結合断片は、配列番号９４及び９５の両方を含む。

【０１５２】

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はＦＬＴ３であり、エピトープ結合断片は、以下のＣＤＲ配列：ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＨ（配列番号９６）、ＥＩＤＰＳＤＳＹＫＤＹＮＱＫＦＫ（配列番号９７）、ＲＡＩＴＴＴＰＦＤＦ（配列番号９８）、ＲＡＳＱＳＩＳＮＮＬＨ（配列番号９９）、ＹＡＳＱＳＩＳ（配列番号１００）、及びＱＱＳＮＴＷＰＹＴ（配列番号１０１）を含む。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＨＷＶＲＱＲＰＧＨＧＬＥＷＩＧＥＩＤＰＳＤＳＹＫＤＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＶＤＲＳＳＮＴＡＹＭＨＬＳＳＬＴＳＤＤＳＡＶＹＹＣＡＲＡＩＴＴＴＰＦＤＦ（配列番号１０２）と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含み、エピトープ結合断片は、そのそれぞれのＦＬＴ３エピトープに結合する能力を保持している。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、ＲＡＳＱＳＩＳＮＮＬＨＷＹＱＱＫＳＨＥＳＰＲＬＬＩＫＹＡＳＱＳＩＳＧＩＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＳＩＮＳＶＥＴＥＤＦＧＶＹＦＣＱＱＳＮＴＷＰＹＴ（配列番号１０３）と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含み、エピトープ結合断片は、そのそれぞれのＦＬＴ３エピトープに結合する能力を保持している。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、配列番号１０２と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列、及び配列番号１０３と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エピトープ結合断片は、配列番号１０２及び１０３の両方を含む。

【０１５３】

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はＣＤ１２３であり、エピトープ結合断片は、以下のＣＤＲ配列：ＧＹＳＦＴＤＹＹＭＫ（配列番号１０４）、ＤＩＩＰＳＮＧＡＴＦＹＮＱＫＦＫＧ（配列番号１０５）、ＡＲＳＨＬＬＲＡＳＷＦＡＹ（配列番号１０６）、ＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴ（配列番号１０７）、ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号１０８）、及びＱＮＤＹＳＹＰＹＴ（配列番号１０９）を含む。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、ＧＹＳＦＴＤＹＹＭＫＷＡＲＱＭＰＧＫＧＬＥＷＭＧＤＩＩＰＳＮＧＡＴＦＹＮＱＫＦＫＧＱＶＴＩＳＡＤＫＳＩＳＴＴＹＬＱＷＳＳＬＫＡＳＤＴ

ＡＭＹＹＣＡＲＳＨＬＬＲＡＳＷＦＡＹ（配列番号１１０）と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含み、エピトープ結合断片は、そのそれぞれのＣＤ１２３エピトープに結合する能力を保持している。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、ＥＳＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＰＬＩＹＷＡＳＴＲＥＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＡＥＤＶＡＶＹＹＣＱＮＤＹＳＹＰＹＴ（配列番号１１１）と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含み、エピトープ結合断片は、そのそれぞれのＣＤ１２３エピトープに結合する能力を保持している。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、配列番号１１０と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列、及び配列番号１１１と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エピトープ結合断片は、配列番号１１０及び１１１の両方を含む。

【０１５４】

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は、ＦＬＴ３及びＣＤ１２３であり、エピトープ結合断片は、以下のＣＤＲ配列：ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＨ（配列番号９６）、ＥＩＤＰＳＤＳＹＫＤＹＮＱＫＦＫ（配列番号９７）、ＲＡＩＴＴＴＰＦＤＦ（配列番号９８）、ＲＡＳＱＳＩＳＮＮＬＨ（配列番号９９）、ＹＡＳＱＳＩＳ（配列番号１００）、ＱＱＳＮＴＷＰＹＴ（配列番号１０１）、ＧＹＳＦＴＤＹＹＭＫ（配列番号１０４）、ＤＩＩＰＳＮＧＡＴＦＹＮＱＫＦＫＧ（配列番号１０５）、ＡＲＳＨＬＬＲＡＳＷＦＡＹ（配列番号１０６）、ＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴ（配列番号１０７）、ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号１０８）、及びＱＮＤＹＳＹＰＹＴ（配列番号１０９）を含む。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、ＧＹＴＦＴＳＹＷＭＨＷＶＲＱＲＰＧＨＧＬＥＷＩＧＥＩＤＰＳＤＳＹＫＤＹＮＱＫＦＫＤＫＡＴＬＴＶＤＲＳＳＮＴＡＹＭＨＬＳＳＬＴＳＤＤＳＡＶＹＹＣＡＲＡＩＴＴＴＰＦＤＦ（配列番号１０２）と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含み、エピトープ結合断片は、そのそれぞれのＦＬＴ３エピトープに結合する能力を保持している。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、ＲＡＳＱＳＩＳＮＮＬＨＷＹＱＱＫＳＨＥＳＰＲＬＬＩＫＹＡＳＱＳＩＳＧＩＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＳＩＮＳＶＥＴＥＤＦＧＶＹＦＣＱＱＳＮＴＷＰＹＴ（配列番号１０３）と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含み、エピトープ結合断片は、そのそれぞれのＦＬＴ３エピトープに結合する能力を保持している。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、ＧＹＳＦＴＤＹＹＭＫＷＡＲＱＭＰＧＫＧＬＥＷＭＧＤＩＩＰＳＮＧＡＴＦＹＮＱＫＦＫＧＱＶＴＩＳＡＤＫＳＩＳＴＴＹＬＱＷＳＳＬＫＡＳＤＴＡＭＹＹＣＡＲＳＨＬＬＲＡＳＷＦＡＹ（配列番号１１０）と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含み、エピトープ結合断片は、そのそれぞれのＣＤ１２３エピトープに結合する能力を保持している。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、ＥＳＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＰＬＩＹＷＡＳＴＲＥＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＡＥＤＶＡＶＹＹＣＱＮＤＹＳＹＰＹＴ（配列番号１１１）と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含み、エピトープ結合断片は、そのそれぞれのＣＤ１２３エピトープに結合する能力を保持している。いくつかの事例では、エピトープ結合断片は、配列番号１０２と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列、配列番号１０３と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９

６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列、配列番号１１０と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列、及び配列番号１１１と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エピトープ結合断片は、配列番号１０２、１０３、１１０、及び１１１の４つ全てを含む。

【０１５５】

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はＣＤ１２３であり、エピトープ結合断片は、以下のＣＤＲ配列：ＤＩＩＰＳＮＧＡＴＦＹＮＱＫＦＫＧ（配列番号１０５）、ＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴ（配列番号１０７）、ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号１０８）、及びＱＮＤＹＳＹＰＹＴ（配列番号１０９）を含む。

【０１５６】

例示的なＣＡＲ配列を以下で提供する：

配列番号６９－ＫＩＴドメイン４を標的とするＦａｂ７９Ｄ－ＣＡＲ（ＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）アミノ酸配列、バリアントＩ（エピトープ結合領域は斜体、ＣＤＲは太字）

【化３４】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFNISVYMMH***WV

*RQAPGKGLEWVA****SIYPYSGYTYYADSVKG****RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC*

ARYVYHALDYWGQGTLVTVSSGSTSGSGKPGSSEGSTKGDIQMTQSPSSLSASVGDRVT

ITC***RASQRGLRNVAVA****WYQQKPGKAPKLLIY****SASSLYS****GVPSRFSGSRSGTDFTLTISS*

*LQPEDFATYYC****QQWAVHSLIT***FGQGTKVEIKRAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGK

HLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPR

RPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD

KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST

ATKDTYDALHMQALPPR

【０１５７】

配列番号７０－ＫＩＴドメイン４を標的とするＦａｂ７９Ｄ－ＣＡＲ（ＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）ヌクレオチド配列、バリアントＩ

【化３５】

ATGCTTCTCCTGGTTACGTCACTGCTCTTGTGCGAGCTGCCTCACCCTGCGTTTTTGTT
GATCCCAGAAGTACAGCTTGTCGAGTCCGGCGGCGGACTCGTGCAGCCTGGCGGCTCCC
TTCGCCTCTCCTGCGCTGCCAGTGGATTCAACATCTCTGTCTATATGATGCATTGGGTG
CGGCAAGCACCGGGCAAAGGCTTGGAGTGGGTGGCCTCTATTTATCCGTATTCTGGCTA
TACGTATTATGCGGATAGCGTTAAAGGGCGGTTCACCATATCCGCAGACACCTCTAAGA
ATACAGCTTATTTGCAGATGAACAGTTTGCGAGCGGAAGACACGGCCGTTTATTATTGC
GCCCGATACGTATATCATGCCCTCGACTATTGGGGTCAGGGAACACTCGTCACCGTCTC
ATCTGGGTCAACCAGTGGGTCTGGTAAACCCGGCTCAAGCGAGGGCAGTACCAAAGGAG
ACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCTCATTGTCAGCATCCGTCGGGGACAGAGTAACC
ATAACCTGCCGGGCCAGTCAGCGCGGCCTCCGGAACGTAGCAGTGGCATGGTATCAACA
AAAACCTGGCAAGGCCCCAAAACTCCTTATATATTCAGCTTCTTCCCTTTATTCTGGCG
TGCCCTCCAGGTTCTCCGGGTCACGATCCGGTACCGATTTCACCCTGACTATCAGTTCT
CTCCAGCCCGAAGACTTTGCAACGTACTACTGCCAACAATGGGCAGTTCACAGTCTTAT
AACATTTGGGCAGGGGACGAAAGTCGAGATCAAACGAGCCGCCATAGAAGTAATGTACC
CACCACCGTACCTGGATAACGAGAAAAGTAACGGTACTATCATACATGTTAAAGGTAAA
CACCTTTGCCCATCCCCACTCTTCCCTGGACCTTCGAAACCGTTCTGGGTTTTGGTGGT
GGTAGGTGGTGTCCTTGCTTGTTATTCCCTGCTGGTCACCGTTGCGTTTATCATCTTCT
GGGTTCGCAGCAAGAGGTCACGTGGTGGGCACTCCGACTACATGAACATGACGCCCCGA
CGCCCAGGTCCTACGAGAAAGCATTACCAACCGTACGCTCCACCCCGCGACTTTGCTGC
CTACCGGTCCAGAGTAAAATTCAGTCGGTCTGCTGATGCCCCTGCTTACCAACAGGGCC
AGAATCAGCTCTACAATGAGCTTAATCTGGGACGACGAGAGGAATATGACGTTTTGGAC
AAGCGAAGGGGCCGAGACCCTGAGATGGGCGGTAAACCGCGGAGAAAGAACCCCCAGGA
GGGGTTGTATAATGAATTGCAAAAGGACAAAATGGCGGAGGCGTATTCCGAAATAGGGA
TGAAGGGTGAAAGGCGGCGAGGCAAGGGACATGATGGTCTCTACCAAGGGCTGTCTACT
GCCACGAAGGACACCTATGATGCGCTTCATATGCAGGCCTTGCCTCCGCGA

【０１５８】

配列番号７１－ＫＩＴドメイン４を標的とするＦａｂ７９Ｄ－ＣＡＲ（ＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）アミノ酸配列、バリアントＩＩ（エピトープ結合領域は斜体、ＣＤＲは太字）

【化３６】

MLRLLLALNLFPSIQVTGGSSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***RASQRGLRNVAVA***WY
*QQKPGKAPKLLIY****SASSLYS****GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC****QQWAVHS*
LITFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFN***
ISVYMMHWVRQAPGKGLEWVA***SIYPYSGYTYYADSVKG***RFTISADTSKNTAYLQMNSLR
*AEDTAVYYC****ARYVYHALDY***WGQGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP
SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGP
TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD
TYDALHMQALPPR

【０１５９】

配列番号７２－ＫＩＴドメイン４を標的とするＦａｂ７９Ｄ－ＣＡＲ（ＣＤ２８ヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）ヌクレオチド配列、バリアントＩＩ

【化３７－１】

ATGCTTCGCCTCTTGCTGGCATTGAATCTTTTTCCGAGTATTCAGGTTACAGGAGGCTC
CTCAGACATCCAGATGACCCAATCCCCCTCATCTCTTTCTGCGTCTGTTGGAGACCGAG
TAACGATTACTTGCCGGGCAAGCCAAAGGGGACTCCGCAATGTGGCTGTCGCTTGGTAT
CAACAGAAGCCAGGTAAGGCACCAAAACTTTTGATCTACTCTGCTTCTTCCCTTTACTC
AGGTGTACCGAGCCGCTTCAGTGGCTCCCGGTCCGGAACGGACTTCACTTTGACGATAA
GTTCACTGCAGCCGGAAGACTTCGCCACATATTACTGCCAGCAATGGGCGGTCCACAGC
TTGATTACATTCGGACAAGGAACAAAGGTGGAAATAAAGGGCAGCACGAGTGGTAGCGG
CAAGCCTGGGTCAGGGGAGGGTTCAACGAAAGGGGAGGTCCAACTGGTCGAGTCAGGGG
GCGGACTTGTTCAGCCGGGTGGGAGCCTCCGACTGAGTTGCGCGGCATCCGGTTTTAAT

【化３７－２】

ATCTCAGTCTATATGATGCACTGGGTTAGACAAGCACCCGGCAAGGGTTTGGAATGGGT
AGCGTCAATATACCCCTATTCTGGCTACACCTATTACGCAGACTCTGTCAAAGGCAGGT
TTACAATCAGCGCGGACACCAGCAAAAACACCGCGTATCTCCAAATGAACAGCCTGCGG
GCAGAGGACACCGCTGTCTACTACTGCGCACGCTATGTCTACCACGCTTTGGATTATTG
GGGTCAAGGGACGCTGGTCACCGTATCAAGCATCGAGGTAATGTATCCTCCTCCCTATT
TGGATAACGAGAAGTCTAACGGAACTATTATTCACGTAAAGGGTAAACATCTCTGCCCC
AGCCCTTTGTTTCCGGGACCTTCAAAACCTTTTTGGGTTCTGGTGGTGGTTGGGGGAGT
CTTGGCGTGTTATTCCCTTCTCGTGACGGTGGCGTTCATAATATTCTGGGTCCGGAGCA
AAAGATCACGTGGCGGTCACTCAGATTACATGAATATGACGCCGAGGAGGCCGGGTCCT
ACCCGAAAGCATTATCAACCTTACGCACCACCGCGCGACTTCGCAGCTTACCGGTCCAG
GGTGAAGTTTAGCAGAAGTGCTGACGCCCCAGCCTACCAACAGGGCCAAAATCAACTGT
ACAACGAGCTGAACCTGGGACGAAGAGAGGAATACGACGTCCTGGACAAGAGGAGGGGG
CGCGACCCCGAGATGGGGGGGAAGCCGAGGCGCAAGAACCCCCAGGAGGGTCTTTATAA
TGAACTGCAGAAGGATAAGATGGCCGAAGCCTATTCTGAAATCGGAATGAAGGGTGAGC
GGCGCAGAGGTAAAGGGCACGACGGCCTCTATCAGGGACTTTCTACGGCAACGAAAGAT
ACGTATGACGCACTTCATATGCAAGCCCTTCCGCCCAGA

【０１６０】

配列番号７３－ＦＬＴ３ドメイン４を標的とする４Ｇ８－ＣＡＲ（ＩｇＧ４ヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）アミノ酸配列（エピトープ結合領域は斜体、ＣＤＲは太字）。

【化３８】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSS***GYTFTSYWMH***WV
*RQRPGHGLEWIG****EIDPSDSYKDYNQKFK****DKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYC*
*A****RAITTTPFDF***WGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPATLSVTPGDSVSLS
C***RASQSISNNLH****WYQQKSHESPRLLIK****YASQSIS****GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETE*
*DFGVYFC****QQSNTWPYT***FGGGTKLEIKRESKYGPPCPPCPASMFWVLVVVGGVLACYSLL
VTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【０１６１】

配列番号７４－ＦＬＴ３ドメイン４を標的とする４Ｇ８－ＣＡＲ（ＩｇＧ４ヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）ヌクレオチド配列

【化３９】

ATGCTCTTGTTGGTGACGAGTCTCCTGCTGTGTGAACTGCCGCACCCAGCATTTCTTTT
GATTCCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAACTCGTGAAACCTGGCGCCTCTC
TGAAGCTGAGCTGCAAGAGCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTG
CGCCAGAGGCCTGGCCACGGACTGGAATGGATCGGCGAGATCGACCCCAGCGACAGCTA
CAAGGACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAGAAGCAGCA
ACACCGCCTACATGCACCTGTCCAGCCTGACCAGCGACGACAGCGCCGTGTACTACTGT
GCCAGAGCCATCACAACCACCCCCTTCGATTTCTGGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGT
GTCTAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGTGGGGGAGGATCTGGGGGAGGCGGAAGCGATATTG
TGCTGACCCAGAGCCCTGCCACACTGAGCGTGACACCAGGCGATAGCGTGTCCCTGTCC
TGCAGAGCCAGCCAGAGCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGTCCCACGA
GAGCCCCAGACTGCTGATTAAGTACGCCAGCCAGTCCATCAGCGGCATCCCCAGCAGAT
TTTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAGCATCAACAGCGTGGAAACCGAG
GACTTCGGCGTGTACTTCTGCCAGCAGAGCAACACCTGGCCTTACACCTTCGGCGGAGG
CACCAAGCTGGAAATCAAGAGAGAGTCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCTG
CTAGCATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTG
GTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTCCGCAGCAAGCGGAGCAGAGGCGGCCACAG
CGACTACATGAACATGACCCCTAGACGGCCTGGCCCCACCAGAAAGCACTACCAGCCCT
ACGCCCCTCCCCGGGACTTTGCCGCCTACAGAAGCCGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCC
GACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAG
AAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCA
AGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATG
GCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAACGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGA
CGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGC
AGGCCCTGCCCCCAAGG

【０１６２】

配列番号７５－ＣＤ１２３のＮ末端ドメインを標的とするＣＳＬ３６２－ＣＡＲ（ＣＤ８ａヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）アミノ酸配列（エピトープ結合領域は斜体、ＣＤＲは太字）

【化４０】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS***GYSFTDYYMK***WA

*RQMPGKGLEWMG****DIIPSNGATFYNQKFKG****QVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC*

ARSHLLRASWFAYWGQGTMVTVSSGSTSGSGKPGSSEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGE

RATINC*ES****SQSLLNSGNQKNYLT****WYQQKPGQPPKPLIY****WASTRES****GVPDRFSGSGSGTD*

*FTLTISSLQAEDVAVYYC****QNDYSYPYT***FGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL

RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRCKRSRGG

HSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL

GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG

HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【０１６３】

配列番号７６－ＣＤ１２３のＮ末端ドメインを標的とするＣＳＬ３６２－ＣＡＲ（ＣＤ８ａヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）ヌクレオチド配列

【化４１－１】

ATGCTTCTCCTGGTTACCTCCTTGCTGTTGTGTGAGCTGCCTCATCCAGCATTTCTCTT

GATACCAGAGGTTCAGCTCGTACAGAGCGGGGCCGAGGTGAAAAAACCCGGCGAGTCTT

TGAAAATATCATGCAAAGGCAGTGGCTATTCCTTTACGGATTACTACATGAAGTGGGCG

AGGCAGATGCCAGGGAAGGGACTCGAATGGATGGGAGACATCATACCGAGCAATGGTGC

GACCTTCTATAACCAAAAATTCAAAGGGCAGGTCACTATTTCCGCTGACAAAAGCATCA

GTACAACGTACTTGCAATGGTCTTCTCTTAAAGCCTCCGACACTGCGATGTACTATTGT

GCGAGATCACATCTCCTGAGAGCGAGTTGGTTCGCCTACTGGGGCCAAGGAACCATGGT

CACGGTCTCAAGTGGCAGCACCTCCGGTTCTGGAAAGCCGGGATCCTCAGAAGGCAGTA

CAAAAGGTGATATTGTCATGACCCAATCCCCCGATAGTCTGGCTGTATCTCTCGGTGAA

AGGGCCACGATAAACTGTGAGTCCTCACAATCCCTTCTGAACTCAGGGAATCAAAAGAA

CTATCTTACTTGGTATCAGCAAAAACCTGGACAACCTCCGAAGCCACTCATATACTGGG

CCTCCACCAGGGAAAGTGGAGTCCCAGACCGATTCTCAGGATCCGGTTCCGGGACCGAC

TTCACGCTCACCATTAGTAGCCTTCAAGCAGAGGATGTAGCAGTGTACTATTGTCAAAA

TGATTATAGTTACCCTTACACCTTCGGGCAAGGCACGAAACTGGAAATCAAAACCACGA

【化４１－２】

CCCCGGCTCCACGACCTCCCACCCCCGCCCCCACAATAGCGAGCCAACCACTTAGTTTG
AGACCGGAAGCTTGCCGGCCTGCCGCGGGTGGTGCTGTTCATACAAGAGGCCTGGACTT
CGCTTGCGATATATACATCTGGGCGCCACTCGCCGGCACGTGTGGTGTCCTTCTTCTCT
CTCTGGTAATTACACTCTATTGTAACCATAGAAACCGGTGTAAAAGAAGCCGAGGCGGT
CACAGTGACTATATGAATATGACACCGCGCCGACCCGGACCAACAAGAAAACATTATCA
ACCGTACGCTCCACCCCGCGACTTTGCTGCCTACCGGTCCAGAGTAAAATTCAGTCGGT
CTGCTGATGCCCCTGCTTACCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAATGAGCTTAATCTG
GGACGACGAGAGGAATATGACGTTTTGGACAAGCGAAGGGGCCGAGACCCTGAGATGGG
CGGTAAACCGCGGAGAAAGAACCCCCAGGAGGGGTTGTATAATGAATTGCAAAAGGACA
AAATGGCGGAGGCGTATTCCGAAATAGGGATGAAGGGTGAAAGGCGGCGAGGCAAGGGA
CATGATGGTCTCTACCAAGGGCTGTCTACTGCCACGAAGGACACCTATGATGCGCTTCA
TATGCAGGCCTTGCCTCCGCGA

【０１６４】

配列番号７７－ＦＬＴ３及びＣＤ１２３の両方を標的とする４Ｇ８－ＣＳＬ３６２－二重特異性ＣＡＲ（ＣＤ８ａヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）アミノ酸配列、バリアントＩ（エピトープ結合領域は斜体、ＣＤＲは太字）

【化４２】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSS***GYTFTSYWMH***WV
*RQRPGHGLEWIG****EIDPSDSYKDYNQKFK****DKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYC*
*A****RAITTTPFDF***WGQGTTLTVSSGSTSGSGKPGSSEGSTKGDIVLTQSPATLSVTPGDSV
SLSC***RASQSISNNLH***WYQQKSHESPRLLIK***YASQSIS***GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSV
*ETEDFGVYFC****QQSNTWPYT***FGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVM
TQSPDSLAVSLGERATINC*ES****SQSLLNSGNQKNYLT***WYQQKPGQPPKPLIY***WASTRES***G
*VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC****QNDYSYPYT***FGQGTKLEIKSGSTSGSGK
PGSSEGSTKGEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS***GYSFTDYYMK***WARQMPGKGLEWMG
DIIPSNGATFYNQKFKG*QVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC****ARSHLLRASWFA***
YWGQGTMVTVSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMFW
VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPR
DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R

【０１６５】

配列番号７８－ＦＬＴ３及びＣＤ１２３の両方を標的とする４Ｇ８－ＣＳＬ３６２－二重特異性ＣＡＲ（ＣＤ８ａヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）ヌクレオチド配列、バリアントＩ

【化４３－１】

ATGCTGCTTCTGGTGACTAGCCTGCTCCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCGTTCCTGCT
CATCCCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGGGCCGAGCTTGTAAAGCCTGGGGCTTCCC
TGAAGCTGTCTTGTAAGTCTTCCGGCTACACGTTCACCTCCTATTGGATGCACTGGGTG
CGCCAGCGTCCGGGGCATGGTCTGGAGTGGATTGGAGAAATTGACCCGAGTGACAGCTA
CAAGGACTACAACCAAAAATTTAAAGACAAGGCCACTTTAACAGTTGACAGGTCCTCCA
ACACGGCTTACATGCACCTGAGCAGTCTGACCAGCGATGACTCCGCCGTGTACTACTGT
GCCCGCGCCATCACCACCACACCCTTCGACTTCTGGGGCCAGGGCACGACCCTTACCGT
GTCGTCGGGATCTACCAGCGGTTCCGGCAAACCGGGTTCGTCGGAGGGCTCGACCAAGG
GGGACATTGTCCTGACCCAGAGCCCGGCTACCCTGTCTGTCACCCCTGGTGATTCTGTT
TCATTGTCCTGTCGGGCATCACAGTCGATCTCTAACAACCTGCACTGGTACCAGCAGAA
AAGCCACGAGTCCCCGCGCCTGCTAATCAAGTATGCATCTCAGAGTATCTCTGGCATCC
CCTCTCGCTTTAGCGGTTCCGGTTCCGGCACAGATTTCACCTTAAGTATTAACTCCGTG
GAGACCGAGGATTTCGGAGTGTATTTCTGCCAGCAGTCAAATACCTGGCCCTACACCTT
TGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGGGGAGGCGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGCT
CCGGCGGAGGGGGATCTGGTGGAGGCGGGTCGGGCGGCGGCGGCTCCGACATCGTGATG
ACCCAGAGTCCCGACTCTCTTGCCGTCTCCTTAGGGGAGCGCGCCACCATAAACTGCGA
GTCTTCCCAGTCCCTCCTGAACTCCGGCAACCAGAAAAACTACCTAACCTGGTACCAAC
AGAAGCCCGGCCAGCCACCCAAGCCACTTATCTACTGGGCCTCCACTCGCGAATCTGGC
GTCCCTGACCGCTTCTCTGGCTCCGGTTCCGGCACCGACTTCACCCTCACTATCTCCTC
TCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGTCAGAACGACTACAGCTATCCCTACA
CCTTCGGCCAGGGTACTAAGTTGGAAATTAAGTCCGGTTCTACTAGCGGGTCCGGTAAA
CCGGGCAGTTCCGAGGGCTCGACCAAGGGCGAGGTACAACTGGTGCAGAGCGGCGCGGA
GGTGAAGAAGCCTGGCGAGAGCCTGAAGATCTCATGCAAGGGTTCCGGCTACTCCTTCA
CGGACTATTACATGAAATGGGCCCGCCAGATGCCCGGCAAGGGGCTCGAATGGATGGGG

【化４３－２】

GACATCATCCCTAGCAACGGCGCCACGTTCTACAATCAGAAGTTCAAGGGACAGGTCAC
AATTTCCGCGGACAAAAGCATCAGCACTACTTACCTGCAGTGGTCTTCCCTCAAGGCTA
GCGACACCGCCATGTATTACTGCGCGAGAAGTCACTTGCTGCGCGCTAGTTGGTTCGCC
TATTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACAGTGTCCACGACCACGCCTGCGCCGCGACCGCC
TACTCCCGCGCCAACCATCGCTTCCCAACCCCTGTCCTTGAGGCCCGAGGCCTGCAGAC
CTGCGGCTGGCGGGGCTGTTCACACTCGAGGTTTGGATTTTGCTTGCGACATGTTTTGG
GTGCTGGTGGTGGTCGGAGGTGTCCTGGCTTGTTACTCTCTGCTGGTCACCGTCGCGTT
CATCATCTTCTGGGTGCGGTCTAAGCGCTCACGTGGTGGGCACTCCGACTACATGAACA
TGACGCCCCGACGCCCAGGTCCTACGAGAAAGCATTACCAACCGTACGCTCCACCCCGC
GACTTTGCTGCCTACCGGTCCAGAGTAAAATTCAGTCGGTCTGCTGATGCCCCTGCTTA
CCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAATGAGCTTAATCTGGGACGACGAGAGGAATATG
ACGTTTTGGACAAGCGAAGGGGCCGAGACCCTGAGATGGGCGGTAAACCGCGGAGAAAG
AACCCCCAGGAGGGGTTGTATAATGAATTGCAAAAGGACAAAATGGCGGAGGCGTATTC
CGAAATAGGGATGAAGGGTGAAAGGCGGCGAGGCAAGGGACATGATGGTCTCTACCAAG
GGCTGTCTACTGCCACGAAGGACACCTATGATGCGCTTCATATGCAGGCCTTGCCTCCG
CGA

【０１６６】

配列番号７９－ＦＬＴ３及びＣＤ１２３の両方を標的とする４Ｇ８－ＣＳＬ３６２－二重特異性ＣＡＲ（ＣＤ８ａヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）アミノ酸配列、バリアントＩＩ（エピトープ結合領域は斜体、ＣＤＲは太字）

【化４４】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSC***RASQSISNNLH***WYQ
*QKSHESPRLLIK****YASQSIS****GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFC****QQSNTWPY***
TFGGGTKLEIKRGSTSGSGKPGSSEGSTKGQVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSS**GYTF**
TSYWMHWVRQRPGHGLEWIG**EIDPSDSYKDYNQKFK**DKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTS
DDSAVYYCA**RAITTTPFDF**WGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL
VQSGAEVKKPGESLKISCKGS***GYSFTDYYMK****WARQMPGKGLEWMG****DIIPSNGATFYNQK***
FKG*QVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC****ARSHLLRASWFAY***WGQGTMVTVSSGS
TSGSGKPGSSEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC*ES****SQSLLNSGNQKNYLT****WYQ*
*QKPGQPPKPLIY****WASTRES****GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC****QNDYSYPY***

TFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMFW
VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPR
DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R

【０１６７】

配列番号８０－ＦＬＴ３及びＣＤ１２３の両方を標的とする４Ｇ８－ＣＳＬ３６２－二重特異性ＣＡＲ（ＣＤ８ａヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）ヌクレオチド配列、バリアントＩＩ

【化４５－１】

ATGCTCCTGCTGGTGACCTCACTGCTGCTTTGCGAGCTGCCCCACCCCGCGTTCCTGCT

GATTCCCGACATCGTGCTTACCCAGTCCCCCGCCACCCTGTCCGTCACCCCCGGCGATT

CTGTCAGCTTAAGTTGTCGCGCTTCCCAGAGCATTAGCAACAACCTGCACTGGTACCAA

CAAAAGTCTCATGAGAGCCCACGGCTGCTGATTAAGTACGCATCACAATCTATCTCTGG

CATCCCCTCGCGCTTTTCTGGGTCCGGCAGTGGAACTGATTTCACCCTCTCCATCAATT

CCGTCGAGACCGAGGACTTTGGGGTGTACTTCTGCCAGCAGTCAAATACCTGGCCTTAC

ACCTTCGGCGGGGGTACGAAGCTGGAGATTAAGCGTGGGTCCACATCCGGCAGCGGTAA

ACCCGGCTCCTCAGAGGGCTCCACAAAAGGCCAGGTTCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCGG

AACTGGTTAAGCCCGGCGCAAGTCTGAAGCTGTCTTGTAAGTCTTCGGGTTACACGTTT

ACTTCGTACTGGATGCACTGGGTTCGCCAGCGTCCTGGCCAcGGACTGGAATGGATCGG

CGAGATCGATCCTTCCGATTCCTACAAGGACTACAACCAGAAATTTAAGGATAAAGCTA

CTCTAACTGTGGACCGCTCTAGCAACACCGCTTACATGCACCTCAGCTCGCTTACCAGC

GATGACTCTGCGGTGTACTACTGTGCCCGCGCCATCACCACTACGCCATTCGACTTCTG

GGGCCAGGGCACTACTCTTACCGTGTCGTCGGGTGGAGGCGGCTCTGGAGGAGGCGGAA

GCGGAGGAGGTGGTTCTGGAGGCGGAGGCTCTGGTGGAGGCGGATCTGAGGTGCAGCTC

GTCCAGAGCGGGGCAGAGGTGAAGAAGCCTGGTGAGTCCCTTAAGATTTCCTGTAAGGG

CTCGGGCTACTCCTTCACCGACTACTACATGAAATGGGCGCGTCAGATGCCCGGAAAGG

GACTGGAGTGGATGGGGGACATCATCCCGTCCAATGGCGCTACCTTCTACAACCAGAAG

TTCAAGGGCCAGGTGACCATCAGCGCGGACAAATCCATCTCCACCACGTACCTGCAGTG

GTCTAGTCTGAAGGCCTCTGACACAGCCATGTATTATTGCGCCCGCAGCCACTTGCTGC

GCGCGAGTTGGTTCGCCTATTGGGGCCAGGGTACTATGGTGACTGTGAGCTCCGGTTCG

【化４５－２】

ACTTCCGGAAGTGGAAAACCGGGATCATCCGAAGGCAGCACCAAGGGTGACATAGTGAT
GACCCAGTCCCCGGATAGCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGCGCGCCACAATCAACTGCG
AGAGCAGCCAGAGCCTGCTCAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTACCAA
CAGAAGCCCGGCCAGCCACCTAAGCCCCTGATCTATTGGGCTAGTACGAGGGAGTCCGG
CGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCTGGGAGCGGTACAGATTTCACCCTGACTATTTCGA
GCCTGCAAGCTGAGGACGTGGCCGTGTACTATTGCCAGAACGACTACAGCTATCCTTAC
ACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGACGACCACGCCTGCGCCGCGACCGCC
TACTCCCGCGCCAACCATCGCTTCCCAACCCCTGTCCTTGAGGCCCGAGGCCTGCAGAC
CTGCGGCTGGCGGGGCTGTTCACACTCGAGGTTTGGATTTTGCTTGCGACATGTTTTGG
GTGCTGGTGGTGGTCGGAGGTGTCCTGGCTTGTTACTCTCTGCTGGTCACCGTCGCGTT
CATCATCTTCTGGGTGCGGTCTAAGCGCTCACGTGGTGGGCACTCCGACTACATGAACA
TGACGCCCCGACGCCCAGGTCCTACGAGAAAGCATTACCAACCGTACGCTCCACCCCGC
GACTTTGCTGCCTACCGGTCCAGAGTAAAATTCAGTCGGTCTGCTGATGCCCCTGCTTA
CCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAATGAGCTTAATCTGGGACGACGAGAGGAATATG
ACGTTTTGGACAAGCGAAGGGGCCGAGACCCTGAGATGGGCGGTAAACCGCGGAGAAAG
AACCCCCAGGAGGGGTTGTATAATGAATTGCAAAAGGACAAAATGGCGGAGGCGTATTC
CGAAATAGGGATGAAGGGTGAAAGGCGGCGAGGCAAGGGACATGATGGTCTCTACCAAG
GGCTGTCTACTGCCACGAAGGACACCTATGATGCGCTTCATATGCAGGCCTTGCCTCCG
CGA

【０１６８】

配列番号８６－ＣＤ１２３のＮ末端ドメインを標的とするＣＳＬ３６２－ＣＡＲ　２ｎｄバリアント（ＩｇＧ４ヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）アミノ酸配列（ＣＤＲは太字）

【化４６】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWV
KQSHGKSLEWIG**DIIPSNGATFYNqKFKG**KATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYC
TRSHLLRASWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDFVMTqSPSSLTVTAGEKVT
MSCKS**SQSLLNSGNQKNYLT**WYLqKPGqPPKLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTL
TISSVQAEDLAVYYC**qNDYSYPYT**FGGGTKLEIKRESKYGPPCPPCPASMFWVLVVVGG
VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【０１６９】

配列番号８７－ＣＤ１２３のＮ末端ドメインを標的とするＣＳＬ３６２－ＣＡＲ　３ｒｄバリアント（ＩｇＧ４ヒンジ、ＣＤ２８　ＴＭ、ＣＤ２８ｚ、ＣＤ３ｚ）アミノ酸配列（ＣＤＲは太字）

【化４７】

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYMKWA
RQMPGKGLEWMG**DIIPSNGATFYNQKFKG**QVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC
ARSHLLRASWFAYWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERAT
INCES**SQSLLNSGNQKNYLTW**YQQKPGQPPKPLIY**WASTRES**GVPDRFSGSGSGTDFTL
TISSLQAEDVAVYYC**QNDYSYPYT**FGQGTKLEIKRESKYGPPCPPCPASMFWVLVVVGG
VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【０１７０】

ＩＩＩ．対象の治療方法

ＨＳＣなどの遺伝子操作された造血細胞は、単独で、または本明細書に記載の１つ以上の細胞表面抗原を標的とする１つ以上の細胞傷害性薬剤と組み合わせて、治療を必要とする対象に投与することができる。造血細胞は、１つ以上の細胞表面抗原の遺伝子内で遺伝的に編集されているので、造血細胞及び／またはその子孫細胞は、１つ以上の細胞表面抗原を変異形態（例えば、機能する）で発現するであろう。それらは、例えばＣＡＲ－Ｔ細胞など、細胞傷害性薬剤による標的化を回避することができる。

【０１７１】

したがって、本開示は、造血器悪性腫瘍を治療するための方法を提供し、本方法は、それを必要とする対象に、（ｉ）本明細書に記載の遺伝子操作された造血細胞の集団と、任意選択で（ｉｉ）細胞表面抗原を標的とするＣＡＲ－Ｔ細胞などの細胞傷害性薬剤であって、細胞傷害性薬剤が造血細胞またはその子孫細胞を標的としないように、細胞表面抗原を標的とするＣＡＲ－Ｔ細胞の遺伝子が造血細胞内で遺伝子編集されている、細胞傷害性薬剤と、を投与することを含む。（ｉ）及び（ｉｉ）の投与は、同時であっても、任意の順序であってもよい。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬剤及び／または造血細胞は、薬学的に許容される担体と混合されて医薬組成物を形成することができ、これも本開示の範囲内である。

【０１７２】

「対象」、「個体」、または「患者」は本明細書で相互変換可能に使用され、脊椎動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトを言う。哺乳動物には、ヒト霊長類、非ヒト霊長類またはマウス、ウシ、ウマ、イヌ、もしくはネコ科の種が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、対象は、造血器悪性腫瘍を有するヒト患者である。

【０１７３】

本明細書に記載の方法を実施するために、有効量の遺伝子操作された造血細胞を、治療を必要とする対象に投与することができる。任意選択で、造血細胞は、本明細書に記載の細胞傷害性薬剤と共使用され得る。本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、「治療有効量」という用語と互換的に使用することができ、細胞傷害性薬剤、造血細胞集団、または医薬組成物（例えば、細胞傷害性薬剤及び／または造血細胞を含む組成物）の量を指す。細胞）を必要とする対象への投与時に所望の活性をもたらすのに十分なものであり得る。本開示の文脈内で、「有効量」という用語は、本開示の方法によって治療される障害の発現を遅延させる、障害の進行を停止させる、障害の少なくとも１つの症状を緩和または軽減するのに十分な化合物、細胞集団、または医薬組成物の量を指す。活性成分の組み合わせが投与される場合、組み合わせの有効量は、個別に投与された場合に有効であった各成分の量を含み得るか、または含み得ないことに留意されたい。

【０１７４】

有効量は、当業者によって認識されるように、治療されている特定の状態、状態の重症

度、年齢、健康状態、サイズ、性別及び体重、治療期間、併用療法（もしあれば）の性質、特定の投与経路、及び医療従事者の知識及び専門知識の範囲内の同様の因子。いくつかの実施形態では、有効量は、対象における任意の疾患または障害を緩和、緩和、改善、改善、症状の低減、または進行の遅延をもたらす。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、造血器悪性腫瘍を有するヒト患者である。

【０１７５】

本明細書に記載されるように、キメラ受容体を発現する造血細胞及び／または免疫細胞は、対象にとって自家のものであり得る。すなわち、細胞は、治療を必要とする対象から得られ、細胞が細胞傷害性薬剤に結合しないように操作され、次いで、同じ対象に投与される。対象への自家細胞の投与は、非自家細胞の投与と比較して宿主細胞の拒絶反応の低減をもたらすことができる。例えば、ＨＳＰＣは対象からの生体試料から得られ、ＨＳＰＣは遺伝子操作され、遺伝子操作されたＨＳＰＣは同じ対象に投与される。いくつかの事例では、ＨＳＰＣは、生体試料から得られ、ここで、生体試料は、骨髄細胞、血液、臍帯血細胞、または動員末梢血由来ＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞である。

【０１７６】

あるいは、宿主細胞は、同種他家細胞である。すなわち、細胞は、第１の対象から得られ、遺伝子操作され、次いで、第１の対象とは異なるが同じ種のものである第２の対象に投与される。例えば、同種異系免疫細胞は、ヒトドナーに由来し、ドナーとは異なるヒトレシピエントに投与することができる。いくつかの実施形態では、造血細胞は、宿主対移植片効果を低減するようにさらに遺伝子操作されている。例えば、いくつかの実施形態では、免疫細胞及び／または造血細胞は、宿主免疫応答の誘導に関与する１つ以上のタンパク質の発現を低減または排除するために遺伝子編集またはサイレンシング法に供され得る。

【０１７７】

哺乳動物（例えば、ヒト）に投与される細胞（すなわち、免疫細胞または造血細胞）の典型的な量は、例えば、約10^6～10^{11}個の細胞の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、10^6個未満の細胞を対象に投与することが望ましい場合がある。いくつかの実施形態では、10^{11}個を超える細胞を対象に投与することが望ましい場合がある。一部の実施形態では、細胞の１つ以上の用量は、約10^6個の細胞～約10^{11}個の細胞、約10^7個の細胞～約10^{10}個の細胞、約10^8個の細胞～約10^9個の細胞、約10^6個の細胞～約10^8個の細胞、約10^7個の細胞～約10^9個の細胞、約10^7個の細胞～約10^{10}個の細胞、約10^7個の細胞～約10_{11}個の細胞、約10^8個の細胞～約10^{10}個の細胞、約10^8個の細胞～約10^{11}個の細胞、約10^9個の細胞～約10^{10}個の細胞、約10^9個の細胞～約10^{11}個の細胞、または約10^{10}個の細胞～約10^{11}個の細胞を含む。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、遺伝子操作された造血細胞の集団を対象に投与すること、及び１つ以上の免疫療法剤（例えば、細胞傷害性薬剤）を投与することを含む。当業者には理解されるように、免疫療法薬は同じタイプまたは異なるタイプのものであり得る（例えば、治療用抗体、キメラ抗原受容体（複数可）を発現する免疫細胞の集団、及び／または抗体－薬物コンジュゲート）。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質のエピトープに結合するエピトープ結合断片を含む細胞傷害性薬剤（例えば、本明細書に記載のキメラ受容体を発現する免疫細胞）は、造血細胞の投与の前に投与される。いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質（例えば、本明細書に記載のキメラ受容体を発現する免疫細胞）のエピトープに結合するエピトープ結合断片を含む薬剤は、造血細胞の投与の少なくとも約１日、２日、３日、４日、５日、６日、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、７週間、８週間、９週間、１０週間、１１週間、１２週間、３か月、４か月、５か月、６か月、またはそれ以上前に投与される。

【０１８０】
あるいは、いくつかの実施形態では、造血細胞は、細胞表面タンパク質のエピトープに結合するエピトープ結合断片を含む細胞傷害性薬剤（例えば、本明細書に記載のキメラ受容体を発現する免疫細胞）の前に投与される。いくつかの実施形態では、造血細胞の集団は、細胞表面タンパク質のエピトープに結合するエピトープ結合断片を含む細胞傷害性薬剤の投与の少なくとも約１日、２日、３日、４日、５日、６日、１週間、２週間、３週間、４週間、５週間、６週間、７週間、８週間、９週間、１０週間、１１週間、１２週間、３か月、４か月、５か月、６か月、またはそれ以上前に投与される。
【０１８１】
いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質を標的とする細胞傷害性薬剤及び造血細胞の集団は、実質的に同時に投与される。いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質を標的とする細胞傷害性薬剤が投与され、患者は一定期間評価され、その後、造血細胞の集団が投与される。いくつかの実施形態では、造血細胞の集団が投与され、一定期間患者が評価され、その後、細胞表面タンパク質を標的とする細胞傷害性薬剤が投与される。
【０１８２】
同様に本開示の範囲内にあるのは、細胞傷害性薬剤及び／または造血細胞の集団の複数回投与（例えば、用量）である。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬剤及び／または造血細胞の集団は、対象に１回投与される。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬剤及び／または造血細胞の集団は、対象に複数回（例えば、少なくとも２、３、４、５、またはそれ以上の回）投与される。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬剤及び／または造血細胞の集団は、対象に対して、定期的間隔で、例えば６か月ごとに投与される。
【０１８３】
投与経路の例としては、静脈内、注入、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜、及び直腸投与が挙げられる。
【０１８４】
本明細書に記載の方法のいずれも、対象者における血液悪性腫瘍の治療のためのものであり得る。本明細書で使用される場合、「処置する」もしくは「処置」または「処置すること」または「処置する」という用語は、病的状態または障害の緩和、その進行の減速、その症状の軽減、及び／またはその進行の停止を目的とする治療措置を指す。したがって、治療を必要とする者には、既にその障害を有する者が含まれる。例えば、いくつかの事例では、がんの治療は、がんの進行を安定させることを意味する。いくつかの事例では、がんを処置することは、がんの進行を遅らせることを意味する。いくつかの事例では、がんを治療することは、がんの進行を止めることを意味する。いくつかの事例では、がんの治療とは、がんのサイズを縮小することを意味する。いくつかの事例では、がんを治療することは、がんと診断された対象の全生存期間を延長することを意味する。がんの進行を評価する方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、イメージング（例えば、Ｘ線、コンピュータ断層撮影スキャン、磁気共鳴イメージング、キャリパー測定、または陽電子放出断層撮影スキャン）を使用した標的病変の評価を含む。細胞学もしくは組織学、または腫瘍マーカー（複数可）の発現（例えば、Ｅｉｓｅｎｈａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００９，Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ ４５：２２８－２４７及びＳｃｈｗａｒｔｚ ｅｔ ａｌ．，２０１６，Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ ６２：１３２－１３７を参照されたい）。これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。
【０１８５】
いくつかの実施形態では、対象は、造血器悪性腫瘍を有するヒト対象である。本明細書で使用される場合、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めた血液細胞）に関与する悪性異常を指す。造血器悪性腫瘍の例としては、限定されるものではないが、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、白血病、または多発性骨髄腫が挙げられる。例示的な白血病としては、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病または慢性リンパ芽球性白血病、及び慢性リンパ性白血

病が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、造血器悪性腫瘍に関与する細胞は、悪性腫瘍の治療に使用される従来のまたは標準的な治療薬に耐性である。例えば、細胞（例えば、がん細胞）は、悪性腫瘍の治療に使用される化学療法薬及び／またはＣＡＲ　Ｔ細胞に耐性であり得る。

【０１８７】

いくつかの事例では、造血器悪性腫瘍には、以下が含まれる：Ｂリンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、または芽球性形質細胞様樹状細胞白血病（ＢＰＣＤＮ）。

【０１８８】

ＩＶ．（キット及び組成物）

本明細書に記載のキメラ受容体を発現する免疫細胞のいずれも、薬学的に許容される担体または賦形剤中で医薬組成物として投与することができる。

【０１８９】

「薬学的に許容される」という語句は、本開示の組成物及び／または細胞に関連して使用される場合、生理学的に許容され、哺乳動物（例えば、ヒト）に投与されたときに不適切な反応を通常は生じさせない、かかる組成物の分子実体及び他の成分を指す。好ましくは、本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という用語は、連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認されているか、または哺乳類、より具体的にはヒトにおいて使用するために米国薬局方もしくは他の一般的に認められている薬局方に記載されていることを意味する。「許容可能」は、担体が組成物の活性成分（例えば、核酸、ベクター、細胞、または治療用抗体）と適合し、組成物（複数可）が投与される対象に悪影響を及ぼさないことを意味する。本方法で使用される医薬組成物及び／または細胞のいずれも、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤を含むことができる。

【０１９０】

緩衝液を含む薬学的に許容される担体は当該技術分野で周知であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸を含むことができる。アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤と、防腐剤と、低分子量ポリペプチドと、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；アミノ酸と、疎水性ポリマー、単糖類と、二糖類と、及び他の炭水化物と、金属錯体と、及び／または非イオン性界面活性剤を含む。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ　２０ｔｈ　Ｅｄ．（２０００）　Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　ａｎｄ　Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｅｄ．Ｋ．Ｅ．Ｈｏｏｖｅｒを参照されたい。

【０１９１】

造血器悪性腫瘍の治療に使用するためのキットもまた本開示の範囲内である。かかるキットは、ＨＳＰＣなどの遺伝子操作された造血細胞、及び任意選択で、細胞表面抗原を標的とする１つ以上の細胞傷害性薬剤を含み得、その遺伝子は造血細胞内で編集されている。かかるキットは、本明細書に記載の遺伝子操作された造血細胞のうちのいずれかを含む第１の医薬組成物を含む容器と、任意選択で、本明細書にも記載されている細胞表面抗原を標的とする１つ以上の細胞傷害性薬剤（例えば、本明細書に記載のキメラ受容体を発現する免疫細胞）を含む１つ以上の追加の容器と、を含み得る。

【０１９２】

いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の方法のいずれかで使用するための説明書を含み得る。含まれる説明書は、遺伝子操作された造血細胞の投与の説明、及び任意選択で、対象における意図された活性を達成するための対象への１つ以上の細胞傷害性薬剤の投与の説明を含み得る。キットはさらに、対象が治療を必要としているかどうかを特定したことに基づいて、治療に好適な対象を選択する説明を含むことができる。いくつかの実施形態では、説明書は、治療を必要とする対象に、遺伝子操作された造血細胞と、任意選択で、１つ以上の細胞傷害性薬剤と、を投与することの説明を含む。

【０１９３】
本明細書に記載の遺伝子操作された造血細胞及び任意選択で細胞傷害性薬剤の使用に関連する説明書は、一般に、目的の治療のための用量、投与計画及び投与経路に関する情報を含む。容器は、単位用量、バルクパッケージ（例えば、複数回用量パッケージ）、またはサブユニット用量であり得る。本開示のキットに付属する説明書は、典型的には、ラベルまたは添付文書に記載された説明書である。ラベルまたは添付文書は、医薬組成物が対象における疾患または障害の治療、発症の遅延、及び／または緩和のために使用されることを示す。
【０１９４】
本明細書で提供されるキットは好適な包装である。好適な包装としては、バイアル、ボトル、瓶、可撓性包装（例えば、密封マイラーまたはプラスチック袋）などが挙げられるが、これらに限定されない。特定のデバイス、例えば、吸入器、経鼻投与デバイス、または注入デバイスと組み合わせて使用するためのパッケージもまた企図される。容器は、製剤を保持または収容し、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈用溶液袋またはバイアルであり得る）。容器はまた、滅菌アクセスポートを有し得る。医薬組成物に含まれる少なくとも１つの活性剤は、本明細書に記載のキメラ受容体バリアントである。
【０１９５】
キットは、任意選択で、緩衝液及び解釈情報などの追加の構成要素を提供し得る。通常、キットは、容器、及び容器上のまたは容器と関連したラベルまたは添付文書（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、本開示は、上述のキットの内容物を含む製品を提供する。
【実施例】
【０１９６】
次の具体例は目的の発明を説明するためと、クレームの範囲を制限することとして解釈すべきではない。具体的な材料に言及する限りにおいて、それは単に例示説明を目的とするものであり、本発明を限定することは意図されない。当業者は、通常の創作能力を発揮することで、本発明の範囲から逸脱しない同等の手段または反応物の開発に容易に想到することができる。
【０１９７】
実施例１：以下の実施例で使用される一般的なプロトコル
プラスミドクローニング
ＷＴ－Ｃａｓ９及びＮＧ－Ｃａｓ９塩基エディタープラスミドをＡｄｄｇｅｎｅから得た（プラスミド番号１３８４９５、１３８４９１）。ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ３ｘＮＬＳ及び他の塩基エディターバリアント（下記の完全なリストを参照されたい）を、ＮＥＢ　ＨｉＦｉアセンブリマスターミックス及び合成されたｄｓＤＮＡインサート（ＩＤＴ　ｇＢｌｏｃｋｓ）を使用してクローニングした。単一アミノ酸の変化（すなわち、Ｋ９１８Ｎ）または欠失（Ｂｌａｃｋｊａｃｋバリアント）を、標準的な部位特異的突然変異誘発技術により導入した。必要に応じて、ｓｇＲＮＡを、ＢｓｍＢＩ制限酵素、及び所望のスペーサー配列を含むアニーリング及びリン酸化ＤＮＡオリゴを使用して、ｐＬｅｎｔｉｇｕｉｄｅ－Ｐｕｒｏバックボーン（Ａｄｄｇｅｎｅ）またはｐＬＫＯ－ｍＴａｇＢＦＰ２バックボーン（クローン化）にクローニングした。プラスミドマキシプレップをＭａｃｋａｒｅｙ　Ｎａｇｅｌ　ＮｕｃｌｅｏＢｏｎｄ　Ｘｔｒａ　Ｍａｘｉキットを用いて精製した。

【表３－１】

表３：

塩基エディター	正式名	説明	起源
ABE	ABE8e(TadA-8e V106W)	NGG PAM、低減した RNA 編集(V106W)	Addgene
ABE	NG-ABE8e	NG PAM	Addgene
ABE	SpRY-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM、3xNLS	クローン化
ABE	LbABE8e(TadA-8e V106W)	TTTV PAM、低減した RNA 編集(V106W)	Addgene
ABE	enAsABE8e	TTTV PAM	Addgene
ABE	dABE8e TadA 8e V106W	NGG PAM、dCas9	クローン化
ABE	ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NGG PAM、3xNLS	クローン化
ABE	NG-ABE8e 3xNLS	NG PAM、3xNLS	クローン化
ABE	LbABE8e(TadA-8e V106W) 3xNLS	TTTV PAM、3xNLS	クローン化
ABE	RVRR-LbABE8e(TadA-8e V106W) 2xNLS	PAM 弛緩した LbCas12a バリアント	クローン化
ABE	SpRY-K918N-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM、K918N、3xNLS	クローン化
ABE	SpRY-Sniper-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM、高忠実度 Sniper バリアント、3xNLS	クローン化
ABE	dSpRY-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM、dCas9、3xNLS	クローン化
ABE	SpRY-BlackJack-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM、長 gRNA 耐性バリアント(Blackjack)、3xNLS	クローン化
ABE	SpRY-Sniper-BlackJack-ABE8e V106W 3xNLS	NRN PAM、高忠実度 Sniper バリアント、Blackjack、3xNLS	クローン化
ABE	SpRY-Sniper-K918N-ABE8e V106W 3xNLS	NRN PAM、高忠実度 Sniper バリアント、K918N、3xNLS	クローン化
ABE	SpRY-HF1-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM、高忠実度 HF1 バリアント、3xNLS	クローン化
ABE	SpRY-HF1-BlackJack-ABE8e V106W 3xNLS	NRN PAM、高忠実度 HF1 バリアント、Blackjack、3xNLS	クローン化

【表３－２】

CBE	evoAPOBEC1-BE4max	NGG　PAM、evoAPOBEC1 デアミナーゼ	Addgene
CBE	NG-evoAPOBEC1-BE4max	NG　PAM、evoAPOBEC1 デアミナーゼ	Addgene
CBE	evoAPOBEC1-BE4max 3xNLS	NGG　PAM、evoAPOBEC1 デアミナーゼ　3xNLS	クローン化
CBE	SpRY-evoAPOBEC1-BE4 3xNLS	NRN　PAM、evoAPOBEC1 デアミナーゼ　3xNLS	クローン化
CBE	eA3A-BE5-NG	NG　PAM、eAPOBEC3A デアミナーゼ、高純度	Addgene
CBE	EA-BE4max-NG	NG　PAM、evoAPOBEC1 デアミナーゼ、高純度	Addgene

【０１９８】

フローサイトメトリーリガンド親和性アッセイ

変異受容体のリガンドに対する結合親和性を評価するために、蛍光リガンド結合アッセイを開発した。ヒトＳＣＦ及びＦＬＴ３Ｌ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）を、製造業者の推奨に従ってＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８抗体標識キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　カタログＡ２０１８１）とコンジュゲートした。ＦＬＴ３またはＫＩＴバリアントのいずれかを発現する細胞を、ＦｃＲブロッキング試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　１３０－０５９－９０１）、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ修正可能な黄色死細胞染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｌ３４９６７）、対照抗体（ＫＩＴ　１０４Ｄ２　ＰＥ－Ｃｙ７，Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、またはＦＬＴ３　ＢＶ１０Ａ４　ＰＥ－Ｃｙ７，Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）及びそれぞれのＡＦ４８８コンジュゲートリガンドとともに室温で１５分間インキュベートした。試料を、ＰＢＳ＋２％ＦＢＳで洗浄し、ＢＤ　Ｆｏｒｔｅｓｓａフローサイトメーターで分析した。

【０１９９】

ＦＬＴ３及びＣＤ１２３編集のためのレポーター細胞株

Ｋ５６２細胞はＦＬＴ３またはＣＤ１２３を構成的に発現していないため、これらの細胞を、それらの内因性ゲノム遺伝子座由来のＦＬＴ３、ＣＤ１２３、ＫＩＴ、またはこれら３つの遺伝子のいずれかの組み合わせを過剰発現するように操作し、これらの遺伝子に対する遺伝子編集アプローチのためのモデルとして機能させた。これらの遺伝子の構成的で強力な発現を得るために、完全ヒトＥＦ１アルファプロモーターを、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９（ＦＬＴ３、ＫＩＴ）またはＣＲＩＳＰＲ－ＡｓＣａｓ１２ａ（ＣＤ１２３）遺伝子編集戦略を介して、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、またはＫＩＴ遺伝子の転写開始部位の上流に組み込んだ（図８）。標的領域の５０ｂｐ長の相同性アームを有するｄｓＤＮＡ線状ドナーを、ＥＦ１アルファプロモーターをコードするスリーピングビューティープラスミド上でＰＣＲによって調製した。野生型Ｋ５６２細胞を、それぞれの遺伝子のプロモーター領域を標的とするｇＲＮＡを有するＣａｓ９（ＦＬＴ３、ＫＩＴ）またはＣａｓ１２ａ（ＣＤ１２３）　ＲＮＰを有するＬｏｎｚａ　４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒシステムを使用してエレクトロポレーションした。一致した相同性アームを有する５～１０ｕｇのｄｓＤＮＡ線状ドナーを、相同性指向修復による組み込みのための鋳型として機能するように、エレクトロポレーション反応に含めた。細胞をＦＬＴ３　ＢＶ１０Ａ４　ＰＥ－Ｃｙ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＫＩＴ１０４Ｄ２　ＰＥ－Ｃｙ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）またはＣＤ１２３　９Ｆ５　ＢＶ４２１及びＣＤ１２３　７Ｇ３　ＢＶ７１１（ＢＤ）で染色

し、フローサイトメトリーで評価した。ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、またはＫＩＴ－高集団をＦＡＣＳで選別し、単一クローンを限界希釈によって単離した（図８）。ＦＬＴ３（クローンＡＨ１１）及びＣＤ１２３（クローン３Ｄ５）についてフローサイトメトリーによるＭＦＩが最も高いクローンを選択して増殖させた。

【０２００】

ウエスタンブロット

ＦＬＴ３／ＣＤ１２３バリアントを過剰発現するＫ５６２細胞またはＫＩＴを過剰発現するＮＩＨ－３Ｔ３もしくはＨＥＫ－２９３Ｔ細胞を、ＦＢＳなし（血清飢餓）の培地で一晩培養した後、各条件からの１００万個の細胞を、３７℃で５分間、１００ｎｇ／ｍＬのＦＬＴ３Ｌ、ＩＬ３、またはＳＣＦ（評価された受容体に応じて）で刺激するか、または刺激しなかった。なしのいずれかで刺激した。次いで、細胞を、氷冷ＰＢＳで３回洗浄し、溶解し、ウエスタンブロットのためにタンパク質を抽出した（Ｃｅｌｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｂｕｆｆｅｒ，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ ＦＮＮ００１１＋１ｍＭ ＰＭＳＦ）。ＢＣＡアッセイで定量化した後、タンパク質抽出物をＬａｅｍｍｌｉローディングダイ（Ｂｉｏｒａｄ １６１－０７４７）と混合し、Ｎｏｖｅｘ Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅ Ｇｅｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で泳動させた。転写後、膜を、５％ｗ／ｖのＢＳＡを含むＴＢＳＴでブロッキングし、ｐＫＩＴ（Ｙ７１９，Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ３３９１Ｔ）またはｐＦＬＴ３（Ｔｙｒ５８９／５９１クローン３０Ｄ４，Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ３４６４Ｓ）を認識する一次抗体と４℃で一晩インキュベートした。洗浄後、膜を、抗ウサギＩｇＧ、ＨＲＰ結合抗体（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ７０７４）と室温で１時間インキュベートし、その後、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ Ｗｅｓｔ Ｆｅｍｔｏ化学発光ＨＲＰ基質（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ３４０９６）とインキュベートし、ＩｍａｇｅＱｕａｎｔ ＬＡＳ４０００で分析した。その後、同じ膜をＲｅｓｔｏｒｅ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ＃２１０５９）ストリッピング緩衝液とともに室温で２０分間インキュベートし、抗ＫＩＴ（クローン１Ｃ５、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＭＡ５－１５８９４）または抗ＦＬＴ３ （クローンＯＴＩ７Ｄ６、Ｏｒｉｇｅｎｅ ＴＡ８０８１５７）一次抗体での二次染色を行った。を含む。二次Ａｂ染色を、一次Ａｂに従って抗ウサギまたは抗マウスＩｇＧ ＨＲＰコンジュゲートＡｂで行い、膜を上記のように展開し、取得した。抗アクチン染色を、負荷正規化のための内部対照として使用した。

【０２０１】

フローサイトメトリー分析（インビトロ実験）

編集された細胞株を、編集の７２時間後にフローサイトメトリーにより評価し、治療用エピトープまたは無関係のエピトープのいずれかに結合する抗体クローンで染色して、編集タンパク質の表面発現のための対照抗体として機能させた。ＦＬＴ３編集では、細胞を、ＦｃＲブロッキング試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ １３０－０５９－９０１）２／１００ｕＬ、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ修正可能な黄色死細胞染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｌ３４９６７）１／１０００、ＦＬＴ３ ＢＶ１０Ａ４ ＰＥ－Ｃｙ７ ２／１００（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ３１３３１４）及びＦＬＴ３ ４Ｇ８ ＢＶ７１１（ＢＤ ５６３９０８）とともにインキュベートした。ＣＤ１２３編集では、細胞を、ＦｃＲブロッキング試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ １３０－０５９－９０１）２／１００ｕＬ、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ修正可能な黄色死細胞染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｌ３４９６７）１／１０００、ＣＤ１２３ ９Ｆ５ ＰＥまたはＢＶ４２１（ＢＤ ５５５６４４）１／１００、ＣＤ１２３ ７Ｇ３ ＢＶ７１１またはＢＶ４２１（ＢＤ ７４０７２２）１／１００とともにインキュベートした。。ＫＩＴ編集では、細胞を、ＦｃＲブロッキング試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ １３０－０５９－９０１）２／１００ｕＬ、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ修正可能な黄色死細胞染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｌ３４９６７）１／１０００、ＫＩＴ １０４Ｄ２ ＰＥ－Ｃｙ７またはＢＶ７１１ ２／１００（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ ３１３２１２）、ＫＩＴ Ｆａｂ７９Ｄ ＡＦ４８８またはＰＥ（Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ）２／１００とともにインキュベートした。染色は、１００ｕＬ／試料量で、４℃で３０分間行った。培養し

たヒトＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの幹細胞表現型を評価するために、細胞を採取し、１００ｕＬのＰＢＳに再懸濁し、ＦｃＲブロッキング試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　１３０－０５９－９０１）２／１００ｕＬ、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ修正可能な黄色死細胞染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｌ３４９６７）１／１０００、ＣＤ３４　ＢＶ４２１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）１．５／１００、ＣＤ９０　ＡＰＣ（ＢＤ）３．５／１００、ＣＤ４５ＲＡ　ＡＰＣ－Ｃｙ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）３．５／１００、ＣＤ１３３／２　ＰＥ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）４／１００で染色した。染色は、１００ｕＬ／試料量で、４℃で３０分間行った。試料を４レーザーまたは５レーザーＢＤ　Ｆｏｒｔｅｓｓａフローサイトメーターで分析した。

【０２０２】

フローサイトメトリー分析（インビトロ実験）

異種移植ＮＳＧマウス由来の末梢血を１．５ｍＬのエッペンドルフチューブ内に収集し、１０ｕＬの０．５Ｍ　ＥＤＴＡを入れ、ＦｃＲブロッキング試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　１３０－０５９－９０１）２／１００ｕＬ、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ修正可能な黄色死細胞染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｌ３４９６７）１／１０００、ヒトＣＤ４５　ＢＶ７８６（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）１．５／１００、マウスＣＤ４５　ＢＶ５７０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ３４　ＢＶ４２１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）１．５／１００、ＣＤ１９　ＢＶ６５０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）３／１００、ＣＤ３　ＢＶ７１１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）２／１００　、ＣＤ３３　ＢＢ５１５（ＢＤ）２／１００で室温で１５分間染色した。次に、血液試料をＡＣＫ試薬（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて室温で５分間溶解させ、ＰＢＳ＋２％ＦＢＳで２回洗浄した。試料を、４レーザーＢＤ　Ｆｏｒｔｅｓｓａフローサイトメーターで分析した。

【０２０３】

異種移植マウスの骨髄を、モルタルで後肢の骨を砕き、４０ｕｍのセルストレーナーを通して濾過し、細胞をＭｉｌｔｅｎｙｉ　ＭＡＣＳランニング緩衝液中に再懸濁することによって得た。細胞の画分を、フローサイトメトリー分析のために、ＦｃＲブロッキング試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　１３０－０５９－９０１）２／１００ｕＬ、７－ＡＡＤ（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｇｅｎ）３／１００、ヒトＣＤ４５　ＢＶ７８６（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）１．５／１００、マウスＣＤ４５　ＢＶ５７０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ３４　ＢＶ４２１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）１．５／１００、ＣＤ１９　ＢＶ６５０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）またはＣＤ１９　ＢＶ６０５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）３／１００、ＣＤ３　ＢＶ７１１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）またはＣＤ３　ＰＥ－Ｃｙ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）２／１００ＣＤ３３　ＢＢ５１５（ＢＤ）、ＣＤ３８　ＢＶ４８０（ＢＤ）　１．５／１００またはＣＤ３８　ＢＵＶ３９６（ＢＤ）　２／１００、ＦＬＴ３　ＢＶ１０Ａ４　ＰＥ－Ｃｙ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ１２３　９Ｆ５　ＰＥ（ＢＤ）、ＣＤ９０　ＡＰＣ（ＢＤ）　３．５／１００、ＣＤ４５ＲＡ　ＡＰＣ－Ｃｙ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）３／１００で、４℃で３０分間染色した。脾臓を、４０ｕｍセルストレーナー上で粉砕し、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　ＭＡＣＳ泳動緩衝液に再懸濁した。回収した細胞を、ＦｃＲブロッキング試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　１３０－０５９－９０１）２／１００ｕＬ、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ修正可能な黄色死細胞染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｌ３４９６７）１／１０００、ヒトＣＤ４５　Ｐａｃｉｆｉｃ　Ｂｌｕｅ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）１．５／１００、マウスＣＤ４５　ＢＶ５７０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）、ＣＤ３　ＢＶ７１１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）２／１００、ＥＧＦＲ　ＡＦ４８８（Ｒ＆Ｄ）１．５／１００、ＣＤ６２Ｌ　ＰＥ（ＢＤ）２／１００、ＣＤ４　ＡＰＣ（ＢＤ）２／１００、ＣＤ８　ＢＶ７５０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）２／１００、ＣＤ４５ＲＡ　ＡＰＣ－Ｃｙ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）３／１００、ＣＤ６９　ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）３／１００で、４℃で３０分間染色した。試料を、４レーザーＢＤ　Ｆｏｒｔｅｓｓａフローサイトメーターで分析した。いくつかの実験では、ＢＭ細胞を、ｈＣＤ４５　ＢＶ７８６、ｍＣＤ４５　ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５、ＣＤ３　ＰＥ－Ｃｙ５、ＣＤ７　ＡＦ７００、ＣＤ１０　ＢＵＶ７３７、ＣＤ１１ｃ　ＢＵＶ６６１、ＣＤ１４　ＢＶ５１０、ＣＤ１９　ＢＶ６０５、ＣＤ３３　ＰＥ－Ｃｙ７、ＣＤ３８　ＢＵＶ３９６、ＣＤ４５ＲＡ　ＡＰＣ－Ｃｙ７、ＣＤ５

６　ＢＵＶ４９６、ＣＤ９０　ＡＰＣ、ＦＬＴ３　ＰＥまたはＢＶ７１１、及びＫＩＴ　ＢＶ７１１またはＣＤ１２３　ＰＥ抗体のいずれかで、５０ｕＬ／試料のＢｒｉｌｌｉａｎｔ染色緩衝液（ＢＤ　カタログ番号６５９６１１）を添加して、染色した。

【０２０４】

ｇＤＮＡ抽出、ＰＣＲ増幅、及びサンガー配列決定

Ｑｉａｇｅｎ　ＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ＆Ｔｉｓｓｕｅ　ＫｉｔまたはＬｕｃｉｇｅｎ　ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ試薬を使用して乾燥ペレット試料からゲノムＤＮＡを抽出し、Ｎａｎｏｄｒｏｐ　８０００によって定量化し、目的の配列をＰｒｏｍｅｇａ　ＧｏＴａｑ　Ｇ２及びそれぞれのプライマーを使用してＰＣＲによって増幅した。ＰＣＲ生成物は、Ｐｒｏｍｅｇａ　ＳＶウィザードＧｅｌ及びＰＣＲクリーンアップシステムを使用して精製し、Ｇｅｎｅｗｉｚを介してサンガー配列決定に送った。塩基編集効率は、ハイスループット試料分析用のカスタムスクリプトを使用して、ＥｄｉｔＲ　Ｒパッケージを用いたデコンボリューションによってサンガートレースから計算した。

【０２０５】

コロニー形成アッセイ

コロニー形成単位アッセイ（ＣＦＵ）は、別途記載されない限り、インビトロＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ実験用に１０００ＣＤ３４＋細胞／ウェルをプレーティングすること、または異種移植ＢＭ由来アッセイ用に２５０００総骨髄細胞／ウェルをプレーティングすることによって行った。細胞を、Ｍｅｔｈｏｃｕｌｔ　Ｈ４０３４培地（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　カタログ番号０４０３４）に再懸濁し、ＳｍａｒｔＤｉｓｈ　ｍｅｎｉｓｃｕｓ－ｆｒｅ　６ウェルプレートにプレーティングした。２週間後にＳｔｅｍＣｅｌｌ　ＳＴＥＭｖｉｓｉｏｎシステムを使用してウェルを画像化した。フローサイトメトリー分析では、メチルセルロース培地を温ＰＢＳで柔軟にし、分析前に収集し、２回洗浄した。

【０２０６】

実施例２：受容体バリアントの設計

選択されたモノクローナル抗体クローンによって認識されない変異受容体バリアントを設計するために、異なるｍＡｂによって標的化されるエピトープを、文献の入手可能な情報に従って、または個々の変異受容体バリアントもしくは変異ライブラリをスクリーニングすることによって特定した。全体的な目標は、選択された治療用抗体クローンによる認識を欠いているが、表面発現、遺伝子制御、及びシグナル伝達の機能を保存する、最小限に修飾された標的バリアントの特定であった（図１）。かかる修飾された表面標的を保有する細胞は、標的分子（裸のモノクローナル抗体、毒素コンジュゲート抗体、二重特異性抗体構築物、及びキメラ抗原受容体細胞を含むがこれらに限定されない）に対する免疫療法に曝露された場合に選択的耐性を付与された。

【０２０７】

ＦＬＴ３エピトープ操作：

ＦＬＴ３は、ｉ）細胞外リガンド結合ドメインによって構成され、５つの免疫グロブリン様ドメインの存在を特徴とするＩＩＩ型チロシンキナーゼ受容体であり、ｉｉ）単一にまたがる膜貫通領域、ｉｉｉ）分割されたチロシンキナーゼドメインを含有する細胞内部分を含む。最初の３つの細胞外ドメインは、その二量体リガンド、ＦＬＴ３リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）との結合に関与し、この相互作用が受容体の二量体化を誘導した。二量体化後、ＦＬＴ３の活性化は、細胞内チロシンキナーゼドメインが互いに近接して配置されることによって媒介され、これがその後のそれらのトランスリン酸化を促進する。

【０２０８】

アラインメントは、マウス及びヒトＦＬＴ３／ＦＬＴ３Ｌがアミノ酸レベルで８５．５％同一であること、及びマウス及びヒトＦＬＴ３のＩｇＧ様ドメイン４がアミノ酸レベルで８２％同一（９５．５％類似）であることを示す（図３）。さらに、マウス及びヒトＦＬＴ３／ＦＬＴ３Ｌペアは、相互に交差反応性である。抗ヒトＦＬＴ３治療用抗体クローン４Ｇ８は、ヒトＦＬＴ３を特異的に認識し、エピトープは、細胞外ドメイン４内に局在する。クローン４Ｇ８は、ヒトＦＬＴ３またはマウスＦｌｔ３のいずれかのｃＤＮＡ配列

が構成的ＥＦ１ａプロモーターの下流にクローニングされたスリーピングビューティートランスポゾンシステムを介して、野生型ヒトまたはマウスＦＬＴ３を過剰発現するＫ５６２細胞を染色することにより、他のオルソログバリアント（すなわち、マウスＦｌｔ３）を認識しないことが確認された（図２）。スリーピングビューティートランスポゾンによってコードされるｍＣｈｅｒｒｙ蛍光レポーターを使用して、形質導入細胞を同定した。この証拠に基づいて、オルソログ配列にわたって比較的保存されていない細胞外ドメイン４に位置する１６残基（図３）を、対応するマウスアミノ酸で置換し、生成されたバリアント（ｅＦＬＴ３－０１、配列番号４９）は、クローン４Ｇ８によって認識されなかった（図２）。生成されたバリアントは、依然として表面発現（細胞外ドメイン２に結合する対照抗ＦＬＴ３クローンＢＶ１０Ａ４を使用して確認した）、ＦＬＴ３Ｌ結合（図４Ａ及び４Ｂを参照）、ならびに細胞内シグナル伝達特性を維持している。（図４Ｃを参照）。

【０２０９】

第２のステップとして、ｅＦＬＴ３－０１（配列番号４９）を生成するために導入した１６の変異を、ＦＬＴ３エクソン９またはエクソン１０（合わせてＦＬＴ３細胞外ドメイン４をコードする）のいずれか内のゲノム局在化によって、２つの変異プールに分けた。これら２つのＦＬＴ３バリアントの過剰発現は、ＦＬＴ３エクソン９（配列番号５０）に限定される変異が、配列番号４９と同様に、抗ＦＬＴ３クローン４Ｇ８を無効にするのに十分であることを示した。エクソン１０に限定された変異を有するＦＬＴ３バリアントは、クローン４Ｇ８の結合を無効にしなかった。

【０２１０】

ＦＬＴ３細胞外ドメイン４の抗ＦＬＴ３抗体ＦＬＴ３　４Ｇ８クローンによる認識に関与する重要な残基を特定するために、以前に特定された野生型または変異型のいずれかの１６残基全てを含むコンビナトリアルライブラリを設計し、ＥＦ１アルファプロモーター下でスリーピングビューティートランスポゾントランスファーベクターにクローニングした（ＧｅｎｅＳｃｒｉｐｔ－図５）。ＲＰＢＳＡプロモーター下でｍＣｈｅｒｒｙ耐性及びピューロマイシン耐性を発現するアンチセンスカセットが、形質導入マーカー及び選択方法として機能した。Ｋ５６２細胞に、５、１０、または１００ｎｇのトランスファーベクター及び５００ｎｇのＳＢ１００ｘトランスポザーゼ発現プラスミドを含むＬｏｎｚａ４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ系を使用して、エレクトロポレーションを行った。ヌクレオフェクション細胞を１ｕｇ／ｍＬのピューロマイシンで７日間選択し、次いでフローサイトメトリーで評価した。対照抗体（ＦＬＴ３　ＢＶ１０Ａ４　ＰＥ－Ｃｙ７）に陽性、及び治療用抗体（ＦＬＴ３　４Ｇ８　ＢＶ７１１）に陰性の細胞をＢＤ　Ａｒｉａ　ＩＩソーターでＦＡＣＳ選別し、インビトロで増殖させた。組み込まれたＦＬＴ３ライブラリ領域を、未選別、単一陽性選別、及び二重陽性選別細胞のｇＤＮＡ試料からＰＣＲ増幅し、部分的なＩｌｌｕｍｉｎａアダプターをアンプリコンに付加し、Ｉｌｌｕｍｉｎａプラットフォーム（ＧｅｎｅＷｉｚ）でＮＧＳに供した。３つの試料を比較することにより、１つのコドン（Ｎ３９９）のみが、単一陽性細胞と二重陽性細胞において異なる変異濃縮を示した（図５）。スリーピングビューティー過剰発現系における候補変異（Ｎ３９９Ｄ）の検証により、それが４Ｇ８クローン結合の無効化に十分であることが確認された（図５）。ＦＬＴ３　Ｎ３９９Ｄバリアントを過剰発現するＫ５６２細胞とＡＦ４８８コンジュゲートされた蛍光ＦＬＴ３Ｌとのインキュベーションは、野生型ＦＬＴ３に匹敵するリガンド結合を示した（図５）。

【０２１１】

ＫＩＴエピトープ操作：

入手可能な文献に基づき、抗ＫＩＴ抗体クローンＦａｂ７９Ｄは、ＫＩＴの細胞外ドメイン４における推定アミノ酸接触点を認識する（図３）。したがって、予測される接触アミノ酸のうち１０個をオルソログ配列全体で保存性の低いものに置換することにより、抗ＫＩＴ抗体クローンＦａｂ７９Ｄによって認識されないＫＩＴバリアント（ｅＫＩＴ－０１）を生成した（図６Ａ）。このバリアントは、ヒト幹細胞因子（ＳＣＦ）親和性（図６Ｂ）及びＳＣＦ刺激時の細胞内ドメインのリン酸化（図６Ｃ）を維持していた。クローン

Ｆａｂ７９Ｄ結合の基礎となる特異的アミノ酸を特定するために、各単一アミノ酸変化を、ｍＣｈｅｒｒｙ及びピューロマイシン耐性を共発現するスリーピングビューティートランスファーベクターに個別にクローニングした。２９３Ｔ細胞に、１００ｎｇのトランスファーベクター及び５００ｎｇのＳＢ１００ｘトランスポザーゼを発現するプラスミドを、ＳＦ溶液中でＬｏｎｚａ　４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒシステムを使用してエレクトロポレーションした（図６Ｄ）。細胞を、ピューロマイシン（２ｕｇ／ｍＬ）で選択し、ＫＩＴ　Ｆａｂ７９Ｄ及びＫＩＴ　１０４Ｄ２対照抗体で染色してフローサイトメトリーで分析した。クローン１０４Ｄ２染色（ＫＩＴ　Ｈ３７８Ｒ）によるＫＩＴ発現と比較して、Ｆａｂ７９Ｄ　ＭＦＩが最も低い変異を、塩基編集戦略開発のための候補バリアントとして選択した（図６Ｄ）。

【０２１２】

これらの知見を拡大するために、Ｆａｂ７９Ｄ結合に関与する代替コドンをさらに定義するための包括的なライブラリ的アプローチを設計した。ＫＩＴ細胞外ドメイン４内の各コドンが縮重塩基（ＮＮＮ）から構成された縮重ライブラリを、ヒトＫＩＴ　ｃＤＮＡ、ｍＴａｇＢＦＰレポーター及びピューロマイシン耐性を発現するスリーピングビューティートランスファープラスミドにクローニングした（図７）。ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞にライブラリプラスミド及びｐＳＢ１００Ｘトランスポザーゼプラスミドをエレクトロポレーションして、導入遺伝子の安定な組み込みを可能にした。ピューロマイシン選択後、細胞をＦＡＣＳ選別して、単一陽性及び二重陽性集団を得た。ライブラリ領域をＰＣＲ増幅し、ＮＧＳ配列決定した。二重陽性集団に対する単一陽性集団内のアミノ酸バリアントの相対的濃縮度の比較により、Ｈ３７８（Ｍ３１８、Ｉ３１９、Ｖ３２３、Ｄ３３２、Ｅ３６０、Ｙ３６２、Ｅ３７６）に加えて、Ｆａｂ７９Ｄ結合に関与する追加のコドンが同定された。

【０２１３】

ＣＤ１２３エピトープ操作：

ＣＤ１２３（ＣＤ１２３）については、抗ＣＤ１２３抗体クローン７Ｇ３及びそのヒト化バージョンＣＳＬ３６２が、ＣＤ１２３のＮ末端ドメイン内の推定アミノ酸接触点を認識することが文献で報告されている（図９）。同様に、他の市販のクローン、６Ｈ６及びＳ１８０１６Ｅは、Ｎ末端ドメインに結合することが報告されているが、それらのＣＤ１２３との接触点に関する情報は限られている。ＩＬ３は、ＣＤ１２３のリガンドであり、ＩＬ３結合に重要なＣＤ１２３残基は、Ａｌａスキャンまたは進化的に保存されたアミノ酸変化によってマッピングされている（図９）。

【０２１４】

ＣＤ１２３細胞外ドメイン内の標的エピトープを操作するために、ＣＤ１２３のＮ末端ドメインにおけるＩ５０、Ｅ５１、Ｙ５８、Ｓ５９、Ｒ８４、Ｐ８８、またはＰ８９を標的とするｓｇＲＮＡのセットを設計することによって、直接的な塩基エディタースクリーニングアプローチを使用した（図１０）。これらのｇＲＮＡを、シチジンまたはアデニン塩基エディター（ｅｖｏ－ＡＰＯＢＥＣ１－ＢＥ４、ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ）とともにＣＤ１２３を過剰発現するＫ５６２細胞で試験した。手短に言えば、０．５Ｍの細胞を、ＳＦ溶液中で、Ｌｏｎｚａ　４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒシステムを使用して、製造業者の指示に従ってエレクトロポレーションした。エレクトロポレーション反応には、５００ｎｇの塩基エディター発現プラスミド及び３００～３６０ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）が含まれた。次いで、細胞を培養し、ゲノムＤＮＡ及びフローサイトメトリー分析用の試料を、編集の７２時間後に採取した。いくつかのｍＡｂクローン（７Ｇ３／ＣＳＬ３６２、６Ｈ６、Ｓ１８０１６Ｆ）による認識を欠くが、対照抗体クローン９Ｆ５で染色することによって表面発現を保持するＣＤ１２３変異体を生成したｓｇＲＮＡを、さらなる開発のために選択した（図１０、最も性能が優れた候補ｇＲＮＡのみを以下に報告する：配列番号２４、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３４）。

【０２１５】

前のラウンドで特定されたｓｇＲＮＡに近接する追加の配列を含めて、ｓｇＲＮＡスクリーニングの第２ラウンドを実施し、ＰＡＭ特異性が緩和したバリアントを含むいくつかのＢＥで試験した（ｅｖｏ－ＡＰＯＢＥＣ１－ＢＥ４、ＮＧ－ＥＡ－ＢＥ４ｍａｘ、ＮＧ－Ａ３Ａ－ＢＥ５、ＳｐＲＹ－ｅｖｏ－ＡＰＯＢＥＣ１－ＢＥ４－配列番号８及び配列番号１１、ＮＧ－ＡＢＥ８ｅ、ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｅ－配列番号７及び配列番号１０、ＬｂＣａｓ１２ａ－ＡＢＥ８ｅ－図１１）。クローン７Ｇ３、６Ｈ６及びＳ１８０１６Ｅの結合のフローサイトメトリー評価を、表面発現用の正規化剤としてクローン９Ｆ５を使用して、先に記載した通りに行った。所望の認識喪失を示す条件からｇＤＮＡを抽出し、ＣＤ１２３エクソン２及び３領域をサンガー配列決定して、観察された表現型に関連するアミノ酸変化を得た。抗体クローン７Ｇ３またはそのヒト化対応物では、ＣＳＬ３６２、ＣＤ１２３　Ｓ５９Ｐ（ｇＲＮＡ－Ｎ、ｇＲＮＡ－Ｒ、及びＡＢＥによる関連バリアントによって導入される）及びＳ５９Ｆ（ｇＲＮＡ－Ｌ及びＣＢＥによるバリアントによって導入される）が最良の候補バリアントであった。Ｙ５８Ｈ変異は、バイスタンダーアデニンのＡからＧへの変換により、ｇＲＮＡ－Ｎ及びｇＲＮＡ－Ｒによっても導入された。抗体クローン６Ｈ６及びＳ１８０１６Ｆの結合を無効にするために、Ｐ８８Ｌ／Ｐ８９Ｌ（ｇＲＮＡ－Ｆ及び関連するバリアントによってＣＢＥによって導入された）が最も良好なアミノ酸置換の性能であった。シチジン塩基編集により他のアミノ酸置換（Ｒ８４Ｑ、Ｖ８５Ｍ、Ｖ８５Ｉ、Ａ８６Ｔ）のプールを導入した追加のｇＲＮＡ（ｇＲＮＡ－Ｈ及び関連するバリアント）を同定し、クローン７Ｇ３、６Ｈ６、及びＳ１８０１６Ｆに対する親和性の低減をもたらした（図１１）。

【０２１６】

実施例３：ＦＬＴ３バリアントは、ＦＬＴ３標的化ＣＡＲ－Ｔ細胞に耐性である

ＦＬＴ３バリアントがＦＬＴ３を標的とするＣＡＲ－Ｔ細胞に選択的に耐性であるかどうかを試験するために、インビトロ殺傷アッセイを行った。

【０２１７】

ＣＡＲ－Ｔ細胞産生

構成的ｈＰＧＫプロモーターの下でＣＤ２８膜貫通領域及びＣＤ２８共刺激ドメインを有する第２世代のＦＬＴ３特異的４Ｇ８クローンキメラ抗原受容体を発現するＩＩＩ世代レンチウイルス構築物を、合成されたｄｓＤＮＡ断片（ＩＤＴ　ｇＢｌｏｃｋｓ）を使用してクローニングした。最小ＣＭＶプロモーター下でヒトＥＧＦＲ　ｃＤＮＡの切断型バリアントを発現するアンチセンスカセットを含め、形質導入のマーカー及び抗ＥＧＦＲ抗体セツキシマブを使用したインビボ枯渇の安全スイッチのマーカーとして機能させた。ＶＳＶ－Ｇ偽型自己不活性化レンチウイルス粒子を、公開された方法に従って、ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞における５つのプラスミド（トランスファーベクター、ｐＭＤ２、ｐＭＤＬ－ＲＲＥ、ｐＲＥＶ及びｐＡｄｖａｎｔａｇｅプラスミド）のカルシウム－リン酸一過性同時トランスフェクションにより調製した。ウイルス粒子含有上清を、超遠心分離（２００００ｒｐｍ、２０℃で２時間）によって５００倍に濃縮し、ＰＢＳに再懸濁した。濃縮ＬＶは、異なる濃度で２９３Ｔ細胞を形質導入し、フローサイトメトリーまたはｄｄＰＣＲで形質導入効率を算出することによって滴定した。

【０２１８】

末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、ｆｉｃｏｌｌ勾配遠心分離によって全血から単離した。フローサイトメトリーによるＴ細胞割合の推定後、新たに単離したまたは解凍したＰＢＭＣのいずれかを、ＣＤ３－ＣＤ２８ダイナビーズ（Ｇｉｂｃｏ　１１１３１Ｄ）と３：１のビーズ：Ｔ細胞比で室温にて４５分間、ゆっくりと撹拌して、インキュベートし、次いで磁気分離した（ＤｙｎａＭａｇ－５磁気、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１２３０３Ｄ）。陽性で選択された細胞を、１０％ＦＢＳ、１％Ｐ／Ｓ、ヒトＩＬ－７　５ｎｇ／ｍＬ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、及びヒトＩＬ－１５　５ｎｇ／ｍＬ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）を補充したＩＭＤＭ中で、１Ｍ／ｍＬのダイナビーズを用いて培養した。ダイナビーズ刺激の開始から４８時間後、Ｔ細胞を、選択したＣＡＲをコードするレンチウイルス粒子で、実験に応じてＭＯＩ５～ＭＯＩ１０で形質導入した。刺激開始から７日目にダイナビーズを磁

気分離によって培養から除去し、Ｔ細胞を１０％ＦＢＳ、１％Ｐ／Ｓ、ヒトＩＬ－７　５ｎｇ／ｍＬ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）及びヒトＩＬ－１５　５ｎｇ／ｍＬ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）を添加したＩＭＤＭ中でさらに５～７日間増殖させた。Ｔ細胞表現型及び形質導入効率（ＥＧＦＲ表面染色による）を、フローサイトメトリーによって定期的に評価した。増殖したＣＡＲ－Ｔ細胞または未形質導入Ｔ細胞は、殺傷アッセイ、インビボ投与、または刺激開始から１２～１４日後に即時凍結のいずれかに使用した。

【０２１９】

Ｋ５６２細胞（未修飾、塩基編集、またはスリーピングビューティー形質導入後に受容体バリアントを過剰発現するいずれか）を９６ウェルプレート（２５０００標的細胞／ウェル）に蒔いた。抗ＦＬＴ３　ＣＡＲ－Ｔ細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）に、ＣＤ２８共刺激ドメインを有する第２世代の４Ｇ８－ＣＡＲ構築物をコードするレンチウイルスベクターをＰＢＭＣに形質導入し、ＥＧＦＲｔ（切断型ＥＧＦＲ）安全スイッチ（上記のプロトコル）を共発現することによって生成された。ＦＬＴ３標的化４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞または未形質導入Ｔ細胞を、製造業者の推奨に従ってＣｅｌｌＴｒａｃｅ黄色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃ３４５６７）でマークした。次いで、ＦＬＴ３標的化４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞または未形質導入Ｔ細胞を、異なるエフェクター：標的比（Ｅ：Ｔ比）で、典型的には１０、５、２．５、１．２５、０．６２５で、同じウェルに同時プレーティングし、３７℃、５％　CO_2の加湿インキュベーターでインキュベートした。４時間後、ＦｃＲブロッキング試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　１３０－０５９－９０１）２／１００ｕＬ、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ修正可能な黄色死細胞染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｌ３４９６７）　１／１０００、ＦＬＴ３　ＢＶ１０Ａ４　ＰＥ－Ｃｙ７　２／１００（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　３１３３１４）、ＣＤ４　ＡＰＣ（ＢＤ）２／１００、ＣＤ８　ＢＶ７５０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）２／１００、ＣＤ１０７ａ　ＢＶ７１１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）２／１００、ＣＤ６９　ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）　）２／１００で染色することによるフローサイトメトリー分析用に培養体積の５０％を回収した　。染色ミックスには、細胞数を正規化するための流量計数ビーズ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｃｏｕｎｔ　Ｂｅａｄｓ）を含めた。次いで細胞を洗浄し、アネキシンＶ　ＦＩＴＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）３／１００を添加したアネキシンＶ結合緩衝液（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）に再懸濁した。試料を４レーザーまたは５レーザーＢＤ　Ｆｏｒｔｅｓｓａフローサイトメーターで分析した。残りの培養体積は、プレーティングの４８時間後に、ＦｃＲブロッキング試薬（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　１３０－０５９－９０１）２／１００ｕＬ、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ修正可能な黄色死細胞染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｌ３４９６７）１／１０００、ＦＬＴ３　ＢＶ１０Ａ４　ＰＥ－Ｃｙ７　２／１００（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ　３１３３１４）、ＣＤ４　ＡＰＣ（ＢＤ）２／１００、ＣＤ８　ＢＶ７５０（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）２／１００、ＣＣＲ７　ＢＶ４２１（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）２／１００、ＣＤ４５ＲＡ　ＡＰＣ－Ｃｙ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）３／１００、ＣＤ３３　ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）で染色したフローサイトメトリーによって評価した。次いで細胞を洗浄し、アネキシンＶ　ＦＩＴＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）３／１００を添加したアネキシンＶ結合緩衝液（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ）に再懸濁した。

【０２２０】

図１２Ａは、ＣＡＲ－Ｔ細胞媒介性殺傷に対する修飾ＦＬＴ３バリアントの耐性を評価するための共培養殺傷アッセイの実験設計を示す。図１２Ｂは、インキュベーションの４時間後及び４８時間後の生細胞の共培養組成を示すフローサイトメトリープロットである。上横列は、ＷＴまたは操作されたＫ５６２細胞でのフローサイトメトリーによるＦＬＴ３発現を示す。未修飾の野生型ＦＬＴ３を発現する細胞は選択的に殺傷されるが、操作されたＦＬＴ３（ｅ９－ＦＬＴ３）は残される。図１２Ｃは、インキュベーションの４時間後のＡｎｎｅｘｉｎＶ及びＬｉｖｅＤｅａｄ黄色染色による標的細胞の生存率を示す。図１２Ｄは、未修飾ＦＬＴ３を発現する標的細胞に曝露されたＦＬＴ３－ＣＡＲ－Ｔのみの４時間でのＣＤ１０７ａ表面染色による選択的なＴ細胞の脱顆粒化を示す。図１２Ｅは、未修飾ＦＬＴ３を発現する標的細胞に曝露されたＦＬＴ３－ＣＡＲ－Ｔのみの共培養の４

８時間後の色素希釈（ＣｅｌｌＴｒａｃｅ　ｙｅｌｌｏｗ）による選択的なＴ細胞の増殖を示す。未修飾Ｋ５６２：野生型細胞；ＷＴ　ＦＬＴ３　ＯＥ：内因性プロモーターからのＦＬＴ３過剰発現を有するＫ５６２レポーター細胞株（レポーター細胞株の生成を参照）；「ＷＴ　ＦＬＴ３　ＯＥ（スリーピングビューティー）」及び「ｅ９　ＦＬＴ３　ＯＥ（スリーピングビューティー）」：ＦＬＴ３バリアントの過剰発現を駆動するスリーピングビューティートランスポゾンで形質導入されたＫ５６２細胞。ｅ９－ＦＬＴ３バリアントは、ＷＴ－ＦＬＴ３と比較して、Ｎ３９９Ｄ（配列番号５０）を含む１２のアミノ酸変化を有した。

【０２２１】

実施例４：ＦＬＴ３にＮ３９９Ｄを導入するための相同性指向修復

ＦＬＴ３　Ｎ３９９Ｄが相同性指向修復によって導入され得るかどうかを試験するために、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ相同性指向修復（ＨＤＲ）戦略を設計した。ＦＬＴ３エクソン９遺伝子座を標的とするいくつかのｇＲＮＡと組み合わせたＳｐＣａｓ９またはＡｓＣａｓ１２ａヌクレアーゼを、ＨＤＲ用のドナー鋳型としての２００ｎｔの長い一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）と組み合わせて試験した。各ドナー鋳型は、ＤＮＡ修復が成功した後にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９　ＲＮＰヌクレアーゼ複合体によって再切断されるリスクを低減させるために、バイスタンダーアミノ酸に選択されたサイレント変異を含む。各ｓｓＯＤＮドナー（Ａ、Ｃ、Ｈ、Ｆと呼ばれる）の逆相補型も試験した。ｓｓＯＤＮ鋳型ドナーの配列を、配列番号４０～４３（上記の表２を参照）に報告する。内因性ＦＬＴ３遺伝子座の上流でＥＦ１－ａプロモーターの標的組み込みによってＦＬＴ３を過剰発現するＫ５６２レポーター細胞を、実験条件に従って、６２．５ｐｍｏｌのアニーリングしたｔｒＲＮＡ：ｇＲＮＡと複合体化した５０ｐｍｏｌの３ｘＮＬＳ　Ｃａｓ９ヌクレアーゼ（ＩＤＴ）または６２．５ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡと複合体化した５０ｐｍｏｌのＡｓＣａｓ１２ａ　Ｕｌｔｒａ（ＩＤＴ）を添加したＳＦ溶液中でＬｏｎｚａ　４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ系を使用して、エレクトロポレーションした。。Ｃａｓ９　ｇＲＮＡ　ｅ９－４－ＮＧＧを、ｓｓＯＤＮ－Ａ及びＣならびにそれらの逆相補体（５ｕＭ最終濃度）と組み合わせて試験した。Ｃａｓ１２ａ　ｇＲＮＡ　ｅ９－１５－ＴＴＴＶ及びｅ９－１６－ＴＴＴＶを、ｓｓＯＤＮ－Ｈ及びＦ、ならびにそれらの逆相補体（５ｕＭ最終濃度）と組み合わせて試験した。ＩＤＴ　ＨＤＲエンハンサー０．２ｕＬ／２０ｕＬをエレクトロポレーション反応に含めた（３０ｕＭ）。編集手順の結果は、エレクトロポレーションの７２時間後にフローサイトメトリーによって評価した。図１３Ａ（上）は、Ｎ３９９残基を強調表示したＦＬＴ３のエクソン９を示し、３つのｇＲＮＡ（１つのＳｐＣａｓ９　ｇＲＮＡ（ｅ９－４－ＮＧＧ）及び２つのＣａｓ１２ａ　ｇＲＮＡ（ｅ９－１５－ＴＴＴＶ及びｅ９－１６－ＴＴＴＶ））に対するその相対位置を示す。ｇＲＮＡを標的とするＦＬＴ３エクソン９を、配列番号１３～１６（上記の表１を参照）に報告する。図１３Ａ（下）は、相同性指向修復によりＮ３９９Ｄ（矢印）変異を挿入するために利用された一本鎖オリゴ－デオキシヌクレオチドドナー鋳型を示す。追加のサイレント単一ヌクレオチド変化を鋳型設計に含めて、Ｃａｓ９－ｇＲＮＡ複合体による再切断の速度を低下させた（暗正方形）。

【０２２２】

図１３Ｂは、表面発現用の正規化剤としてＦＬＴ３クローン１０４Ｄ２で染色し、Ｎ３９９Ｄ変異の効率を評価するためにクローン４Ｇ８で染色したＫ５６２レポーター細胞のエレクトロポレーションの７２時間後のＦＡＣＳプロットを示す。編集に成功した細胞を黒い長方形で強調表示し、これは、ｍＡｂクローン４Ｇ８による認識の喪失をもたらすＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ相同性指向修復を介して、Ｎ３９９Ｄ変異がヒト細胞株に挿入され得ることを示している。

【０２２３】

実施例５：Ｎ３９９位のＦＬＴ３変異は、ＣＲＩＳＰＲアデニン塩基エディターによって導入することができる

ＦＬＴ３遺伝子座において、二本鎖ＤＮＡ切断を導入せずに、高効率かつ低毒性で所望

の単一コドン変化を導入するために、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ塩基編集を試験した。アデニン塩基エディターと組み合わせてＮ３９９ＤまたはＮ３９９Ｇの変異を導入すると予測されるｓｇＲＮＡのパネルを設計した。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９塩基エディターＡＢＥ８ｅ（ＴａｄＡ－８ｅ　Ｖ１０６Ｗ）を編集方針の開発のために選択し、従来のＮＧＧ　ＰＡＭの非存在下で編集を可能にするためにＣａｓ９ニッカーゼタンパク質を変異させてＰＡＭ特異性を緩和することによってさらに最適化した。この目的のために、塩基エディターのＮＧ－ＳｐＣａｓ９バリアントとＳｐＲＹ－Ｃａｓ９バリアントの両方をクローニングした。効率をさらに増加させるために、３番目の核局在化部位（ＮＬＳ）をタンパク質のＣ末端部分に融合させた。別途記載されない限り、塩基編集実験は、５００ｎｇの塩基エディタープラスミド及び３００～３６０ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）のいずれかを用いて、ＦＬＴ３遺伝子を過剰発現するレポーターＫ５６２のエレクトロポレーションによって実施した。次いで、細胞を培養し、ゲノムＤＮＡ及びフローサイトメトリー分析用の試料を、編集の７２時間後に採取した。

【０２２４】

図１４は、Ｎ３９９塩基編集のためのＰＡＭ要件を例示する代表的な実験を示す。ＮＧＰＡＭ（配列番号１７及び配列番号１８、上記の表１を参照）を有する２つのＳｐＣａｓ９　ｓｇＲＮＡを、ＷＴ－ＳｐＣａｓ９ニッカーゼ（ＰＡＭ要件：ＮＧＧ）、ＮＧ－ＳｐＣａｓ９ニッカーゼ（ＰＡＭ要件：ＮＧ）、及びＳｐＲＹ－Ｃａｓ９ニッカーゼ（ＰＡＭ要件：ＮＲＮ）、ＡＢＥ構築物を用いて試験した。図１４Ａは、ＦＬＴ３遺伝子におけるｓｇＲＮＡ及びＮ３９９コドンの相対位置を示す。図１４Ｂ、標的アデニンに下線を引いたｇＲＮＡプロトスペーサー配列。図１４Ｃは、３つのアデニン塩基エディター構築物（Ｖ１０６Ｗ変異を有するかまたは有しないＴａｄＡデアミナーゼドメインに連結された野生型Ｃａｓ９、ＮＧ－Ｃａｓ９、またはＳｐＲＹ－Ｃａｓ９バリアント）の設計を示す。Ｖ１０６Ｗ変異は、アデニン塩基エディターの既知の望ましくない影響である低減したＲＮＡ編集に関連している。ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ及びＮＧ－ＡＢＥ８ｅは、Ａｄｄｇｅｎｅを介して入手可能である（それぞれ、カタログ製品番号１３８４９５及び番号１３８４９１）。クローニングされたＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ（配列番号７及び配列番号８）は、追加のＣ末端ヌクレオプラスミン核局在化配列（ＮＬＳ）を含んでいた。エレクトロポレーションの７２時間後の塩基編集の結果のＦＡＣＳプロットを図１４Ｄに表す。ここで、Ｋ５６２細胞を、抗ＦＬＴ３クローンＢＶ１０Ａ４（正規化）及び４Ｇ８（治療用Ａｂ）で染色した。編集された細胞の割合を、各条件のＦＡＣＳプロットの右下に報告する。ＰＡＭ特異性が緩和された塩基エディターバリアント（ＮＧ－ＡＢＥ８ｅ及びＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ）のみが効率的な編集を示し、最大４１．１％の細胞がクローン４Ｇ８染色に対して陰性になる。

【０２２５】

Ｎ３９９コドンの塩基編集の効率を改善するために、目的の編集ウィンドウの位置決めを、ほぼＰＡＭのないＳｐＲＹ－Ｃａｓ９バリアントと組み合わせて追加のｓｇＲＮＡをスクリーニングすることによって達成した。図１５Ａは、ＦＬＴ３　Ｎ３９９のゲノムコンテキスト及び５つのｓｇＲＮＡに対するその位置を示す。ｓｇＲＮＡには、前の実施例からの２つのｓｇＲＮＡ（配列番号１７及び配列番号１８）、ならびにＮＲＮ　ＰＡＭを有する３つの追加のｇＲＮＡ（配列番号１９、配列番号２０、及び配列番号２３）が含まれる。図１５Ｂは、標的アデニンに下線が引かれたｓｇＲＮＡプロトスペーサー配列を示す。図１５Ｃは、Ｋ５６２細胞への５００ｎｇの塩基エディター発現プラスミド及び３６０ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡのエレクトロポレーションによる塩基編集実験のＦＡＣＳプロットである。編集された細胞の割合を、各条件のＦＡＣＳプロットの右下に報告する。ｓｇＲＮＡ　ＦＬＴ３＿ｅ９＿１８と組み合わせたＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗは、フローサイトメトリーによって最高の効率を達成し、編集された細胞の最大６６．３％はクローン４Ｇ８によって認識されない。

【０２２６】

実施例６：ＡＢＥによって導入されたＦＬＴ３変異は、タンパク質発現及びリガンド結合を保存する

実施例５からの塩基編集細胞のサンガー配列決定により、Ｎ３９９ＤまたはＮ３９９Ｇのいずれかの変異が潜在的に生成されるＮ３９９コドン（配列：ＡＡＣ）内での両方のアデニンのＡからＧへの編集が明らかとなった。Ｎ３９９位に変異を含有するＦＬＴ３バリアントが依然として生理的ＦＬＴ３Ｌ結合を維持するかどうかをさらに試験するために、蛍光リガンド結合アッセイを実施した。図１６Ａは、様々なＦＬＴ３バリアント：Ｎ３３９Ｄ（配列番号５１）、Ｎ３９９Ｇ（配列番号５２）、エクソン９変異（配列番号５０）、またはＷＴ　ＦＬＴ３（配列番号４８）を発現するＫ５６２細胞で行った蛍光リガンド結合アッセイを示す。ＦＬＴ３Ｌ　ＡＦ４８８とＦＬＴ３　ＢＶ１０Ａ４　ＰＥ－Ｃｙ７との間の蛍光比を、各プロットにおいて報告する。図１６Ｂは、各バリアントについて、ＦＬＴ３Ｌ　ＡＦ４８８とＦＬＴ３　ＢＶ１０Ａ４　ＰＥ－Ｃｙ７との間の蛍光比の分布（ヒストグラム）を示す。データは、ＦＬＴ３アデニン塩基編集に起因するＮ３９９Ｄ及びＮ３９９Ｇバリアントが、生理的ＦＬＴ３Ｌ結合親和性を維持していることを示す。

【０２２７】

実施例７：ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　ｍＲＮＡの使用は、ヒト白血病細胞株及びヒトＣＤ３４＋　ＨＳＰＣにおいて高効率の塩基編集をもたらす

塩基編集手順を初代細胞に翻訳するためには、細菌プラスミドトランスフェクションは幹細胞に対して毒性であると報告されているため、塩基エディターに好適な送達方法を開発する必要がある。

【０２２８】

インビトロ転写によって産生された塩基エディターｍＲＮＡを使用して、塩基編集プロトコルをヒトＣＤ３４＋　ＨＳＰＣに翻訳した。アデニン塩基エディター（ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　３ｘＮＬＳまたはＳｐＲＹ－Ｋ９１８Ｎ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　３ｘＮＬＳ）をコードする機能的ｍＲＮＡを、ＭＥＧＡｓｃｒｉｐｔ　Ｔ７転写キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＡＭ１３３３）またはＮＥＢ　Ｔ７　ＨｉＳｃｒｉｂｅキット（Ｅ２０４０Ｓ）及びカスタムプラスミド（配列番号８１、図１７Ａ及び以下を参照）鋳型（Ｔ７プロモーター配列、最小５’ＵＴＲの下流、ならびに２コピーのＨＢＢ（ヘモグロビンＢ）３’ＵＴＲ及びポリＡ配列（６０～１２０ｂｐ長）の上流に塩基エディターのリーディングフレームをコードする）を使用して、インビトロ転写（ＩＶＴ）によって産生した。図１７Ｂは、初代ヒトＣＤ３４＋塩基編集のための共転写的に５’キャッピング及び３’ポリアデニル化されたｍＲＮＡの生成に利用したインビトロ転写ワークフローを例示する。共転写キャッピングは、ＧＴＰの８０％を３’－Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ　ＲＮＡキャップ構造類似体（ＮＥＢ　Ｓ１４１１）で置換することによって達成された。ＩＶＴ反応生成物を、Ｑｉａｇｅｎ　ＲＮＡｅｓｙミニＫＩＴまたはＮＥＢ　Ｍｏｎａｒｃｈ　ｍＲＮＡ　ＣｌｅａｎＵｐ（Ｔ２０５０Ｌ）のいずれかを使用して精製し、Ｎａｎｏｄｒｏｐにより定量化し、品質管理のためにＡｇｉｌｅｎｔ　Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒにより分析した（典型的なエレクトロフェログラムを図１７Ｃに示す。

【０２２９】

配列番号８１－５’ＵＴＲ、ＨＢＢ　３’ＵＴＲｘ２、及び１２０ｂｐ長のポリＡテールを含む、ＳｐＲＹ＿ＡＢＥ８ｅ＿Ｖ１０６Ｗアデニン塩基エディターのインビトロ転写のためのｐｍＲＮＡプラスミド

【化４８－１】

atatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattat
gcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcat
cgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttg
actcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcac
caaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatggg
cggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctggtttagtgaaccgtcaga
tccgctagagatccgcggccgcAGCGCTGGTACCtaatacgactcactatagggagaCT
GCCAAGatgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaa
agtctctgaggtggagttttcccacgagtactggatgagacatgccctgaccctggcca
agagggcacgggatgagagggaggtgcctgtgggagccgtgctggtgctgaacaataga
gtgatcggcgagggctggaacagagccatcggcctgcacgacccaacagcccatgccga
aattatggccctgagacagggcggcctggtcatgcagaactacagactgattgacgcca

【化４８－２】

ccctgtacgtgacattcgagccttgcgtgatgtgcgccggcgccatgatccactctagg
atcggccgcgtggtgtttggatggagaaattctaaaagaggcgccgcaggctccctgat
gaacgtgctgaactaccccggcatgaatcaccgcgtcgaaattaccgagggaatcctgg
cagatgaatgtgccgccctgctgtgcgatttctatcggatgcctagacaggtgttcaat
gctcagaagaaggcccagagctccatcaactccggaggatctagcggaggctcctctgg
ctctgagacacctggcacaagcgagagcgcaacacctgaaagcagcgggggcagcagcg
gggggtcagacaagaagtacagcatcggcctggccatcggcaccaactctgtgggctgg
gccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacac
cgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaa
cagccgagAGAacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaac
cggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagctt
cttccacagactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcacc
ccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatctac
cacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggctgatctatct
ggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaacc
ccgacaacagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctg
ttcgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccag
actgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgcccggcgagaagaaga
atggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgacccccaacttcaagagc
aacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacga
cctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgcca
agaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcacc
aaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacgacgagcaccaccaggacctgac
cctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagattttcttcg
accagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttc
tacaagttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaa
gctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccc
accagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttaccca
ttcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcccctacta

【化４８－３】

cgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgagg
aaaccatcacccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagc
ttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaa
gcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaaatacg
tgaccgagggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtg
gacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactactt
caagaaaatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacg
cctccctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggac
aatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttgagga
cagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagtga
tgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatc
aacggcatccgggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacgg
cttcgccaacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgacctttaaagagg
acatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgccaat
ctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtggacga
gctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagag
agaaccagaccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaa
gagggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacaccca
gctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacgtgg
accaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccatatcgtgcctcag
agctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccg
gggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggc
ggcagctgctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggcc
gagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctggtgga
aacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacactaagt
acgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctg
gtgtccgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactacca
ccacgcccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtacc
ctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatg

【化４８－４】

atcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttctacagcaa
catcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggc
ctctgatcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggatttt
gccaccgtgcggaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggt
gcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcAGAcccaagaggaacagcgataagctga
tcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcCTTTGGcccaccgtg
gcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagag
tgtgaaagagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatccca
tcgactttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctg
cctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgccAA
GCaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctgtacc
tggccagccactatgagaagctgaagggctcccccgaggataatgagcagaaacagctg
tttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctc
caagagagtgatcctggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagc
accgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctgacc
aGActgggagcccctAGAgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccCTaagCAAta
caGAagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgt
acgagacacggatcgacctgtctcagctgggaggtgactctggcggctcaaaaagaacc
gccgacggcagcgaattcgagcccaagaagaagaggaaagtcggcagcggaagcaaaag
gccggcggccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaagctcgagtaaaccggtC
CCGGGtctagaagctcgctttcttgctgtccaatttctattaaaggttcctttgttccc
taagtccaactactaaactgggggatattatgaagggccttgagcatctggattctgcc
taataaaaaacatttatttcattgctcATGCATatagaagctcgctttcttgctgtcc
aatttctattaaaggttcctttgttccctaagtccaactactaaactgggggatattat
gaagggccttgagcatctggattctgcctaataaaaaacatttatttcattgctcttA
GCtaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaGTCTTCactagtAAGCTGCTGATaaacccgctgatcagcctcgactgtgcc
ttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctggaag

【化４８－５】

gtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagt
aggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaaggggaggattggga
agtcaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcggaaagaa
ccagctggggctcgataccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatggtcatag
ctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaag
cataaagtgtaaagcctagggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgc
gctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggc
caacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactga
ctcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaa
tacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccag
caaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccc
ccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggac
tataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacc
ctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctca
tagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtg
tgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgag
tccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattag
cagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggct
acactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaa
agagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgt
ttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttt
ctacggggtctgacactcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgaga
ttatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaat
ctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcac
ctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtag
ataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgaga
cccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagc
gcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaa
gctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacagg

【化４８－６】

catcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgat
caaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcct
ccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcact
gcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtact
caaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtca
atacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacg
ttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaac
ccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtga
gcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttg
aatactcatactcttcctttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctca
tgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcaca
tttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatcgatctcccgatcccct
agggtcgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatctgctcc
ctgcttgtgtgttggaggtcgctgagtagtgcgcgagcaaaatttaagctacaacaagg
caaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggttaggcgttttgcgctgct
tcgcgatgtacgggccagatatacgcgttgacattgattattgactagttattaatagt
aatcaattacggggtcattagttcatagcccatatattgagttccgcgttacataactt
acggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataat
gacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagt
atttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatc

【０２３０】

図１８エレクトロポレーションされたＩＶＴ　ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　３ｘＮＬＳ塩基エディターｍＲＮＡを異なる用量（２０ｕＬのエレクトロポレーション体積中０．５～５ｕｇ）及び１８０または３６０ｐｍｏｌのいずれかのＦＬＴ３－ｅ９－１８ｓｇＲＮＡを使用して、Ｋ５６２レポーター細胞での塩基編集実験を例示する。編集された細胞を、発現正規化のために４Ｇ８クローン（標的化抗体）及びＢＶ１０Ａ４クローンで染色した（図１８Ａ）。フローサイトメトリーによる編集された細胞の割合を、各プロットの右下に報告する。図１８Ｂは、フローサイトメトリーによるｍＲＮＡ／ｇＲＮＡの用量と編集効率との関係を示す。図１８Ｃは、フローサイトメトリー（ＬｉｖｅＤｅａｄ黄色染色）によるｍＲＮＡ／ｇＲＮＡ用量と細胞生存率との関係を示す。図１９Ａの実験の試料由来のＰＣＲ増幅ｇＤＮＡのサンガー配列決定による塩基編集効率を示すヒートマップである。ＥｄｉｔＲパッケージを使用してサンガートレースを逆畳み込み、ＡからＧへの変換効率を計算した。ｇＲＮＡ及びｍＲＮＡの用量を左側で報告し、ｇＲＮＡ配列内の標的アデニンの番号付けを縦列として報告する（ＰＡＭは２１～２３位に対応している）。図１９Ｂは、フローサイトメトリー（４Ｇ８－細胞）による編集効率とサンガー配列決定との関係を報告する。

【０２３１】

初代ヒトＣＤ３４＋造血幹細胞及び前駆細胞のＦＬＴ３塩基編集が実施可能であることを確認するために、インビトロ塩基編集及び増殖培養実験を行った。動員末梢血由来ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣを解凍し、１％　ペニシリン／ストレプトマイシン、ＳＣＦ　１００ｎｇ／ｍＬ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、ＦＴＬ３Ｌ　１００ｎｇ／ｍＬ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ

）、ＴＰＯ　５０ｎｇ／ｍＬ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、Ｓｔｅｍｒｅｇｅｎｉｎ－１　０．７５ｕＭ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＵＭ１７１　３５ｎＭ（Ｓｅｌｌｅｃｋｈｅｍ）を補充したＳｔｅｍＣｅｌｌ　ＳＦＥＭＩＩ培地で、５０～７５万個／ｍＬで培養した。解凍の４８時間後、２．５～７．５ｕｇの塩基エディターｍＲＮＡ（ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ）及び２０ｕＬ反応あたり２５０～４５０ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＰ３エレクトロポレーション溶液（Ｌｏｎｚａ）中で、Ｌｏｎｚａ　４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒシステムを使用して、０．１５～０．２５百万（Ｍ）個のＨＳＰＣをエレクトロポレーションした。細胞を前述の培地で５～７日間培養した。ＣＡＲ－Ｔ細胞殺傷に特異的な耐性について試験するために、編集または未編集のＣＤ３４＋細胞を、編集後にインビトロで３日間増殖させ、次いで、抗ＦＬＴ３　ＣＡＲ－Ｔ細胞または未形質導入Ｔ細胞のいずれかと共培養した。

【０２３２】

図２０Ａは、動員末梢血由来ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣのインビトロ増殖培養及びＦＬＴ３塩基編集のための実験レイアウト及びタイムラインを示す。細胞に、１、２．５、または５ｕｇのいずれかのＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　３ｘＮＬＳ　ｍＲＮＡ及び１８０または３６０ｐｍｏｌのＦＬＴ３－ｅ９－１８　ｓｇＲＮＡをエレクトロポレーションした。図２０Ｂは、インビトロ増殖培養中のＣＤ３４＋細胞のフローサイトメトリー免疫表現型のためのゲーティング戦略を例示する。図２０Ｃは、異なる塩基編集条件と比較した、ＣＤ３４＋細胞のインビトロでの増殖倍率を示す。これは、未処理の対照と比較して、塩基編集手順の限定された毒性を示している。図２０Ｄは、編集後３日目及び６日目の培養ＣＤ３４＋のフローサイトメトリーによる組成を要約する。これは、エレクトロポレーション及びｍＲＮＡ塩基編集時の幹細胞及び前駆細胞サブセットの偏りがないことを示す。

【０２３３】

エレクトロポレーション後６日目のサンガー配列決定による編集効率を図２１Ａに報告する。ｇＲＮＡ及びｍＲＮＡの用量は左側に報告し、一方、ｇＲＮＡ配列内の標的アデニンの番号付けを列として報告する（ＰＡＭは２１～２３位に対応している）。ヒトＣＤ３４＋　ＨＳＰＣにおける塩基編集効率と異なるｇＲＮＡ×ｍＲＮＡ用量との関係を図２１Ｂに散布図として報告する。

【０２３４】

実施例８：ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　ｍＲＮＡを用いたヒトＦＬＴ３発現白血病細胞株またはヒトＣＤ３４＋　ＨＳＰＣのＦＬＴ３塩基編集は、４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞に対する耐性を付与する

図１８で行った実験から得られた塩基編集された細胞が４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞に耐性であるかどうかを試験するために、以前に報告されたように共培養実験を行った。異なるエフェクター：標的比での共培養の４時間後の生存細胞のフローサイトメトリープロットを図２２Ａに報告する。編集された細胞（編集効率約８９％）は、ＣＡＲ－Ｔ細胞殺傷から保護され、より高いＥ：Ｔ比で生存する。図２２Ｂは、４Ｇ８抗ＦＬＴ３　ＣＡＲ－Ｔ細胞または未形質導入Ｔ細胞のいずれかとの共培養後４時間でのアネキシンＶ及びＬｉｖｅＤｅａｄ黄色染色による標的細胞（未編集またはＦＬＴ３塩基編集Ｋ５６２）の生存率を報告し、非修飾細胞の選択的殺傷を強調している。未編集またはＦＬＴ３塩基編集Ｋ５６２細胞のいずれかとの共培養の４時間における表面ＣＤ１０７ａ染色によるＣＡＲ－Ｔ／Ｔ細胞の脱顆粒を図２２Ｃに報告する。未修飾細胞に曝露されたＣＡＲ－Ｔ細胞のみが有意な脱顆粒を示す。

【０２３５】

同様に、塩基編集されたヒト造血幹細胞及び前駆細胞がＦＬＴ３標的化免疫療法に耐性であるかどうかを試験するために、図２０で行った実験において編集を行ったＣＤ３４＋を、４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞または未形質導入Ｔ細胞と共培養した。図２３は、図２０の実験の３日目の培養からの、未修飾またはＦＬＴ３塩基編集ｍＰＢ　ＣＤ３４＋細胞（編

集効率約４６％）とのＣＡＲ－Ｔ細胞の共培養実験を示す。４Ｇ８抗ＦＬＴ３　ＣＡＲ－Ｔ細胞または未形質導入Ｔ細胞のいずれかとの異なるエフェクター：標的比での共培養の４８時間時点での生存細胞のフローサイトメトリープロットを図２３Ａに報告する。４Ｇ８抗ＦＬＴ３　ＣＡＲ－Ｔ細胞または未形質導入Ｔ細胞のいずれかと異なるエフェクター：標的比で共培養したＣＤ３４＋細胞の特異的な殺傷を図２３Ｂに報告する。幹細胞濃縮ＣＤ３４＋９０＋サブセットの特異的な殺傷を図２３Ｃに報告する。細胞株で行った実験と比較してＣＡＲ－Ｔ媒介性殺傷の差異が顕著ではないが、ＦＬＴ３Ｌに曝露された培養ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣによるＦＬＴ３の発現が比較的低いため、修飾ＨＳＰＣは、ＦＬＴ３編集によって付与される耐性を示し、内部での差異がより大きい。より多くの幹細胞濃縮ＣＤ９０＋細胞。

【０２３６】

実施例９：ＦＬＴ３編集ＨＳＰＣは、インビボでＣＡＲ－Ｔ細胞媒介性殺傷によって保護される

抗ＦＬＴ３　ＣＡＲ－Ｔ細胞によって媒介されるオンターゲット殺傷に対する保護的な役割をさらに確認するために、免疫不全ＮＳＧマウスにおけるインビボ異種移植実験を行った（図２４Ａは実験設計を示す）。ヒト総動員末梢血由来ＣＤ３４＋ＨＳＰＣを、上記で例示したように編集し、準致死照射（２．５Ｇｙ）の２４時間後に尾静脈注射によってマウスあたり１００万で移植した。非編集ＨＳＰＣを異種移植したマウスが対照群として機能した。各群をさらに、移植後７週目に、ビヒクル（ＰＢＳ）または４Ｇ８－ＣＡＲＴ細胞のいずれか、マウスあたり１５０万細胞の２つの処置サブセットに分けた。マウスを８週目（ＣＡＲ－Ｔ細胞処理から１週間後）に安楽死させた。フローサイトメトリーによるヒト骨髄生着（ヒトＣＤ４５＋細胞に対する％、ＣＤ３＋細胞を除く）及びヒト絶対ＣＤ４５＋細胞数を図２４Ｂに報告する。ＣＤ３＋は、注射されたＣＡＲ－Ｔ細胞に由来するため、ヒト生着から除外する。未編集の細胞を移植したマウスでは、ヒト生着のより深刻な枯渇が観察される。骨髄上のヒト生着組成物（ＣＤ３＋細胞は除外する）を図２４Ｃに報告する。これは、編集されたＨＳＰＣによって生成された多系統生着を示している。

【０２３７】

造血幹細胞及び前駆細胞の頻度（ＣＤ３４＋ＣＤ３８－）ならびに　殺時の骨髄における絶対存在量を図２５Ａに報告する。これは、ＣＡＲ－Ｔ媒介性殺傷に対するＦＬＴ３塩基編集の保護効果を示している。各群のマウスの骨髄分析からのプールされた事象から得られた例示的なフローサイトメトリープロットを図２５Ｄ（ゲーティング戦略）及び図２５Ｅ（系統－ＣＤ３４＋３８－持続細胞の画分）に報告する。表面ＣＤ６９染色による処置マウスの脾臓におけるＣＡＲ－Ｔ細胞の比較的高い活性化を図２５Ｂに示す。ＣＡＲ－Ｔ細胞をＥＧＦＲ染色によって同定した（マーカー及び安全スイッチとしてのＣＡＲと共発現させた）。処置されたマウスの脾臓におけるＣＤ６２Ｌ及びＣＤ４５ＲＡの発現によるＣＡＲ－Ｔ細胞表現型を図２５Ｃに報告する。ナイーブ：ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋；セントラルメモリ（ＣＭ）：ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ＋；エフェクターメモリ（ＥＭ）：ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ－；最終分化エフェクターメモリ（ＴＥＭＲＡ）：ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ－。エフェクターサブセットに向かう相対的な偏りは、未編集のＨＳＰＣで異種移植された処置マウスにおいて明らかである。

【０２３８】

ＣＡＲ－Ｔ細胞殺傷に対するＮ３９９のＦＬＴ３塩基編集によるＣＤ３４＋　ＨＳＰＣの保護をさらに評価するために、ＮＢＳＧＷマウスで第２の実験的なインビボ実験を行った。これにより、照射せずに、ヒトＨＳＰＣの異種移植及び生着が可能になり、マウスＨＳＰＣにおける低形質Ｋｉｔ変異のおかけで、（ホモ接合型Ｗ４１アレル）より高いレベルのヒト造血再構成が可能になる。図３２は、８週目の出血時の生着ヒト細胞での実験設定及びＦＬＴ３塩基編集効率を報告する。処置群は、移植後１１週目に２５０万個の４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞を受け、その後、移植後１３週目に安楽死させた。この実験設定により、ＦＬＴ３塩基編集によって付与される骨髄系前駆細胞及び系統保護の改善された評価

が可能になった。図３３Ａは、ＡＡＶＳ１対照編集細胞と比較して、ＦＬＴ３編集ＨＳＰＣを移植されたマウスにおける明確な保護を伴う　殺時の骨髄でのフローサイトメトリーによる顆粒球（多形核細胞、ＰＭＮ）の相対的存在量を示す。成熟顆粒球はＦＬＴ３を発現しないため、これは前駆細胞レベルでのある程度の保護を示す。この仮説と一致して、系統－ＣＤ３４＋ＣＤ３８＋ＦＬＴ３＋ＣＤ４５ＲＡ＋として定義される顆粒単球前駆細胞（ＧＭＰ）は、モック編集ＨＳＰＣを異種移植したマウスにおいてのみＦＬＴ３　ＣＡＲ－Ｔ細胞によって選択的に枯渇する（図３３Ａ）。図３３Ｂは、４Ｇ８－ＣＡＲ処理群または未処理群におけるいくつかの時点でのＦＬＴ３塩基編集効率を報告する。４Ｇ８－ＣＡＲ投与時に、未修飾細胞の進行性のネガティブ選択があり、ＦＬＴ３編集細胞の選択をもたらす（これは、処理マウスの骨髄試料とともにプレーティングしたコロニー形成単位アッセイに由来する子孫においてより明らかである）。顆粒球、顆粒－単球前駆細胞（ＧＭＰ）、及びＨＳＰＣ（系統－ＣＤ３４＋ＣＤ３８－ＣＤ９０＋ＣＤ４５ＲＡ－）集団を示す代表的なＦＡＣＳプロットを図３４に報告する。

【０２３９】

実施例１０：ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　ｍＲＮＡを用いたヒトＣＤ３４＋　ＨＳＰＣのＣＤ１２３塩基編集は実現可能であり、ＦＬＴ３塩基編集との多重化が可能である。

　ＦＬＴ３塩基編集実験と同様に、本発明者らは、ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　ｍＲＮＡ及びＣＤ１２３　ｇＲＮＡ－Ｎを、単独で、またはＦＬＴ３　Ｎ３９９塩基編集と組み合わせて、ヒトＣＤ３４＋　ＨＳＰＣに使用して導入した。動員末梢血由来ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣを解凍し、１％　ペニシリン／ストレプトマイシン、ＳＣＦ　１００ｎｇ／ｍＬ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、ＦＴＬ３Ｌ　１００ｎｇ／ｍＬ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、ＴＰＯ　５０ｎｇ／ｍＬ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、Ｓｔｅｍｒｅｇｅｎｉｎ－１　０．７５ｕＭ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＵＭ１７１　３５ｎＭ（Ｓｅｌｌｅｃｋｈｅｍ）を補充したＳｔｅｍＣｅｌｌ　ＳＦＥＭＩＩ培地で、５０～７５万個／ｍＬで培養した。解凍の４８時間後、５～７．５ｕｇの塩基エディターｍＲＮＡ（ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ）及び２０ｕＬ反応あたり４２０～４５０ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＰ３エレクトロポレーション溶液（Ｌｏｎｚａ）中で、Ｌｏｎｚａ　４Ｄ－Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒシステムを使用して、０．１５～０．２５百万（Ｍ）個のＨＳＰＣをエレクトロポレーションした。細胞を、前述の培地で７日間培養した。図２６Ａは、実験レイアウト及び培地組成を例示する。図２６Ｂは、培養されたＣＤ３４＋　ＨＳＰＣのインビトロ増殖を示す。図２６Ｃは、塩基編集が成功したＣＤ３４＋　ＨＳＰＣへの７Ｇ３クローンの結合の喪失を示す。フローサイトメトリープロットをステム濃縮ＣＤ９０＋サブセットでゲーティングし、クローン９Ｆ５染色で正規化した場合の７Ｇ３染色の喪失によるＨＳＰＣのＣＤ１２３塩基編集を示す。ＦＬＴ３単一編集、ＣＤ１２３単一編集、及びＦＬＴ３＋ＣＤ１２３二重塩基編集条件の編集効率を図２７に報告する。塩基編集によってＳ５９Ｐ変異を導入することは実行可能であるが、本発明者らの設定で得られた効率は、ＦＬＴ３　Ｎ３９９（＞６４％）と比較して比較的低い（最大２９．３％）。

【０２４０】

実施例１１：ｓｇＲＮＡ位置の最適化及びアデニン塩基エディターのＣａｓ９タンパク質内のＫ９１８Ｎ置換の導入によってＣＤ１２３塩基編集効率を改善することができる

　ＣＤ１２３　Ｓ５９コドンの編集効率を改善できるかどうかを確認するために、Ｃａｓ９触媒活性の改善に関連しているＫ９１８Ｎ変異を含有するＣａｓ９タンパク質を、本発明者らのＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ設計と組み合わせて試験した。図２８Ａに示すように、Ｋ９１８Ｎ変異の導入により、編集効率に配列特異的な影響がもたらされ、ＣＤ１２３－ｇＲＮＡ－Ｎでは改善が見られたが、ＦＬＴ３－ｇＲＮＡ－１８の編集はわずかに低減した。図２８Ａは、Ｋ５６２レポーター細胞への５００ｎｇの塩基エディター発現プラスミド及び３６０ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡのエレクトロポレーション後３日目のフローサイトメトリーによる塩基編集の結果を示す。編集された細胞を、ＣＤ１２３について７Ｇ３（標的

化抗体）プラス９Ｆ５クローン（正規化）で染色した。ｇＲＮＡ　ＣＤ１２３－Ｎ（ＣＤ１２３＿ｇＲＮＡ＿Ｎ、配列番号２４）を、前の実験と同様にＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ－３ｘＮＬＳ　ＢＥと組み合わせて、またはＳｐＲＹ－Ｋ３９１８Ｎ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ－３ｘＮＬＳ（配列番号９及び配列番号１２、配列は上記）と組み合わせて試験した。フローサイトメトリーによる編集された細胞の割合を、各プロットの右下に報告する。

【０２４１】

ＣＤ１２３の編集効率をさらに改善するために、２つの追加のｓｇＲＮＡ（ＣＤ１２３－ｇＲＮＡ－Ｒ及びその２１ｂｐの長いバージョン、ＣＤ１２３－ｇＲＮＡ－Ｒ２１）を、基準ＣＤ１２３－ｇＲＮＡ－Ｎ及びＦＬＴ３－ｇＲＮＡ－１８とともにクローニングした。ｐＨＫＯ－ｍＴａｇＢＦＰ２プラスミドをヒトＵ６プロモーター下で作製した。図２８Ｂは、ＣＤ１２３　Ｓ５９を標的とするｇＲＮＡの相対位置及び配列を報告する。さらに、追加のアデニン塩基エディター設計をクローニングし、ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ（図２８Ｃ）とともに試験した：ＳｐＲＹ－Ｋ９１８Ｎ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ、ＳｐＲＹ－ＨＦ１－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ、ＳｐＲＹ－ＨＦ１－ＢｌａｃｋＪａｃｋ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ、ＳｐＲＹ－ＢｌａｃｋＪａｃｋ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ、ＳｐＲＹ－Ｓｎｉｐｅｒ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　ＳｐＲＹ－Ｓｎｉｐｅｒ－ＢｌａｃｋＪａｃｋ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ。ＨＦ１バリアントは、ｇＲＮＡスペーサーミスマッチ塩基に対する耐性の低下及びオフターゲット編集の低下（高忠実度）と関連するＮ４９７Ａ、Ｒ６６１Ａ、Ｑ６９５Ａ、Ｑ９２６Ａの置換を含む。ＳｎｉｐｅｒバリアントにはＦ５３９Ｓ、Ｍ７６３Ｉ、Ｋ８９０Ｎの置換が含まれ、これらはオンターゲット効率が維持された別の忠実度の高いＳｐＣａｓ９バリアントを産生する。ＢｌａｃｋＪａｃｋは、２１ｂｐ以上のｓｇＲＮＡに耐性があるように設計されたＣａｓ９バリアントであり、これは高忠実度バリアントにとって比較的重要である。Ｋ５６２レポーター細胞における５００ｎｇの塩基エディタープラスミドと５００ｎｇのｓｇＲＮＡ発現プラスミドの共エレクトロポレーションを、ｓｇＲＮＡの全ての組み合わせ（ＣＤ１２３－ｇＲＮＡ－Ｎ、ＣＤ１２３－ｇＲＮＡ－Ｒ、ＣＤ１２３－ｇＲＮＡ－Ｒ２１、ＦＬＴ３－ｇＲＮＡ－１８）について行い、結果をフローサイトメトリーによる編集の７２時間後に評価した。図２８Ｄは、スクリーニング手順の結果を要約しており、ＣＤ１２３　Ｓ５９塩基編集のための組み合わせが改善されたことを強調している。特に、ＨＦ１バリアントを除くと、ＣＤ１２３－ｇＲＮＡ－Ｒは、ＣＤ１２３－ｇＲＮＡ－Ｎよりも平均して１．４２倍効率的であるが、その２１ｂｐ長の対応物（ＣＤ１２３－ｇＲＮＡ－Ｒ２１）は、１．２１倍効率的であるにすぎない。Ｋ９１８Ｎ変異の導入により、ＣＤ１２３編集が、ｇＲＮＡ－Ｒで１．０８倍、ｇＲＮＡ－Ｎで１．０５倍改善される。Ｓｎｉｐｅｒ変異と組み合わせると、Ｋ９１８Ｎにより、効率が、ｇＲＮＡ－Ｒで１．２２倍、ｇＲＮＡ－Ｎで１．１６倍改善される。結論として、ＣＤ１２３－ｇＲＮＡ－Ｒへの切り替え及びＫ９１８Ｎ変異の導入により、ＦＬＴ３と比較してＣＤ１２３編集について観察されたより低い効率が部分的に補われ、Ｋ９１８Ｎ置換による影響が比較的少ないようである。

【０２４２】

実施例１２：ＣＤ３４＋　ＨＳＰＣにおけるＳｐＲＹ－Ｋ９１８Ｎ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗ　ｍＲＮＡによる二重鎖塩基編集効率の改善

ＳｐＲＹ－Ｋ９１８Ｎ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗインビトロ転写ｍＲＮＡを使用したＦＬＴ３及びＣＤ１２３遺伝子座のＣＤ３４＋ＨＳＰＣｓ塩基編集効率の改善は、複数のパラメータ（ｍＲＮＡ調製、Ｋ９１８Ｎ変異導入、ｓｇＲＮＡ選択）の最適化により達成された。例示的な実験を、図２９に報告する。図２９Ａは、実験設計を要約する。図２９Ｂは、フローサイトメトリーによるＣＤ１２３編集評価のためのゲーティング戦略を報告する。一方、図２９Ｃは、未処理（エレクトロポレーションのみ）の対照と比較した場合、ＦＬＴ３＋ＣＤ１２３塩基編集細胞が同様の増殖を示す。サンガー配列決定では、ＦＬＴ３　Ｎ３９９編集では最大８５％、ＣＤ１２３　Ｓ５９編集では最大４１％の効率が明らかになった（図３０）。

【０２４３】
実施例１３：ＫＩＴ　Ｈ３７８Ｒ変異は、アデニン塩基編集を介してＣＤ３４＋　ＨＳＰＣに導入され得る
　実施例１２と同じ実験設定を使用して、ヒトＣＤ３４＋　ＨＳＰＣにおいて塩基編集を介してＨ３７８Ｒ変異を導入できるか否かを試験した。ＳｐＲＹ－Ｋ９１８Ｎ－ＡＢＥ８ｅ－Ｖ１０６Ｗインビトロ転写ｍＲＮＡ（４ｕｇ／２０ｕＬのエレクトロポレーション体積）及びＫＩＴ－ｇＲＮＡ－Ｙ（配列番号３７）をエレクトロポレーションすることによって、最大６０％の編集効率が達成された。
【０２４４】
実施例１４：抗ＦＬＴ３及びＣＤ１２３二重特異性キメラ抗原受容体の生成
　合理的に設計された抗ＦＬＴ３及びＣＤ１２３二重特異性キメラ抗原受容体は、強力な抗白血病有効性をもたらすはずである。図２９Ａは、ＦＬＴ３ドメイン４及びＣＤ１２３のＮ末端ドメインの両方を標的とする推定第２世代二重特異性キメラ抗原受容体の概略図である。図２９Ｂは、ＣＤ１２３（ＣＳＬ３６２クローン、配列番号７５～７６）及びＦＬＴ３（４Ｇ８クローン、配列番号７３～７４）を標的とする第２世代単一特異性ＣＡＲ、ならびに異なる配向のｓｃＦｖドメイン及び／または異なる細胞外リンカー、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメイン（配列番号７７～８０）を有する二重特異性キメラ抗原受容体の設計である。
【０２４５】
実施例１５：塩基編集によりステルス受容体が生成される
　エピトープ操作戦略の標的として、サイトカイン受容体ＦＬＴ３、ＫＩＴ、及びＣＤ１２３（ＩＬ３ＲＡ）を選択した。Ｆｍｓ様チロシンキナーゼ３（ＦＬＴ３、ＣＤ１３５）及びがん原遺伝子ｃ－ＫＩＴ（ＫＩＴ、ＣＤ１１７）は、クラスＩＩＩ受容体型チロシンキナーゼであり、野生型（ＷＴ）または変異形態のいずれかで、それぞれ９３％及び８５％のＡＭＬ症例で発現される[３２～３７]。ＣＤ１２３は、ＡＭＬ症例の７５％超の表面に見られ、白血病幹細胞の表面で過剰発現するＩ型サイトカイン受容体であるＩＬ－３受容体（ＩＬ３ＲＡ）のアルファサブユニットである[３８～４０]。これらの遺伝子は、正常な造血発達の様々な段階で存在し、ＡＭＬ細胞上でのそれらの過剰発現は、成人及び小児患者の両方でＨＳＣＴ後の再発率が高く、全生存率が低い[３３、３６、４１～４３]。本発明者らのアプローチを開発するために、本発明者らは、抗ＡＭＬ免疫療法の開発のために現在評価中のモノクローナル抗体（ｍＡｂ）、すなわち、クローン４Ｇ８[２２、４４]（ＦＬＴ３）、Ｆａｂ－７９Ｄ[２１、４５]（ＫＩＴ）、及び７Ｇ３[４６～４８]（ＣＤ１２３）を選択した。先行研究では、４Ｇ８がＦＬＴ３細胞外ドメイン（ＥＣＤ）４を認識する一方、クローンＢＶ１０Ａ４はＥＣＤ２内の無関係のエピトープを認識することから、ＦＬＴ３表面発現を評価するための対照として機能し得ることが報告された[４４]。４Ｇ８は、ＢＡＬＢ／ｃマウスをヒトＦＬＴ３トランスフェクト細胞株で免疫することによって生成されたため、高い程度の相同性（８５．８％の同一性及び９１．５％の類似性）、ならびにヒト及びマウスＦＬＴ３間のＦＬＴ３リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）の交差反応性にもかかわらず、４Ｇ８がヒト特異的エピトープを認識すると推論した[４９]。
【０２４６】
　本発明者らは最初に、ＥＣＤ４をそのマウスオルソログで置換したキメラヒトＦＬＴ３（１６のコドン変化）が、ＦＬＴ３Ｌ結合及び細胞内キナーゼリン酸化に影響を与えることなく４Ｇ８結合の喪失をもたらすことを確認した（図３６Ａ、Ｂ左、Ｃ上）。４Ｇ８結合に関与する残基の最小数を特定するために、ＥＣＤ４内の１６のミスマッチ位置の各々にヒトまたはマウスコドンを使用したスリーピングビューティートランスポゾンベースのコンビナトリアルライブラリを設計した（図３６Ｄ、左上）。このライブラリで形質導入されたＫ５６２細胞のフローサイトメトリー分析は、対照抗体（ＢＶ１０Ａ４）に陽性であり、４Ｇ８に陰性である細胞の集団を示した（図３６Ｄ、右上）。選別された単一陽性（ＢＶ１０Ａ４＋４Ｇ８－）細胞及び二重陽性（ＢＶ１０Ａ４＋４Ｇ８＋）細胞を標的ディープ配列決定によって測定した、各位置でのヒトコドン対マウスコドンの相対的存在量

の比較により、単一アミノ酸置換の濃縮が明らかとなった（Ｎ３９９Ｄ；図３６Ｄ下、及び図３７Ａ）。この結果を検証するために、Ｋ５６２細胞にＦＬＴ３　Ｎ３９９Ｄバリアントを形質導入し、野生型に匹敵するレベルでのＦＬＴ３の表面発現を確認したが、４Ｇ８結合は喪失していた（図３７Ｂ）。

【０２４７】

次に、Ｎ３９９Ｄ置換を導入するための遺伝子編集戦略を評価した。ＦＬＴ３のシグナル伝達に依存しない細胞での本発明者らのゲノム工学手順の結果を容易に評価するために、本発明者らは、転写開始部位の上流にあるＥＦ１α構成的プロモーターの標的組み込みによって内因性遺伝子座からＦＬＴ３を発現するＫ５６２レポーター細胞を生成した（図３７Ｃ）。次に、ＳｐＣａｓ９またはＡｓＣａｓ１２ａヌクレアーゼのいずれかと２００ｂｐのｓｓＯＤＮドナー鋳型を使用してＮ３９９Ｄ変異が相同性指向修復（ＨＤＲ）によって挿入され得ること、及び成功裏に編集された細胞が、ＦＬＴ３表面発現を維持しながら４Ｇ８結合の喪失を示すことを確認した（図３７Ｄ）。それにもかかわらず、ヌクレアーゼの使用は、ＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）及び遺伝子ノックアウトに関連する遺伝毒性の固有のリスクを伴い、これは大部分の非編集細胞で生じる（図３７Ｄ）。

【０２４８】

エピトープ工学は単一点変異の導入によって達成され得るため、塩基編集（ＢＥ）は、ＤＳＢの必要性を回避することにより、エピトープ編集に好適で、より安全なオプションであり得ると推論した。３９９位のアスパラギンは、ＡＡＣコドンによってコードされており、これは、アデニン塩基編集（ＡＢＥ）によってＧＡＣ（アスパラギン酸）またはＧＧＣ（グリシン）に変換することができる。本発明者らは、ＦＬＴ３レポーター細胞にいくつかのｓｇＲＮＡ（プロトスペーサーの３～９位に標的アデニンを有し、１ｂｐずらして配置）を、ＳｐＣａｓ９ニッカーゼ（ＮＧＧ　ＰＡＭ）またはＰＡＭ特異性が緩和されたＣａｓ９バリアント（ＮＧ－ＳｐＣａｓ９ｎ及びＳｐＲＹ－Ｃａｓ９ｎ、図３６Ｆ）のいずれかに結合した先進世代ＴａｄＡ－８ｅデアミナーゼと組み合わせてエレクトロポレーションすることにより、この仮説を試験した。フローサイトメトリーによる評価では、４Ｇ８認識の喪失を伴うエピトープ編集が成功し、ＦＬＴ３－ｓｇＲＮＡ－１８と組み合わせたＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅによって達成された最高の効率（６６．３％、図３６Ｆ）が示された。ＨＤＲベースの方策とは対照的に、塩基編集細胞及び非塩基編集細胞の両方は、顕著な遺伝子ノックアウトなしで、正常な表面ＦＬＴ３発現を維持した。Ｎ３９９ＤとＮ３９９Ｇの両方が本発明者らの編集方針の潜在的な結果であるため、本発明者らは、この変異を全てのさらなる検証分析に含めた。

【０２４９】

同様の戦略を、ＫＩＴ　ＥＣＤ４に結合し、リガンド誘導性二量体化をブロックすることが報告されているＫＩＴ標的化ｍＡｂであるＦａｂ－７９Ｄのエピトープマッピングに適用した[45]。最初に、ＫＩＴ　ＥＣＤ４との潜在的な接触点として以前に予測された位置（Ｆ３１６Ｓ、Ｍ３１８Ｖ、Ｉ３１９Ｋ、Ｖ３２３Ｉ、Ｉ３３４Ｖ、Ｅ３６０Ｋ、Ｐ３６３Ｖ、Ｅ３６６Ｄ、Ｅ３７６Ｑ、Ｈ３７８Ｒ）に１０のアミノ酸変化（ＫＩＴオルソログから）を導入することによって、Ｆａｂ－７９Ｄ結合の喪失を確認し、幹細胞因子（ＳＣＦ）の結合及び細胞内キナーゼのリン酸化の保存を検証した（図３６Ｂ右、Ｃ下）。ＥＣＤ４変異とクローンＦａｂ－７９Ｄとの相互作用を包括的にスクリーニングするために、ＫＩＴ　ＥＣＤ４の各位置をランダムなアミノ酸で置換した縮重コドンライブラリを使用してスクリーニングを行った（図３６Ｅ左）。ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞にライブラリを形質導入し、Ｆａｂ－７９Ｄへの結合が低減しているがＫＩＴの発現が維持されている細胞及びＦａｂ－７９Ｄ染色が維持されている細胞を選別した（図３６Ｅ右）。ライブラリ領域のＮＧＳ配列決定、及び単一の陽性細胞内の各位置での特定のコドンの濃縮の比較により、Ｆａｂ－７９Ｄの親和性を低減させることができるいくつかの変異が明らかになった（図３６Ｅ下）。これらの発見を検証するために、本発明者らは、ライブラリによって同定された１０位置（Ｍ３１８、Ｉ３１９、Ｖ３２３、Ｄ３３２、Ｉ３３４、Ｄ３５７、Ｅ３６０、Ｅ３７６、及びＨ３７８）でのアデニンまたはシチジン塩基編集によって再現さ

れ得る変異を選択することによって、２０のアミノ酸置換を個別にクローニングし、Ｈ３７８Ｒをさらなる開発のために選択した。なぜなら、このＨ３７８Ｒは、ＫＩＴ対照Ａｂ（クローン１０４Ｄ２）に対して正規化した場合、ＳＣＦへの結合を維持しながら、Ｆａｂ－７９Ｄ結合の最も高い低減を示したためである（図３７Ｅ）。さらに、Ｈ３７８Ｒは、ＦＬＴ３　Ｎ３９９Ｄと同様にＡＢＥによって挿入することができ、したがって、潜在的な組み合わせ及び二重のエピトープ操作が可能になる。ＦＬＴ３の場合と同様に、Ｋ５６２細胞上で３つの異なるｓｇＲＮＡを、ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅと組み合わせて、Ｈ３７８（５、６、または７位の標的Ａ）を狙った編集ウィンドウを用いてスクリーニングし、最も効率が高い組み合わせとしてＫＩＴ－Ｙを同定した（図３７Ｃ、Ｆ）。

【０２５０】

ＣＤ１２３については、治療用クローン７Ｇ３（またはそのヒト化対応物ＣＳＬ３６２－タラコツズマブ）の結合に影響を与えるエピトープ及びアミノ酸の置換の両方が以前に報告されている[48]。本発明者らのエピトープ編集戦略を開発するために、ＣＤ１２３のＮ末端ドメインのＥ５１、Ｙ５８、Ｓ５９、Ｒ８４、Ｐ８８、及びＰ８９を狙ったｓｇＲＮＡを試験し、それらをＣＢＥ（ＮＧＧ、ＮＧ及びＳｐＲＹ　Ｃａｓバリアントを含むｅｖｏ－ＡＰＯＢＥＣ１－ＢＥ４）及びＡＢＥ（ＡＢＥ８ｅ、ＮＧ及びＳｐＲＹバリアント、図３６Ｇ）と合理的に組み合わせることによって、Ｋ５６２レポーター細胞に対する標的ＢＥスクリーニングを設計した（図３７Ｅ）。いくつかの組み合わせによってＣＤ１２３に対する７Ｇ３の親和性を低減させる変異が導入されたが、ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅと組み合わせたｇＲＮＡ　ＣＤ１２３－Ｎ及びＣＤ１２３－Ｒ、ならびにＳｐＲＹ－ｅｖｏ－ＡＰＯＢＥＣ１－ＢＥ４と組み合わせたｇＲＮＡ　ＣＤ１２３－Ｌのみが、７Ｇ３結合を完全に無効にすることができた（図３６Ｇ及び図３７Ｈ）。編集された細胞の配列決定により、ＡＢＥ及びＣＢＥが、それぞれＳ５９Ｐ及びＳ５９Ｆの置換をもたらすことが明らかになった。バイスタンダー変異（Ｙ５８Ｈ）も、ｇＲＮＡ　ＣＤ１２３－Ｒを用いて、ＣＤ１２３－Ｎよりも高い効率で、アデニン塩基編集によって導入することができ、したがってさらなる検証に含めた。ＦＬＴ３及びＫＩＴ　ＡＢＥと組み合わせて複数のエピトープを編集することができる可能性があるため、さらなる開発のために、ｇＲＮＡ　ＣＤ１２３－ＲとＡＢＥによって導入されたＳ５９Ｐを選択した。最後に、本発明者らは、本発明者らの塩基編集ＣＤ１２３レポーター細胞を２つの追加のＣＤ１２３標的化ｍＡｂで試験することによって、Ｐ８８／Ｐ８９のシチジン塩基編集が、Ｐ８８Ｓ／Ｐ８９ＳまたはＰ８８Ｌ／Ｐ８９Ｌの組み合わせをもたらし、クローン６Ｈ６及びＳ１８０１６Ｅによる認識がほぼ完全に喪失することを発見した。したがって、エピトープ操作された細胞と組み合わせて適用できる可能性のあるｍＡｂのプールが広がる（図３７Ｉ）。

【０２５１】

エピトープ操作された受容体に対する本発明者らの選択したＡｂの親和性の喪失を正確に定量するために、スリーピングビューティートランスポザーゼによって各受容体バリアント（ＦＬＴ３　ＷＴ、Ｎ３９９Ｄ、Ｎ３９９Ｇ、ＫＩＴ　ＷＴ、Ｈ３７８Ｒ、ＣＤ１２３　ＷＴ、Ｓ５９Ｐ及びＹ５８Ｈ－Ｓ５９Ｐ）をＫ５６２細胞に形質導入し、ＷＴ受容体については、ｍＡｂの飽和濃度でも、全ての試験したバリアントがほとんど完全に認識しないことが観察された（＞５０００ｎｇ／ｍＬ、図３６Ｈ）。とりわけ、ＦＬＴ３　Ｎ３９９Ｇ（３９９位のＡＡＧコドンにある両方のアデニンを編集することによって導入された）は、４Ｇ８結合を低減する能力においてＮ３９９Ｄと相違しなかった。同様に、Ｙ５８Ｈバイスタンダー変異をＣＤ１２３　Ｓ５９Ｐに追加すると、細胞膜上のＣＤ１２３発現に影響を与えることなく、７Ｇ３結合の同様の低減が示された。

【０２５２】

全体として、ＦＬＴ３、ＫＩＴ、及びＣＤ１２３のエピトープ操作は実行可能であり、ｇＲＮＡ及び塩基編集酵素の適切な組み合わせを選択することによって、ＤＳＢを必要とせずに高効率で達成され得ると結論付けた。

【０２５３】

実施例１６：エピトープ編集は受容体の機能を維持する

選択した標的は、ヒトＨＳＰＣで発現する基本的なサイトカイン／増殖因子受容体であり、幹細胞の維持及び系統の分化において関連する役割を有するため、本発明者らは、本発明者らの工学手順が受容体の機能を変化させるか否かを厳密に評価した。蛍光コンジュゲートＦＬＴ３Ｌ、ＳＣＦ、及びＩＬ－３リガンドを使用することにより、試験した全ての濃度（１～＞１０００ｎｇ／ｍＬ、図３６Ｉ）にわたって、それぞれのＷＴまたはエピトープ操作された受容体への同等の結合を確認した。Ｋ５６２細胞はフローサイトメトリーによりＣＳＦ２ＲＢを発現しないため、ＣＤ１２３バリアントを共通のベータサブユニット（ＣＳＦ２ＲＢ／ＣＤ１３１）と共発現させて、ヘテロ二量体ＩＬ－３受容体を形成させ、シグナル伝達を可能にした（図３７Ｊ）。ＦＬＴ３及びＫＩＴの細胞内シグナル伝達カスケードの活性化をウエスタンブロットによって確認し、リガンド結合時の同等かつ用量依存的なキナーゼのリン酸化が示された（図３８Ａ、Ｂ）。ＣＤ１２３については、下流のＳＴＡＴ５シグナル伝達因子のリン酸化を測定することで、リガンド媒介性の受容体活性化を確認した。これは、試験した全てのＩＬ－３濃度で、ＷＴ及びエピトープ操作バリアントの両方で等しく活性化された（図３８Ｃ）。最後に、リガンド依存性増殖応答が完全に維持されていることを確認するために、本発明者らは、増殖及び生存にＳＴＡＴ５経路を介したシグナル伝達を必要とするマウスＩＬ－３依存性リンパ芽球様細胞株であるＢａＦ３細胞に対してキナーゼ相補性アッセイを行った[50]。マウスＩＬ－３飢餓中にヒトＦＬＴ３Ｌ、ＳＣＦ、及びヒトＩＬ－３に曝露した後、ＷＴ及びエピトープ操作された受容体バリアントによる細胞増殖の同等かつ用量依存的な救済を確認した（図３８Ｄ）。

【０２５４】

実施例１７：ステルス受容体は、ＣＡＲ－Ｔ細胞に耐性である

最近の研究では、抗ＦＬＴ３クローン４Ｇ８[22]、抗ＫＩＴ　Ｆａｂ－７９Ｄ[21]、または抗ＣＤ１２３　ＣＳＬ３６２（クローン７Ｇ３のヒト化バリアント[48、51]）ｍＡｂから生成されたＣＡＲ－Ｔ細胞が、ヒトＡＭＬ細胞に対して顕著な有効性を有することが示された。標的ＣＡＲ－Ｔ療法に対するエピトープ操作された細胞の耐性を評価するために、ＣＤ２８共刺激ドメインを含む第２世代ＣＡＲ構築物に４Ｇ８、Ｆａｂ７９Ｄ、及びＣＳＬ３６２の単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）をクローニングし、双方向プロモーターを含むレンチウイルスベクターを使用して、最適化された[52]切断型ＥＧＦＲ選択／枯渇マーカー（ｔＥＧＦＲ、図３９Ａ）を共発現させた。ＣＡＲ－Ｔ細胞の産生については、ＩＬ－７＋ＩＬ－１５の存在下でのＣＤ３－ＣＤ２８ビーズ刺激に基づいてＴ幹細胞メモリ表現型を有する細胞を増殖させる培養プロトコルを使用した[53]（図３９Ａ、図４０Ａ、Ｂ）。培養開始と比較して＞２０倍のインビトロ増殖で高いＣＡＲ形質導入効率（ｔＥＧＦＲ染色で＞８５％）が得られた（図３９Ｂ）。

【０２５５】

Ｋ５６２レポーター細胞に対してインビトロ殺傷アッセイを行うことにより、ＷＴ　ＦＬＴ３、ＫＩＴ、またはＣＤ１２３を過剰発現する細胞の大部分が、それぞれの特異的なＣＡＲ－Ｔによって殺傷され（Ｅ：Ｔ＝１０、Ｅ：Ｔ＝０と比較して＜２％の生存細胞）、エピトープ操作バリアントを発現するＫ５６２細胞は、異なるエフェクター：標的比（Ｅ：Ｔ　０．６２５～１０）にわたってＣＡＲ－Ｔ細胞殺傷に耐性であり（絶対数及び細胞生存率の両方で）、実験終了まで生存した（図３９Ｃ～Ｅ及び図４０Ｃ、Ｄ）。Ｔ細胞の活性化（ＣＤ６９の発現）及び脱顆粒（ＣＤ１０７ａの表面発現）は、ＷＴ遺伝子を発現する細胞とともに培養した条件で有意に高く、これは、ＣＡＲ－Ｔによるエピトープ編集バリアントの認識の欠如と一致していた（図４０Ｃ、Ｄ）。さらに、生存しているＫ５６２レポーター細胞は、未処理の対照に匹敵するレベルで標的化された受容体を依然として発現していた（図３９Ｃ、Ｄ、Ｅ右）。未形質導入のＴ細胞は、試験した全ての条件で培養した場合、標的殺傷もＣＤ６９の上方制御も示さなかった（図４０Ｄ）。ＣＡＲ－Ｔ細胞による厳密なエピトープ特異的殺傷をさらに確認するために、未修飾または塩基編集のいずれかの二重標的細胞（ＦＬＴ３及びＣＤ１２３を発現するＫ５６２細胞）の混合集団を共培養し、対応するＣＡＲ－Ｔ細胞とともにプレーティングすると、エピトープ編集

集団の選択的耐性が観察された（図４０Ｅ）。
【０２５６】
全体として、これらのデータは、エピトープ操作されたＦＬＴ３、ＫＩＴ、及びＣＤ１２３バリアントを過剰発現する細胞が、ＣＡＲ－Ｔ細胞の認識及び殺傷に耐性であるという厳密な検証を提供する。
【０２５７】
実施例１８：ヒトＨＳＰＣの効率的なエピトープ編集
本発明者らのヌクレオチドバリアントをヒト初代ＨＳＰＣの内因性遺伝子に効果的に導入するために、本発明者らは、化学的に修飾されたｓｇＲＮＡ及びインビトロで転写された（ＩＶＴ）ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ　ｍＲＮＡの共エレクトロポレーションに基づいて、動員末梢血（ｍＰＢ）由来ＣＤ３４＋細胞に対する塩基編集プロトコルを最適化した（図４１Ａ及び図４２Ａ～Ｃ）。インビトロでのｍＲＮＡ転写、培養、及びエレクトロポレーション条件、ならびにＨＳＰＣ刺激後の時点での編集を最適化した後（図４２Ｄ、Ｅ、Ｆ）、それぞれＦＬＴ３、ＫＩＴ、及びＣＤ１２３について、最大８６．６％、７８．６％、及び６７．９％の標的Ａ＞Ｇ変換を達成した。ＦＬＴ３－１８、ＫＩＴ－Ｙ、及びＣＤ１２３－Ｒ　ｓｇＲＮＡのウィンドウ内で標的アデニンを効率的に編集することができた（図４１Ｂ）。処理した細胞の分析では、ステム維持化合物（ＳｔｅｍＲｅｇｅｎｉｎ，ＳＲ－１及びＵＭ１７１、図４１Ｄ及び図４２Ｅ）の存在下でのインビトロ培養中に、表現型的に同定された前駆細胞（ＬＭＰＰ、ＣＤ９０－４５ＲＡ＋、ＭＰＰ、ＣＤ９０－４５ＲＡ－、ＨＳＣ、ＣＤ９０＋４５ＲＡ－）の組成に偏りは示されなかった。ＨＤＲ媒介性編集[54]で以前に観察されたものとは対照的に、塩基編集効率は、バルク細胞、コミットした前駆細胞（ＣＤ９０－）、及びより原始的なＨＳＰＣサブセット（ＣＤ９０＋４５ＲＡ－、図４１Ｃ）では同等であった。
【０２５８】
ＦＬＴ３^{N399}及びＣＤ１２３^{S59}　エピトープ操作ＨＳＰＣの免疫療法に対する耐性を確認するために、エレクトロポレーションの３～５日後、異なるＥ：Ｔ比で４Ｇ８及びＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔ細胞で編集したＨＳＰＣで、プレーティングによる殺傷アッセイを実施した。ＦＬＴ３－及びＣＤ１２３　ＣＡＲ－Ｔによる特異的な殺傷は、それぞれＣＤ４５ＲＡ＋及びＣＤ９０＋サブセット内で最も顕著であった。したがって、これらを使用して、これらの実験の結果を絶対数によって評価した。対照部位（ＡＡＶＳ１　セーフゲノムハーバー）で編集された細胞は、ＣＡＲ－Ｔ細胞共培養によって排除されたが、エピトープ編集細胞は、Ｋ５６２共培養で観察されたものと同様に、より高い生存率及び絶対数を示した（図４１Ｅ、Ｆ）。ＫＩＴは、ヒトにおいて既知の造血器外の発現を有するので[55]、本発明者らは、ＣＡＲ－Ｔ細胞の代わりにｍＡｂの使用に焦点を当てた。これにより、重篤なオンターゲット毒性が少なくなる可能性があり、非遺伝毒性コンディショニングまたはエピトープ操作された細胞のインビボ選択に使用することができる。編集ＨＳＰＣを、二量体化を遮断するＦａｂ－７９Ｄ　ｍＡｂの濃度を増加させてプレーティングすることにより、ＳＣＦに応答したＫＩＴ^{H378}編集ＨＳＰＣの増殖動態の維持が観察されたが、ＡＡＶＳ１^{BE}細胞は用量依存的に阻害された（図４１Ｇ）。
【０２５９】
受容体操作されたＣＤ３４＋ＨＳＰＣの機能性の保存を確認するために、処理した細胞を、それぞれのリガンドの濃度を増加させて、他のサイトカインなしでさらに４日間培養した。培養の終了時に、３つの標的全てについて用量依存的なＨＳＰＣの増殖が観察され、１～１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－３濃度でのＣＤ１２３^{S59}　ＢＥを除いて、受容体編集対照とＡＡＶＳ１編集対照との間で差はなかった（図４２Ｈ）。それにもかかわらず、ＢＥ　ＨＳＰＣの対抗選択は観察されず、ＣＤ１２３エピトープ編集とは関係なく、ＣＤ３４＋細胞の均一な増殖が確認された（図４２Ｉ）。さらに、受容体編集ＨＳＰＣの増殖に対する影響が最小限であることを確認し、受容体編集ＨＳＰＣの分化能力を評価するために、ＦＬＴ３、ＣＤ１２３、ＫＩＴまたはＡＡＶＳ１　遺伝子について編集されたＨＳＰＣベースで細胞培養及びコロニー形成単位（ＣＦＵ）アッセイを行い、インビトロ増殖後

の絶対細胞数を観察し、骨髄系及び赤血球系のコロニー数は、未処理の対照と同等であった（図４１Ｈ）。雌ＮＢＳＧＷ免疫不全マウスへの処理されたＨＳＰＣの異種移植は、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}　ＨＳＰＣの生着、再増殖、及び多系統分化能力の維持を示した（図４１Ｉ、Ｊ）。これは、ＡＡＶＳ１編集対照に匹敵していた。ＦＬＴ３編集のパーセンテージは、入力細胞で測定されたものに匹敵し（ＢＥ効率約３５％）、移植後１３週目まで安定していた（図４１Ｋ）。これにより、最も原始的なＨＳＰＣサブセットの編集が成功し、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}細胞の対抗選択がないことが確認された。骨髄（ＢＭ）細胞の二次レシピエントへの移植は、高いヒト造血生着をもたらし、二次移植後の１７週目まで系統分布に差異がなく（図４３Ａ、Ｂ）、ＦＬＴ３編集レベルは、一次レシピエントで測定されたものと同等のままであった（図４１Ｋ）。マウスＦｌｔ３ｌはヒトＦＬＴ３と交差反応性であるため、これらの結果は、エピトープ操作されたＦＬＴ３^{Ｎ３９９}　バリアントの機能性をさらに裏付ける。同様に、ＫＩＴ^{Ｈ３７８}編集ＨＳＰＣのインビボ再増殖能力及び多系統分化は、一致するＡＡＶＳ１^{ＢＥ}対照と同等であり（図４３Ｃ～Ｅ）、系統分化の偏りはなく、編集細胞の対抗選択はなかった。このことは、塩基編集手順が処理された細胞の適応度及び機能性に影響を及ぼさないことをさらに裏付けた。を裏付ける

【０２６０】

全体として、これらのデータは、エピトープ操作ＨＳＰＣが、幹細胞の機能及び分化能力に影響を与えることなく、アデニン塩基エディターによって効率的に達成され得ることを示した。

【０２６１】

実施例１９：ＦＬＴ３^{ＢＥ}　ＨＳＰＣは、４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔインビボ治療に耐性である

ＦＬＴ３　ＣＡＲ－Ｔ細胞が、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}造血を節約しながらＡＭＬを治療するために効果的に使用され得るかどうかを評価するために、本発明者らは、ＮＢＳＧＷマウスにＣＤ３４＋　ＨＳＰＣ（ＦＬＴ３^{ＢＥ}またはＡＡＶＳ１^{ＢＥ}のいずれか）、ならびにＭＬＬ－ＡＦ９及びＦＬＴ３－ＩＴＤの変異を特徴とし、混合造血内でのその検出を容易にするためのレポーター遺伝子（ｍＮｅｏｎＧｒｅｅｎ）が予め形質導入されたヒト患者由来ＡＭＬ異種移植片（ＰＤＸ－１）を順次生着した（図４３Ｆ、Ｇ）。ＰＤＸチャレンジから１０日後、マウスを４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処理し、連続血液試料及び実験の終了時の造血器官（ＢＭ、脾臓、ＳＰ；図４４Ａ）に対するサイトフルオロメトリック分析によって、それらの造血組成をモニタリングした。前の実験で観察されたように、ＡＭＬＰＤＸまたはＣＡＲ－Ｔ細胞の投与前に、移植マウスは、両方の編集群で同様の末梢血組成を示し（図４５Ａ）、編集レベルは、入力細胞と同等であり（約８５％）、骨髄系及びリンパ系の系統内で差はなかった（それぞれＦＡＣＳで選別されたＣＤ３３＋細胞及びＣＤ１９＋細胞、図４４Ｂ）。４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔで処理したマウスは、ＢＭ及びＳＰの両方においてＣＡＲ－Ｔ細胞の生着及び完全なＡＭＬの根絶を示し（図４４Ｃ～Ｆ）、ＢＭにおけるＦＬＴ３^{Ｎ３９９}細胞の割合の小さいが有意な増加を示した（骨髄系細胞内では８８％対９０％、リンパ系細胞内では８９％対９４％；図４４Ｂ）。ＢＭのマルチパラメトリックフローサイトメトリー分析では、４Ｇ８　ＣＡＲで処理したＡＡＶＳ１^{ＢＥ}群のみでＣＤ１９＋　Ｂ細胞（プレＢ及びプロＢ細胞）の相対的枯渇が明らかとなり、一方、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}　ＨＰＳＣを生着したマウスは保護された（図４４Ｇ～Ｉ）。分化した骨髄系細胞（ＣＤ３３／６６ｂ＋、ＡＭＬ細胞を除く）内では、未熟顆粒球（ＣＤ１４－１０－１１ｃ－ＳＳＣ^{高}）^{５６}の割合は、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}マウスと比較して、ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}で低減した（図４４Ｊ）。ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}ＢＥは、系統陰性前駆細胞（ｌｉｎ－ＣＤ３４＋、図４５Ｂ～Ｄ）、特に顆粒球－単球前駆細胞（ＧＭＰ、ｌｉｎ－ＣＤ３４＋３８＋４５ＲＡ＋ＦＬＴ３＋、図４４Ｋ、Ｌ）及びリンパ系プライミング多能性前駆細胞（ＬＭＰＰ、ｌｉｎ－ＣＤ３４＋３８－４５ＲＡ＋９０－１０－、図４４Ｎ、Ｏ）（これは、代わりに、ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}群ではほぼ完全に排除された）に選択的耐性を付与した（ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}対ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}では、それぞれ、ｌｉｎ－ＣＤ３４＋３８＋内で１．４％対２６．６％　ＧＭＰ、及びｌｉｎ－ＣＤ３４＋３８－内で４．８％対４３．３％　ＬＭＰＰ）。４Ｇ８　ＣＡＲによって枯渇され、エピトープ操作によって選択的に保護され

る造血サブセットをより正確に同定するために、本発明者らは、処理されたＦＬＴ３^{Ｎ３９９}及びＡＡＶＳ１^{ＢＥ}群間で異なる系統の絶対数を比較した。共通骨髄系前駆細胞（ＣＭＰ、ｌｉｎ－ＣＤ３４＋３８＋ＣＤ４５ＲＡ－ＦＬＴ３＋）、樹状細胞（ＣＤ３３＋１４－１１ｃ＋ＦＬＴ３＋ＳＳＣ^{低}）、及びＧＭＰの絶対数は、ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}条件で低減した（ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}対ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}では、ＣＭＰ　０．４８倍、ＧＭＰ　０．０１倍、ｃＤＣ　０．４１倍の倍率低減、図４４Ｍ）。リンパ系統及び前駆細胞ＬＭＰＰ、プレＢ／ＮＫ（ｌｉｎ－ＣＤ３４＋３８＋１０＋）、ならびに下流サブセット（Ｂ－プロリンパ球、プロＢ及びプレＢ）は、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}対ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}群で保護された（ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}対ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}では、ＬＭＰＰ　０．０２倍、プレＢ／ＮＫ　０．１９倍、プロＢ　０．２倍、プレＢ　０．１８倍の倍率変化、図４４Ｐ）。ＣＡＲ処置された状態における成熟Ｂ細胞（ＦＬＴ３－である）の増加は、ＣＡＲ介在性のクロストークに応答した増殖を反映している可能性がある。さらに、４Ｇ８　ＣＡＲに曝露されたＡＡＶＳ１^{ＢＥ}における持続性プレＢ／ＮＫ、プロＢリンパ球、プロＢ及びプレＢ細胞、単球及び骨髄芽球（ＣＤ３３／６６ｂ＋１４－１１ｃ－３４－ＳＳＣ^{低}）のＦＬＴ３中央値蛍光強度（ＭＦＩ）は、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}編集群の同じ集団で測定されたものよりも低かった（図４５Ｅ）。これは、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}細胞がＣＡＲ媒介性殺傷を回避しながらＦＬＴ３の発現を維持できるというさらなる証拠を提供する。興味深いことに、実験の終了時に検出されたＣＡＲ－Ｔ細胞は、全ての群で同様の表現型（主にエフェクター及びセントラルメモリ）を示したが（図４５Ｆ）、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}造血に曝露されたものは、ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}対照と比較して、より低い増殖及びＰＤ－１の発現の有意な低減を示した（図４５Ｇ）。これは、エピトープ操作された造血の認識の欠如のために、ＣＡＲ－Ｔが曝露される抗原負荷の低下によって引き起こされる活性化の全体的な減少及び／または消耗を示唆している。重要なことに、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}エピトープ編集は、ヒトＰＤＸ生着の存在に関係なく、４Ｇ８　ＣＡＲ殺傷に対して同じ保護を提供し、造血の再構成を維持しながらＡＭＬ細胞を選択的に排除する可能性を強調した。

【０２６２】

全体として、これらのデータは、ＮＢＳＧＷモデルにおいて、ＦＬＴ３　ＣＡＲ－Ｔ細胞免疫療法がＢ細胞及び前駆細胞サブセット（ＧＭＰ、ＬＭＰＰ）を優先的に枯渇させる一方で、ＦＬＴ３^{Ｎ３９９}エピトープ編集がこれらの亜集団に対する保護を付与することを確認した。

【０２６３】

実施例２０：ＣＤ１２３^{ＢＥ}　ＨＳＰＣは、ＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔインビボ治療に耐性である

ＦＬＴ３エピトープ編集と同様に、ＣＤ１２３^{Ｓ５９}　ＨＳＰＣのＮＢＳＧＷマウスへの異種移植を行い、ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}　ＨＳＰＣと同様の生着及び多系統再増殖能力を確認し（図４６Ａ及び図４５Ｈ）、編集された細胞の割合が高く安定していることを確認した（図４６Ｂ）。次いで、移植されたマウスに、ＰＤＸ－１（これもＣＤ１２３＋を発現する（図４３Ｇ））を注射し、１０日後にＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔ細胞で処理した。４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ療法と同様に、ＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔ細胞は、ＡＭＬ細胞をほぼ完全に根絶させ（図４６Ｃ、Ｄ）、ＣＤ１２３^{Ｓ５９}と比較して、ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}　ＨＳＰＣを生着したマウスにおいて高い増殖を示す（図４６Ｅ）。エンドポイントでのＢＭのフローサイトメトリー分析では、ＣＤ１２３^{Ｓ５９}　ＨＳＰＣの子孫を保護しながらＡＡＶＳ１^{ＢＥ}　ＨＳＰＣを移植したマウスにおける、ヒト造血細胞の絶対数の有意な低減（ＣＤ４５＋、ＡＭＬ及びＣＡＲ　Ｔ細胞を除外した後、図４６Ｆ）及び骨髄系細胞（ＣＤ３３／６６ｂ＋）の相対的な枯渇（成熟及び未熟顆粒球を含む）が強調された（図４６Ｈ～Ｋ）。４Ｇ８　ＣＡＲで観察された殺傷パターンとは異なり、リンパ系統内では、プロＢ細胞のパーセンテージのみが、ＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔ処理ＡＡＶＳ１^{ＢＥ}マウスで低減する傾向を示した（図４６Ｇ）。ＣＤ１２３^{高}　血漿細胞様ＤＣを含む樹状細胞（ＤＣ）は、ＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔでの処理によって枯渇したが、ＣＤ１２３^{Ｓ５９}　ＢＥ群は維持された（図４６Ｌ～Ｎ）。ＦＬＴ３エピトープ編集と同様に、ｌｉｎ－ＣＤ３４＋

前駆細胞は、ＣＤ１２３^{S59}群で比較的維持されていた（図４６Ｏ及び図４５Ｆ、Ｇ）。ＣＭＰ、ＧＭＰ、骨髄芽細胞、顆粒球、及びＤＣサブセットを含む骨髄系集団の絶対数は、ＡＡＶＳ１^{BE}で有意に低減し、ＣＤ１２３^{S59}エピトープ編集によって保護された。リンパ系細胞の中で、ＡＡＶＳ１^{BE}とＣＤ１２３^{S59}とを比較した場合、成熟Ｂ細胞に対してＢプロリンパ球の部分的な枯渇が観察された（図４６Ｐ、Ｑ）。ＦＬＴ３で観察されたように、持続ＧＭＰ、骨髄芽細胞、単球、ｃＤＣ、及びｐＤＣのＣＤ１２３中央値蛍光強度（ＭＦＩ）は、ＣＳＬ３６２　ＣＡＲで処理したＡＡＶＳ１^{BE}条件と比較して、ＣＤ１２３^{S59}編集で高かったが、リンパ系サブセットでは関連する差は観察されなかった。（図４７Ａ）。

【０２６４】

全体として、これらのデータは、ＣＤ１２３^{S59}エピトープ編集造血に対するＣＤ１２３　ＣＡＲ－Ｔ細胞によって誘発されるオンターゲット毒性の低減を示し、この減少は、通常であれば骨髄系統、ＤＣの枯渇、及び造血細胞の絶対数の全体的な減少をもたらす。

【０２６５】

実施例２１：多重編集は、より効果的なＡＭＬ療法を可能にする

本発明者らは、２つ以上のエピトープを編集することで、造血毒性を増加させることなく複数のＡＭＬ標的を同時に攻撃することにより、さらに効果的な免疫療法が可能になる可能性があると推論した。初代ＨＳＰＣでの複数のエピトープ編集の実現可能性を評価するために、ＳｐＲＹ－ＡＢＥ８ｅ　ｍＲＮＡを２つのｇＲＮＡとともにＣＤ３４＋細胞に対して共エレクトロポレーションしたところ、細胞傷害性の明らかな増加なしで、単一ＢＥ後に同じ標的に対して測定されたものに匹敵する編集効率が観察された（図４８Ａ及び図４２Ｄ、Ｆ）。複数のＣＡＲ－Ｔ療法からの保護の概念実証を得るために、デュアルレポーターＫ５６２細胞株でＦＬＴ３とＣＤ１２３との二重編集を行い（＞５５％の二重編集細胞を達成、図４８Ｂ）、選別された単一編集細胞ならびに４Ｇ８　ＣＡＲ及びＣＳＬ３６２　ＣＡＲの両方を共形質導入することによって得られた二重特異性ＣＡＲ－Ｔ細胞による二重編集細胞を処理した。２日間の共培養後、二重エピトープ編集細胞のみが、Ｔ細胞の活性化（ＣＤ６９）、脱顆粒（ＣＤ１０７ａ）、または増殖（ＣｅｌｌＴｒａｃｅ希釈）を誘導せず、ＦＬＴ３及びＣＤ１２３の発現を維持しながら殺傷からの完全な保護を示した（図４８Ｂ、Ｃ）。

【０２６６】

二重標的化免疫療法によって付与される有効性の増加をモデル化するために、本発明者らは、単独でまたはヒトＦＬＴ３^{N399}エピトープ編集造血と組み合わせて異種移植した場合、４Ｇ８　ＣＡＲ－Ｔ細胞処理（ＭＬＬ－ＡＦ１０及び変異したＴＰ５３によって特徴付けられるＰＤＸ－２、図４３Ｆ、Ｇ）によって効果的に根絶されないＡＭＬ　ＰＤＸを同定した（図４７Ｂ、Ｃ）。４Ｇ８　ＣＡＲは、ＦＬＴ３^{N399}生着マウスに投与した場合、ＰＤＸ－２に対する抗白血病有効性がより高くなる傾向を示した（図４７Ｃ）。これは、治療の成功に対する腫瘍外ＣＡＲ活性化の有害な役割を示唆する。次に、選択した抗原のうちの２つを標的とするＣＡＲ－Ｔ細胞の任意の組み合わせが、ＰＤＸ－２ＡＭＬ細胞のより効果的な排除を提供し得るかどうかを試験したところ、４Ｇ８　ＣＡＲ－ＴとＦａｂ７９－Ｄ及びＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔの両方との組み合わせが最も効果的であった（図４７Ｄ）。これは、２つの必須なＡＭＬ抗原が同時に標的化された場合に殺傷が改善されることと一致する。二重編集ＨＳＰＣがＣＡＲ－Ｔ細胞の併用療法に耐性であるという正式な証拠を得るために、二重ＦＬＴ３^{N399}／ＣＤ１２３^{S59}エピトープ編集ＨＳＰＣまたはＡＡＶＳ１^{BE}対照をＮＢＳＧＷマウスに異種移植した。多系統生着を確認し（図４７Ｅ）、ＰＤＸ－２　ＡＭＬ細胞を注射した後、本発明者らは、マウスを４Ｇ８及びＣＳＬ３６２　ＣＡＲ－Ｔ細胞の両方で処理した（１：１比の同時注入、図４８Ｄ）。本発明者らのＣＡＲ組み合わせ実験によって示唆されるように、二重ＣＡＲ－Ｔ療法により、ＡＭＬ細胞をＢＭ及びＳＰから完全に根絶することができた（図４８Ｅ、Ｆ）。ＦＬＴ３編集細胞及びＣＤ１２３編集細胞の両方が、エンドポイントまで持続し、

リンパ系及び骨髄系細胞内で同様に検出された（図４８Ｇ）。非悪性造血を分析することにより、二重ＣＡＲ－Ｔ細胞で処置されたＡＡＶＳ１^{BE}マウスにおいて、骨髄系及びリンパ系の系統の広範な減少、ならびにＧＭＰ、顆粒球、ｃＤＣ、ＬＭＰＰ、プレＢ／ＮＫ、プロＢ及びプレＢ細胞の枯渇が最も強く、ほとんど全ての他の亜集団にわたって顕著ではないが有意に低減することが観察された。これは、４Ｇ８及びＣＳＬ３６２　ＣＡＲ単独で観察されたものとの間の混合枯渇パターンを示唆している（図４８Ｈ）。

【０２６７】

全体として、これらのデータは、多重エピトープ工学がＨＳＰＣにおいて効率的に得ることができ、重複するオンターゲットのオフ腫瘍造血毒性を低減させる強力な多標的免疫療法を可能にするという概念の実証を提供する。

【０２６８】

実施例１５～２１の参照：

１．Ｂｒｅｎｔｊｅｎｓ，Ｒ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．ＣＤ１９－ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｒａｐｉｄｌｙ ｉｎｄｕｃｅ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｒｅｍｉｓｓｉｏｎｓ ｉｎ ａｄｕｌｔｓ ｗｉｔｈ ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ－ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ ａｃｕｔｅ ｌｙｍｐｈｏｂｌａｓｔｉｃ ｌｅｕｋｅｍｉａ．Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ ５，１７７ｒａ３８（２０１３）．

２．Ｔｕｒｔｌｅ，Ｃ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｄｕｒａｂｌｅ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｒｅｍｉｓｓｉｏｎｓ ｉｎ ｃｈｒｏｎｉｃ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｉｃ ｌｅｕｋｅｍｉａ ｔｒｅａｔｅｄ ｗｉｔｈ ＣＤ１９－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｔ ｃｅｌｌｓ ａｆｔｅｒ ｆａｉｌｕｒｅ ｏｆ ｉｂｒｕｔｉｎｉｂ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．３５，３０１０－３０２０（２０１７）．

３．Ｆｒｙ，Ｔ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．ＣＤ２２－ｔａｒｇｅｔｅｄ ＣＡＲ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｉｎｄｕｃｅ ｒｅｍｉｓｓｉｏｎ ｉｎ Ｂ－ＡＬＬ ｔｈａｔ ｉｓ ｎａｉｖｅ ｏｒ ｒｅｓｉｓｔａｎｔ ｔｏ ＣＤ１９－ｔａｒｇｅｔｅｄ ＣＡＲ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．Ｎａｔ．Ｍｅｄ．２４，２０（２０１８）．

４．Ｂｒｅｎｔｊｅｎｓ，Ｒ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｓａｆｅｔｙ ａｎｄ ｐｅｒｓｉｓｔｅｎｃｅ ｏｆ ａｄｏｐｔｉｖｅｌｙ ｔｒａｎｓｆｅｒｒｅｄ ａｕｔｏｌｏｇｏｕｓ ＣＤ１９－ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｒｅｌａｐｓｅｄ ｏｒ ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ Ｂ－ｃｅｌｌ ｌｅｕｋｅｍｉａｓ．Ｂｌｏｏｄ １１８，４８１７（２０１１）．

５．Ｓｐｉｅｇｅｌ，Ｊ．Ｙ．ｅｔ ａｌ．ＣＡＲ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｗｉｔｈ ｄｕａｌ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｏｆ ＣＤ１９ ａｎｄ ＣＤ２２ ｉｎ ａｄｕｌｔ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｒｅｃｕｒｒｅｎｔ ｏｒ ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ Ｂ ｃｅｌｌ ｍａｌｉｇｎａｎｃｉｅｓ：ａ ｐｈａｓｅ １ ｔｒｉａｌ．Ｎａｔ Ｍｅｄ ２７，１４１９（２０２１）．

６．Ｋａｎｔａｒｊｉａｎ，Ｈ．ｅｔ ａｌ．Ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｉｄ ｌｅｕｋｅｍｉａ：ｃｕｒｒｅｎｔ ｐｒｏｇｒｅｓｓ ａｎｄ ｆｕｔｕｒｅ ｄｉｒｅｃｔｉｏｎｓ．Ｂｌｏｏｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｊ １１，４１（２０２１）．

７．Ｌｏｎｇｏ，Ｄ．Ｌ．，Ｄｏｈｎｅｒ，Ｈ．，Ｗｅｉｓｄｏｒｆ，Ｄ．Ｊ．＆Ｂｌｏｏｍｆｉｅｌｄ，Ｃ．Ｄ．Ａｃｕｔｅ Ｍｙｅｌｏｉｄ Ｌｅｕｋｅｍｉａ．ｎ ｅｎｇｌ ｊ ｍｅｄ １２，１１３６－５２（２０１５）．

８．Ｄｏｈｎｅｒ，Ｈ．ｅｔ ａｌ．Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ａｎｄ ｍａｎａｇｅｍｅｎｔ ｏｆ ＡＭＬ ｉｎ ａｄｕｌｔｓ：２０１７ ＥＬＮ ｒｅｃｏｍｍｅｎｄａｔｉｏｎｓ ｆｒｏｍ ａｎ ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ｅｘｐｅｒｔ ｐａｎｅｌ．Ｂｌｏｏｄ ｖｏｌ．１２９ ４２４－４４７ Ｐｒｅｐｒｉｎｔ ａｔ ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１８２／ｂｌｏｏｄ－２０１６－０８－７３３１９６（２０１７）．

９．Ｉｓｉｄｏｒｉ，Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｉｎ Ａｃｕｔ

e Myeloid Leukemia：Where We Stand. Article 11，1（2021）.
10. Pollyea，D. A. & Jordan，C. T. Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells. Blood vol. 129 1627－1635 Preprint at https：／／doi. org／10. 1182／blood－2016－10－696039 （2017）.
11. Hofmann，S. et al. Chimeric Antigen Receptor （CAR） T Cell Therapy in Acute Myeloid Leukemia （AML）. J Clin Med 8，200（2019）.
12. Haubner，S. et al. Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML. Leukemia 2018 33：1 33，64－74（2018）.
13. Kugler，M. et al. A recombinant trispecific single－chain Fv derivative directed against CD123 and CD33 mediates effectiv e elimination of acute myeloid leukaemia cells by dual targeting. Br Jematol 150，574－86（2010）.
14. Lambert，J. et al. Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia：final efficacy and safety updates from the open－label，phase III ALFA－0701 trial. Haematologica 104，113－119（2019）.
15. Chen，L. et al. Targeting FLT3 by chimeric antigen receptor T cells for the treatment of acute myeloid leukemia. Leukemia vol. 31 1830－1834Preprint at https：／／doi. org／10. 1038／leu. 2017. 147（2017）.
16. el Khawanky，N. et al. Demethylating therapy increases anti－CD123 CAR T cell cytotoxicity against acute myeloid leukemia. Nature Communications 2021 12：1 12，1－20（2021）.
17. Zhang，H. et al. Successful Anti－CLL1 CAR T－Cell Therapy in Secondary Acute Myeloid Leukemia. Front Oncol 10，685（2020）.
18. Kenderian，S. S. et al. CD33－specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. Leukemia 29，1637－47（2015）.
19. Wang，J. et al. CAR－T cells targeting CLL－1 as an approach to treat acute myeloid leukemia. doi：10. 1186／s13045－017－0553－5.
20. Casucci，M. et al. CD44v6－targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. （2013） doi：10. 1182／blood－2013－0

4.
21. Myburgh, R. et al. Anti-human CD117 CAR T-cells efficiently eliminate healthy and malignant CD117-expressing hematopoietic cells. Leukemia 34, 2688-2703 (2020).
22. Jetani, H. et al. CAR T-cells targeting FLT3 have potent activity against FLT3-ITD + AML and act synergistically with the FLT3-inhibitor crenolanib. Leukemia 32, 1168-1179 (2018).
23. F, B. et al. Gene-edited stem cells enable CD33-directed immune therapy for myeloid malignancies. Proc Natl Acad Sci USA 116, 11978-87.
24. Kim, M. Y. et al. Genetic Inactivation of CD33 in Hematopoietic Stem Cells to Enable CAR T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. Cell 173, 1439-1453. e19 (2018).
25. Ulyanova, T., Blasioli, J., Woodford-Thomas, T. A. & Thomas, M. L. The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitory receptor. Eur. J. Immunol. 29, 3440-3449 (1999).
26. Paul, S. P., Taylor, L. S., Stansbury, E. K. & McVicar, D. W. Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. Blood 96, 483-490 (2000).
27. Ishida, A. et al. Negative regulation of Toll-like receptor-4 signaling through the binding of glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein, CD14, with the sialic acid-binding lectin, CD33. J. Biol. Chem. 289, 25341-25350 (2014).
28. Jacoby, E. et al. CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity. Nat Commun 7, (2016).
29. Ruella, M. & Maus, M. v. Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. Comput Struct Biotechnol J 14, 357-362 (2016).
30. Sotillo, E. et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. Cancer Discov 5, 1282-1295 (2015).
31. Vago, L. et al. Loss of mismatched HLA

in leukemia after stem-cell transplantation. N Engl J Med 361, 478-488 (2009).
32. Grafone, T., Palmisano, M., Nicci, C. & Storti, S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: Biology and treatment. Oncology Reviews vol. 6 64-74 Preprint at https://doi.org/10.4081/oncol.2012.e82012) (.
33. Mekawy, M. A., Eissa, D. S., Hamza, M. T., Hamed, G. M. & Youssef, M. K. FLT3 receptor/CD135 expression by flow cytometry in acute myeloid leukemia: Relation to FLT3 gene mutations and mRNA transcripts. Egyptian Journal of Medical Human Genetics 19, 345-351 (2018).
34. F Kuchenbauer, W. K. C. S. A. K. W. H. T. H. Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia. Haematologica 90, 1617-25 (2005).
35. Valverde, L. R. et al. C-kit receptor (CD117) expression in acute leukemia. Ann Hematol 72, 11-15 (1996).
36. Gao, X. et al. High Expression of c-kit mRNA Predicts Unfavorable Outcome in Adult Patients with t(8;21) Acute Myeloid Leukemia. PLoS One 10, e0124241 (2015).
37. Schwartz, S. et al. Expression of the c-kit receptor (CD117) is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML, and lacks prognostic significance. Leuk Lymphoma 34, 85-94 (1999).
38. Bras, A. E. et al. CD123 expression levels in 846 acute leukemia patients based on standardized immunophenotyping. Cytometry B Clin Cytom 96, 134 (2019).
39. Ehninger, A. et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. Blood Cancer J 4, (2014).
40. Haubner, S. et al. Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML. Leukemia 2018 33:1 33, 64-74 (2018).
41. Perriello, V. M. et al. CD123 Is Consistently Expressed on NPM1-Mutated AML Cells. CancersBasel) 13, 496 (2021) (.
42. Kandeel, E. Z., Madney, Y., Eldin, D. N. & Shafik, N. F. Overexpression of CD200 and CD1

23 is a major influential factor in the clinical course of pediatric acute myeloid leukemia. Exp Mol Pathol 118, (2021).
43. Cheng, J., Qu, L., Wang, J., Cheng, L. & Wang, Y. High expression of FLT3 is a risk factor in leukemia. Mol Med Rep 17, 2885 (2018).
44. Hofmann, M. et al. Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia. (2012) doi:10.1038/leu.2011.372.
45. Reshetnyak, A. v et al. Structural basis for KIT receptor tyrosine kinase inhibition by antibodies targeting the D4 membrane-proximal region. doi:10.1073/pnas.1317118110.
46. Herzog, E. et al. Pharmacodynamic Activity and Preclinical Safety of CSL362, a Novel Humanised, Affinity Matured Monoclonal Antibody Against Human Interleukin 3 Receptor. Blood 120, 1524-1524 (2012).
47. Xie, L. H. et al. CD123 target validation and preclinical evaluation of ADCC activity of anti-CD123 antibody CSL362 in combination with NKs from AML patients in remission. Blood Cancer J 7, (2017).
48. Broughton, S. E. et al. Dual Mechanism of Interleukin-3 Receptor Blockade by an Anti-Cancer Antibody. CellReports 8, 410-419 (2014).
49. Li, Y. et al. A novel Flt3-deficient HIS mouse model with selective enhancement of human DC development. Eur J Immunol 46, 1291-1299 (2016).
50. Warmuth, M., Kim, S., Gu, X. J., Xia, G. & Adrian, F. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. Curr Opin Oncol 19, 55-60 (2007).
51. el Khawanky, N. et al. Demethylating therapy increases anti-CD123 CAR T cell cytotoxicity against acute myeloid leukemia. Nat Commun 12, (2021).
52. Vavassori, V. et al. Modeling, optimization, and comparable efficacy of T cell and hematopoietic stem cell gene editing for treating hyper-IgM syndrome. EMBO Mol Med 13, (2021).
53. Cieri, N. et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. Blood 121, 57

３－５８４（２０１３）．
５４．Ｇｅｎｏｖｅｓｅ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｉｎ ｈｕｍａｎ ｒｅｐｏｐｕｌａｔｉｎｇ ｈａｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔｕｒｅ ５１０，２３５－２４０（２０１４）．
５５．Ｌｅｎｎａｒｔｓｓｏｎ，Ｊ．＆ Ｒｏｎｎｓｔｒａｎｄ，Ｌ．Ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ／ｃ－Ｋｉｔ：Ｆｒｏｍ ｂａｓｉｃ Ｓｃｉｅｎｃｅ ｔｏ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｒｅｖ ９２，１６１９－１６４９（２０１２）．
５６．Ｂａｓｓｏ－Ｒｉｃｃｉ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．Ｍｕｌｔｉｐａｒａｍｅｔｒｉｃ Ｗｈｏｌｅ Ｂｌｏｏｄ Ｄｉｓｓｅｃｔｉｏｎ：Ａ ｏｎｅ－ｓｈｏｔ ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ ｐｉｃｔｕｒｅ ｏｆ ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｓｙｓｔｅｍ．Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ ９１，９５２（２０１７）．
５７．Ｄｏｌｇｉｎ，Ｅ．Ｆｉｒｓｔ ＣＤ１２３－ｔａｒｇｅｔｅｄ ｄｒｕｇ ａｐｐｒｏｖｅｄ ａｆｔｅｒ ｗｏｗｉｎｇ ｉｎ ｒａｒｅ ｃａｎｃｅｒ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３７，２０２－２０３（２０１９）．
５８．Ｂｉａｓｃｏ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ｔｒａｃｋｉｎｇ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｓｉｓ Ｒｅｖｅａｌｓ Ｐａｔｔｅｒｎｓ ｏｆ Ｃｌｏｎａｌ Ｄｙｎａｍｉｃｓ ｄｕｒｉｎｇ Ｅａｒｌｙ ａｎｄ Ｓｔｅａｄｙ－Ｓｔａｔｅ Ｒｅｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎ Ｐｈａｓｅｓ．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ １９，１０７－１１９（２０１６）．
５９．Ｌｅｉｂｏｗｉｔｚ，Ｍ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．Ｃｈｒｏｍｏｔｈｒｉｐｓｉｓ ａｓ ａｎ ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ ｃｏｎｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ．Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ ５３，８９５－９０５（２０２１）．
６０．Ｓｃｈｉｒｏｌｉ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｅｃｉｓｅ Ｇｅｎｅ Ｅｄｉｔｉｎｇ Ｐｒｅｓｅｒｖｅｓ Ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｆｏｌｌｏｗｉｎｇ Ｔｒａｎｓｉｅｎｔ ｐ５３－Ｍｅｄｉａｔｅｄ ＤＮＡ Ｄａｍａｇｅ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ２４，５５１－５６５．ｅ８（２０１９）．
６１．Ｆｅｒｒａｒｉ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｇｅｎｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｌｏｎｇ－ｔｅｒｍ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｖａｌｉｄａｔｅｄ ｂｙ ｃｌｏｎａｌ ｔｒａｃｋｉｎｇ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３８，１２９８（２０２０）．
６２．Ｇｉｌｌ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｏｆ ｈｕｍａｎ ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｉｄ ｌｅｕｋｅｍｉａ ａｎｄ ｍｙｅｌｏａｂｌａｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｔ ｃｅｌｌｓ．Ｂｌｏｏｄ １２３，２３４３－２３５４（２０１４）．
６３．Ｒｕｓｓｋａｍｐ，Ｎ．Ｆ．，Ｍｙｂｕｒｇｈ，Ｒ．，Ｋｉｅｆｅｒ，Ｊ．Ｄ．，Ｎｅｒｉ，Ｄ．＆Ｍａｎｚ，Ｍ．Ｇ．Ａｎｔｉ－ＣＤ１１７ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｔｏ ｅｌｉｍｉｎａｔｅ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ａｎｄ ｌｅｕｋｅｍｉａ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ．Ｅｘｐ Ｈｅｍａｔｏｌ ９５，３１－４５（２０２１）．
６４．Ｈａｎｄ，Ｔ．Ｈ．ｅｔ ａｌ．Ｃａｔａｌｙｔｉｃａｌｌｙ Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｃａｓ９ ｔｈｒｏｕｇｈ Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ．ＣＲＩＳＰＲ Ｊｏｕｒｎａｌ ４，２２３－２３２（２０２１）．

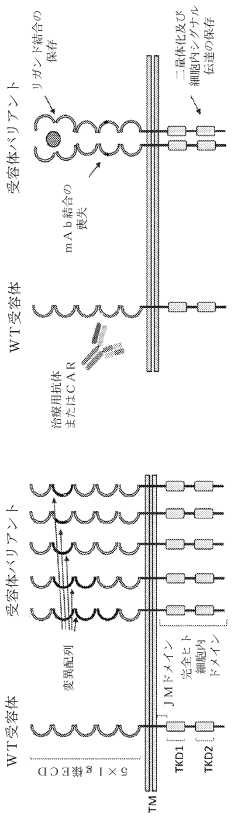
【０２６９】

他の実施形態

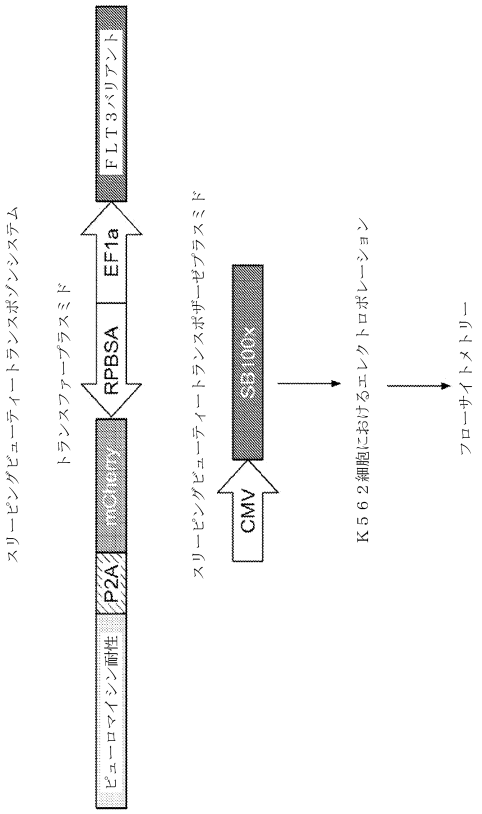
本発明を上記の実施形態に関連して説明してきたが、前述の説明及び実施例は例示を意図しており、本発明の範囲を限定するものではないことを理解されたい。他の態様、利点、及び変更は、以下の特許請求の範囲内である。

【図面】

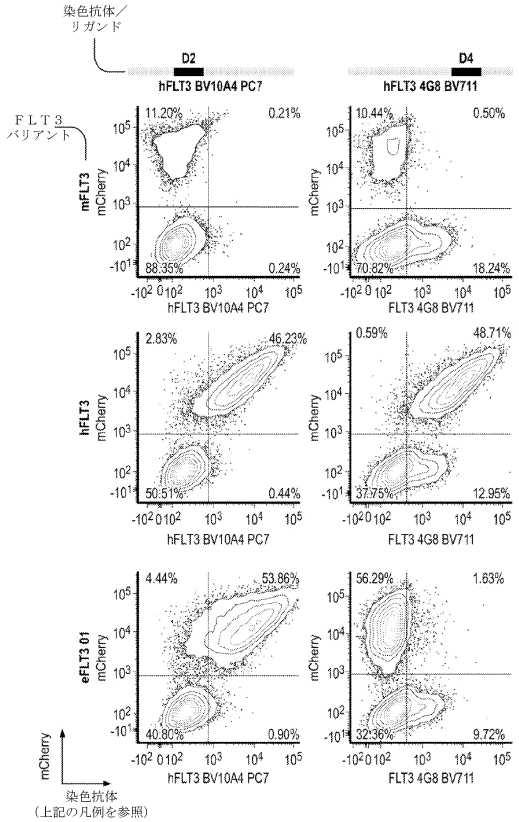
【図１】



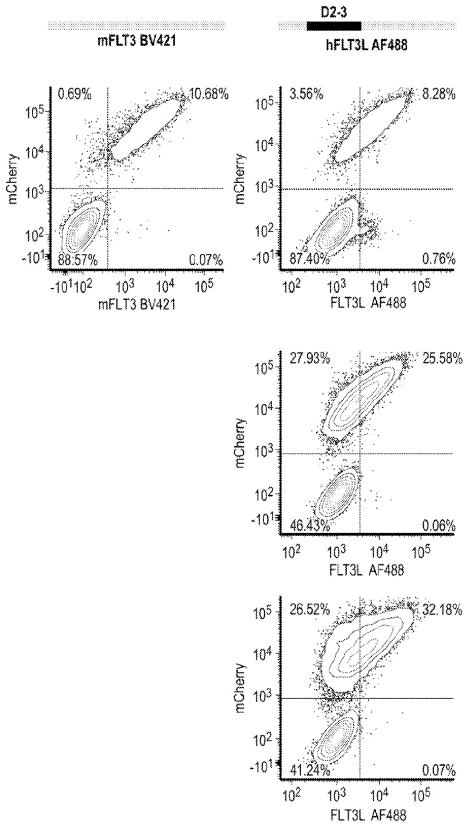
【図２－１】



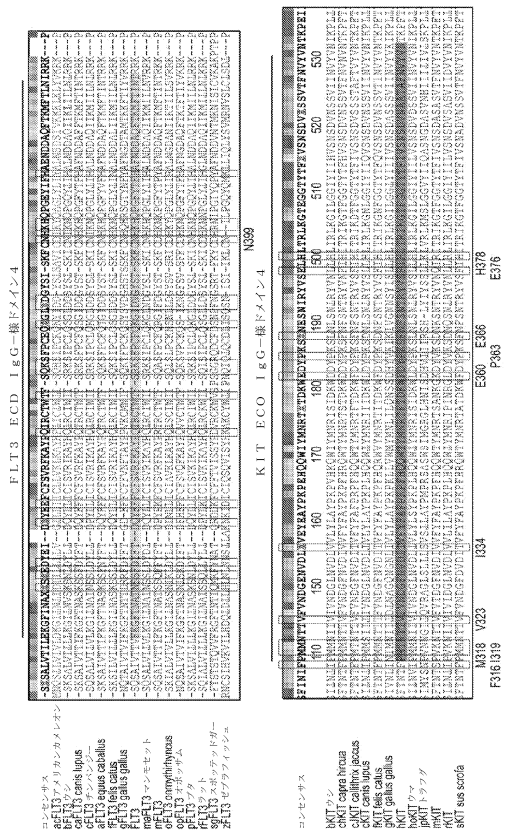
【図２－２】



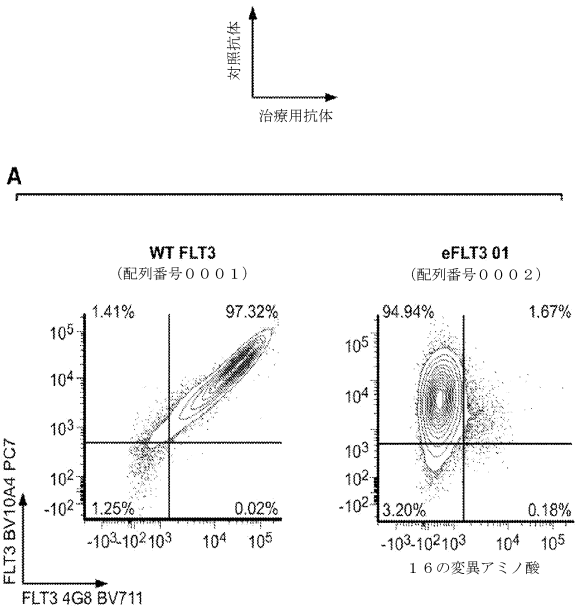
【図２－３】



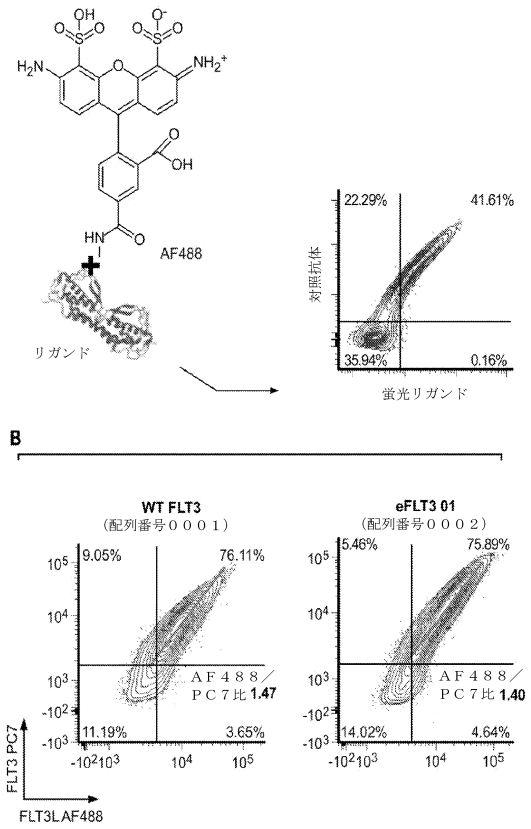
【図３】



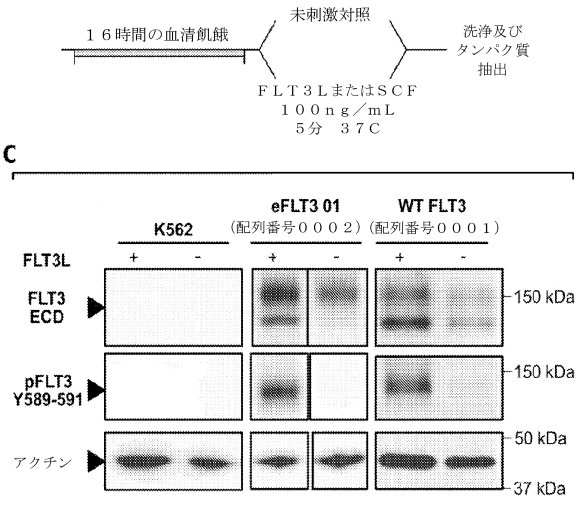
【図４Ａ】



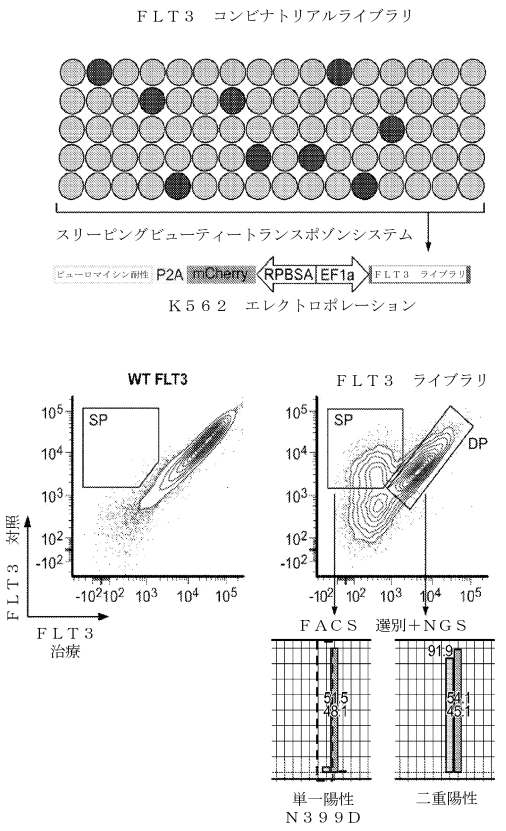
【図４Ｂ】



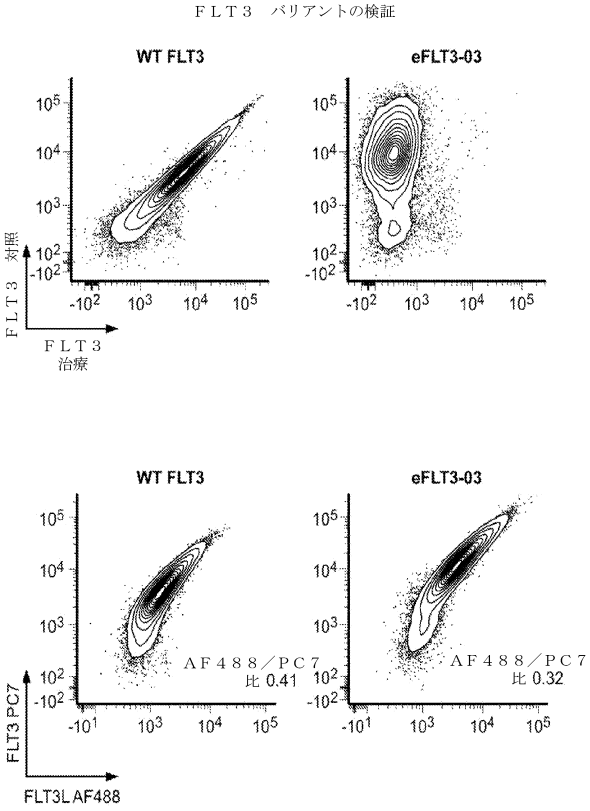
【図４Ｃ】



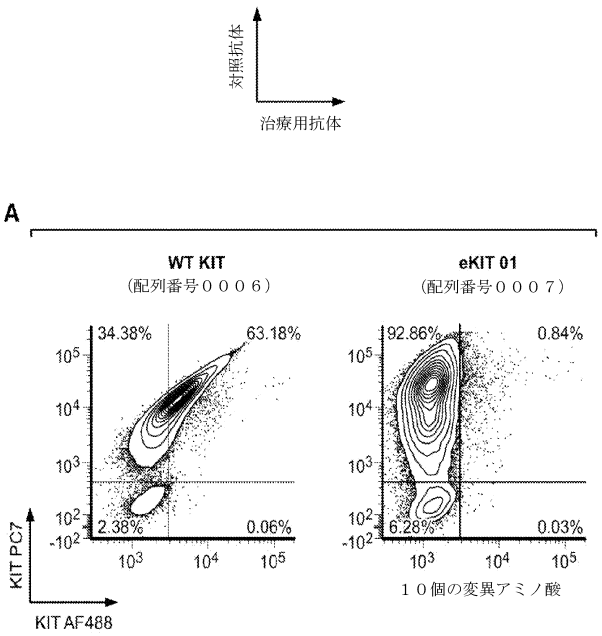
【図５－１】



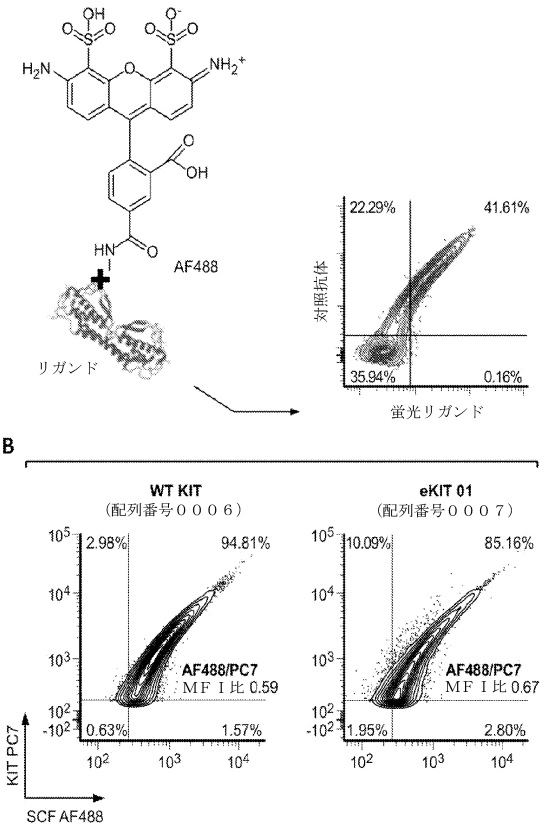
【図５－２】



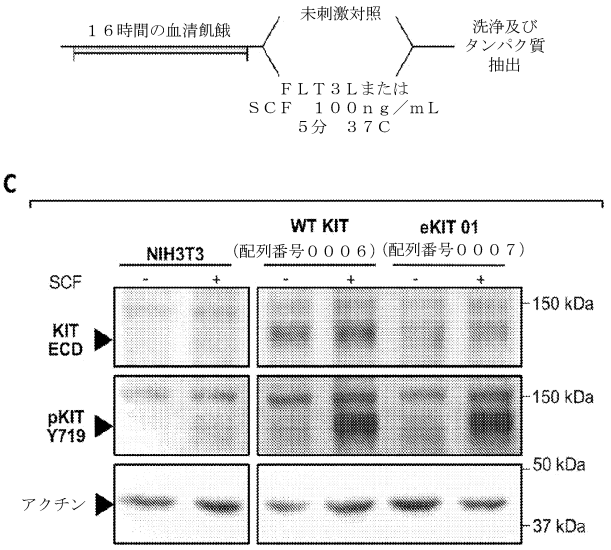
【図６Ａ】



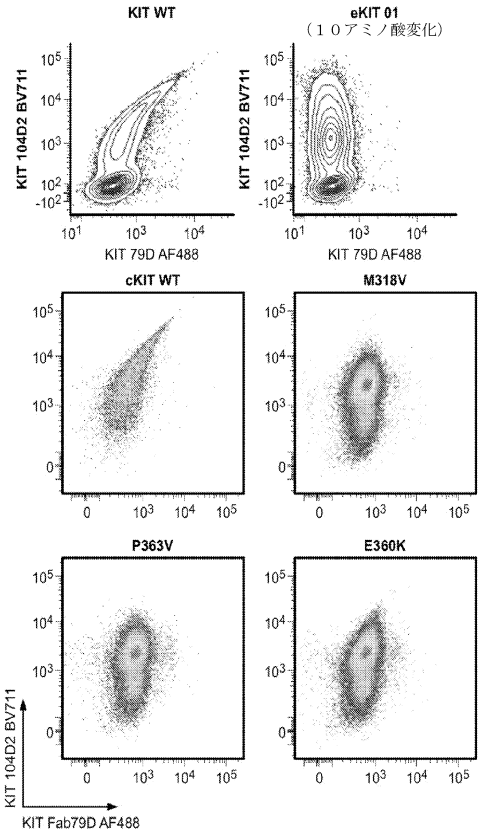
【図６Ｂ】



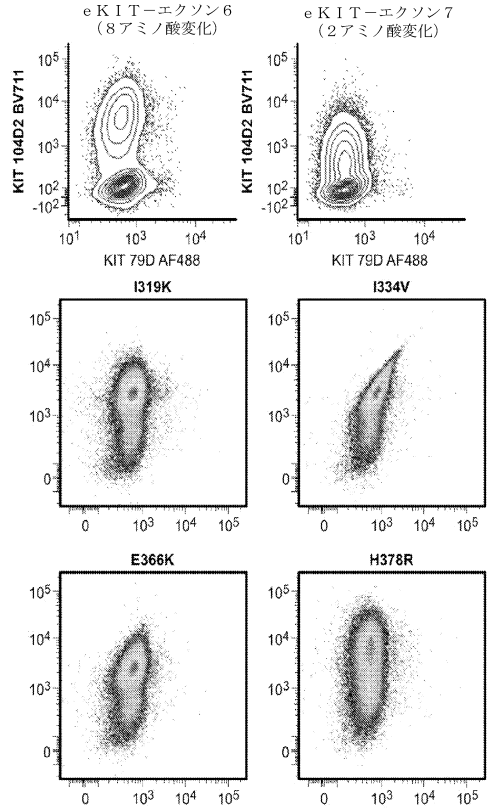
【図６Ｃ】



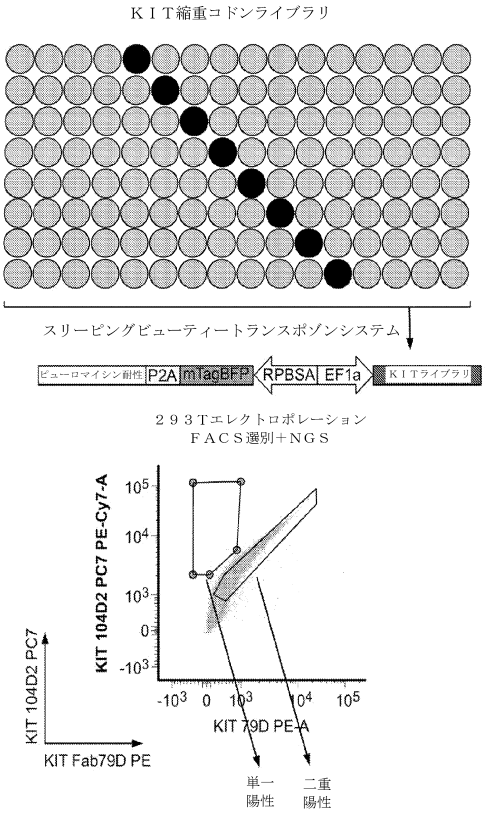
【図６Ｄ－１】



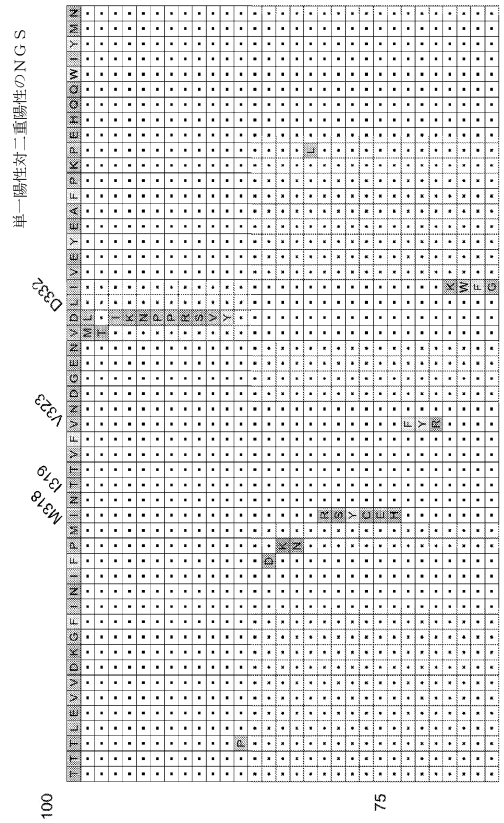
【図６Ｄ－２】



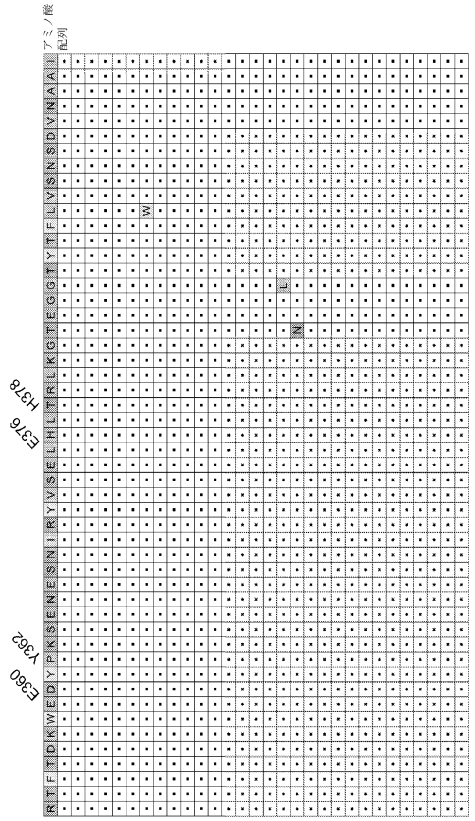
【図７－１】



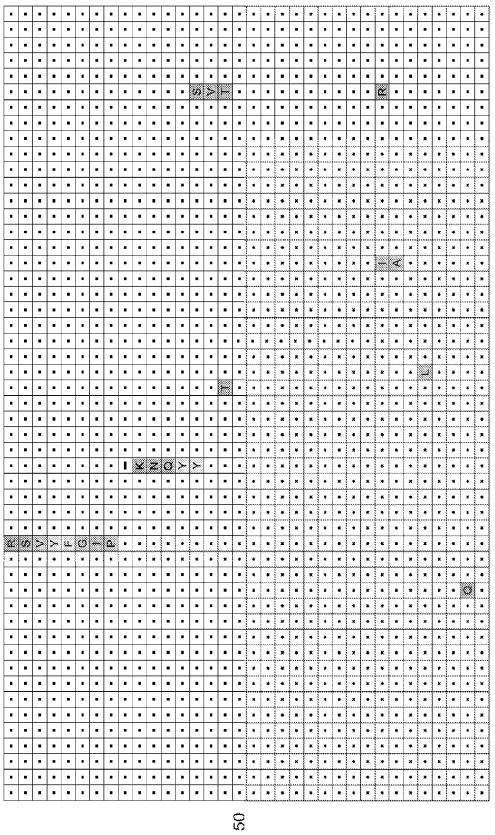
【図７－２】



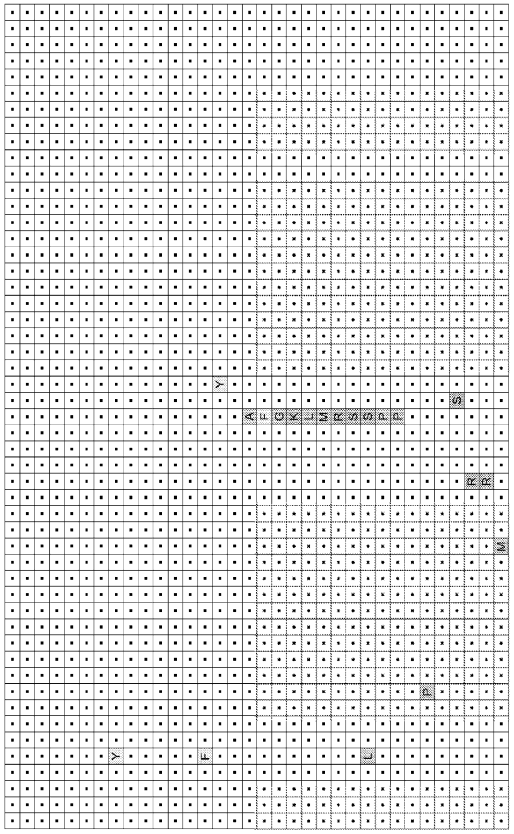
【図７－３】



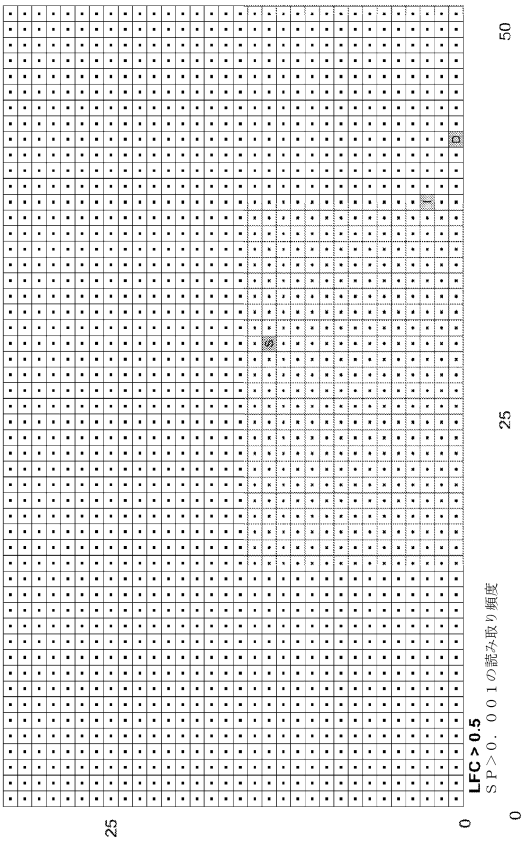
【図７－４】



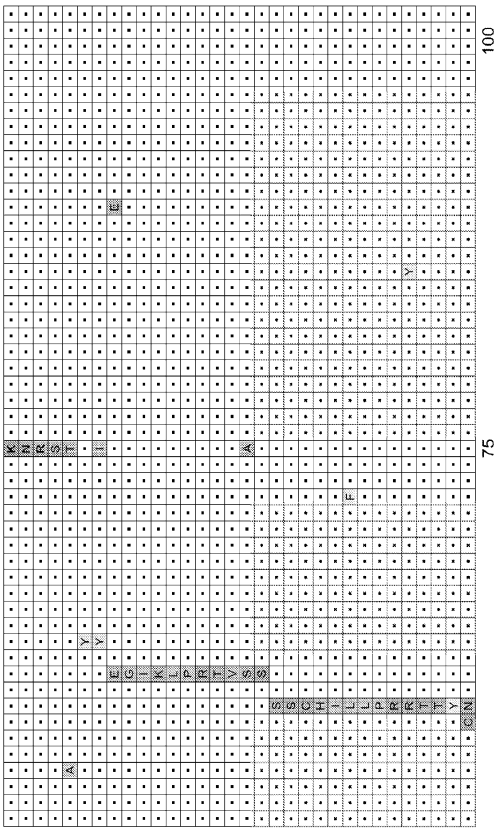
【図７－５】



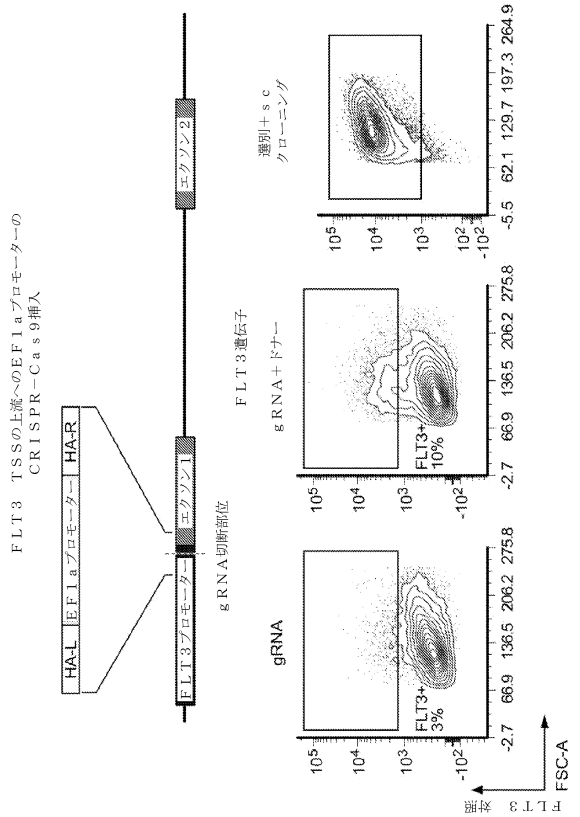
【図７－６】



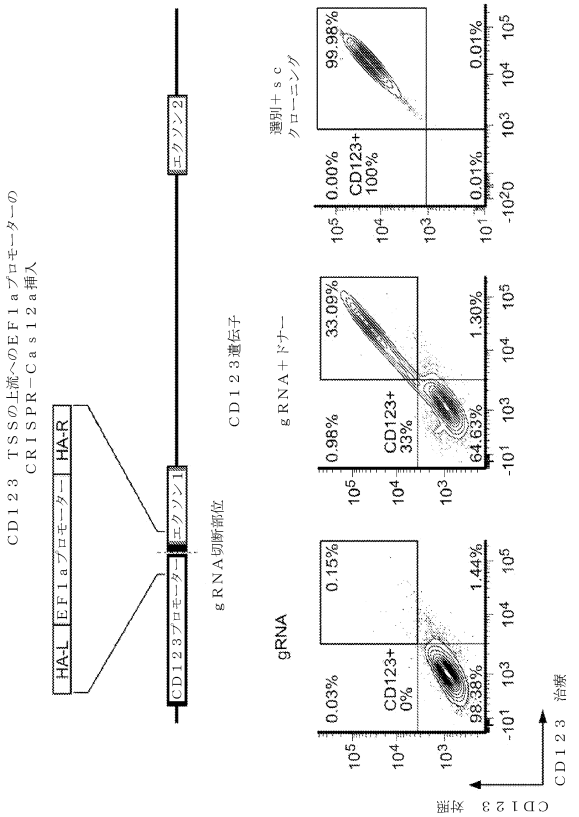
【図７－７】



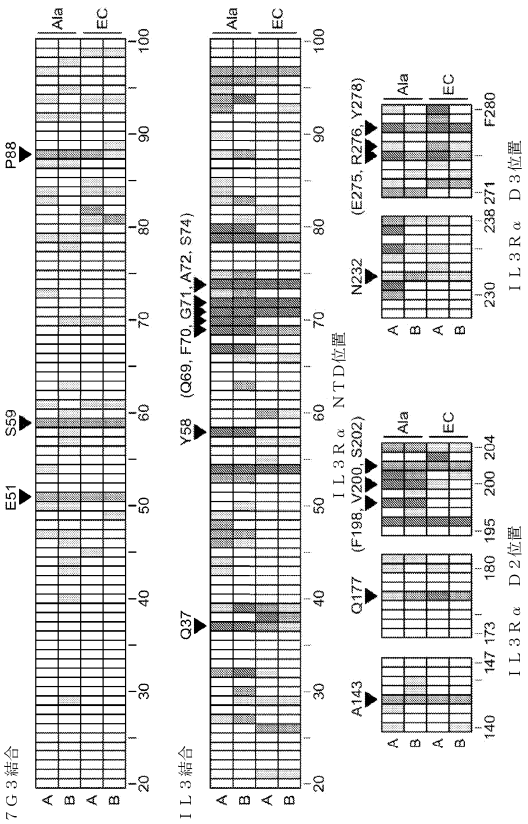
【図８－１】



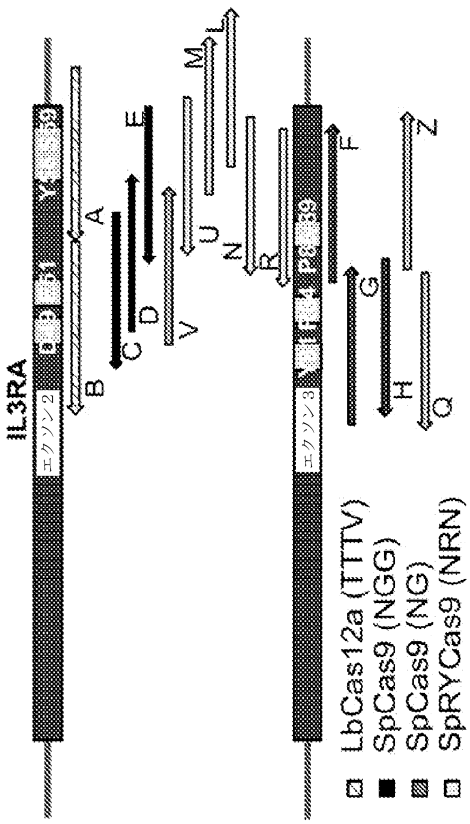
【図８－２】



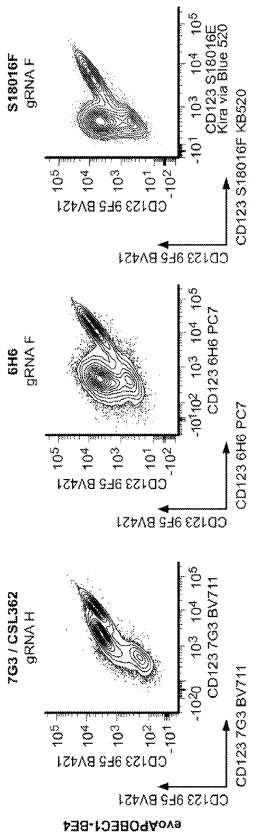
【図９】



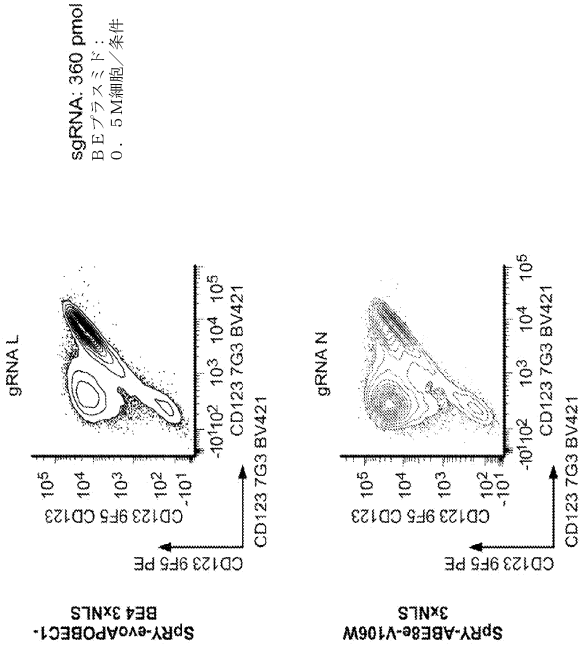
【図１０Ａ】



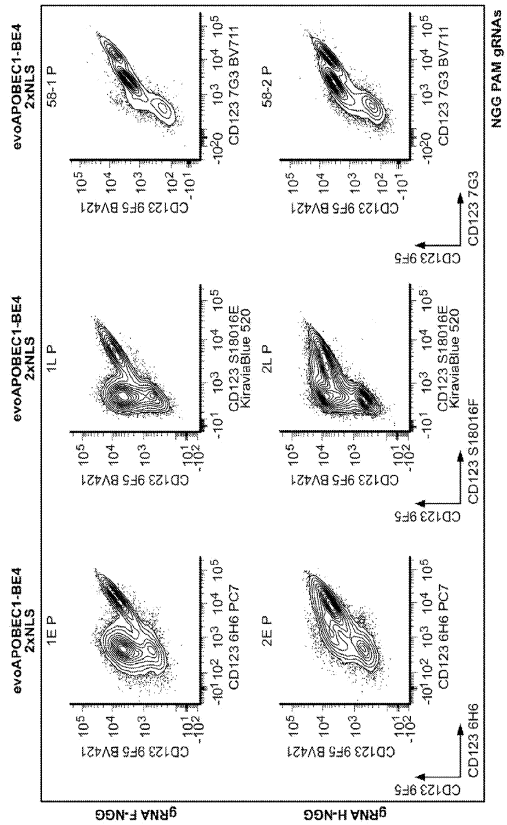
【図１０Ｂ－１】



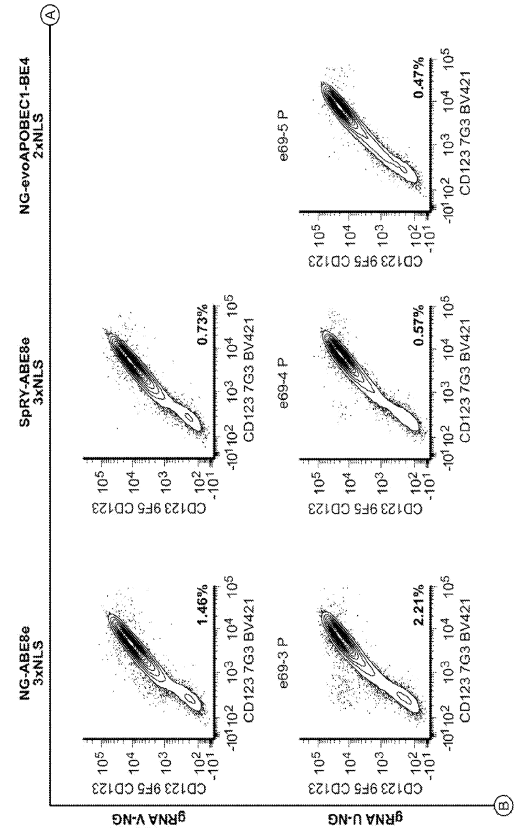
【図１０Ｂ－２】



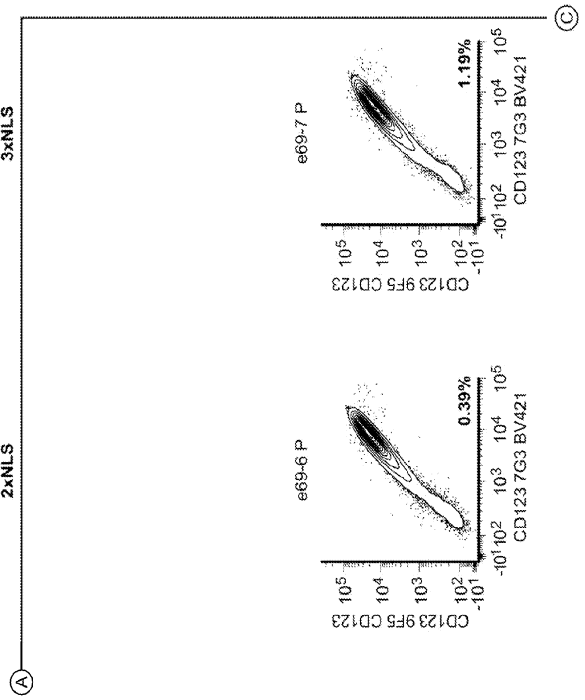
【図１１－１】



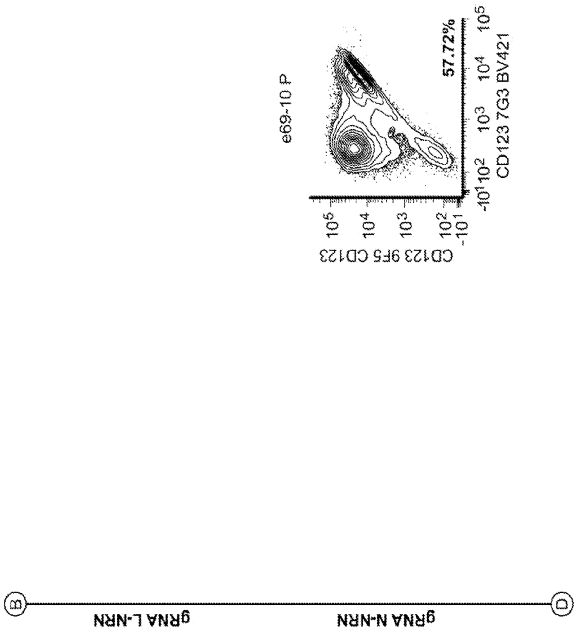
【図１１－２】



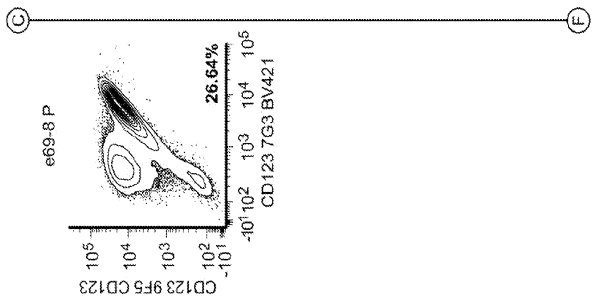
【図１１－３】



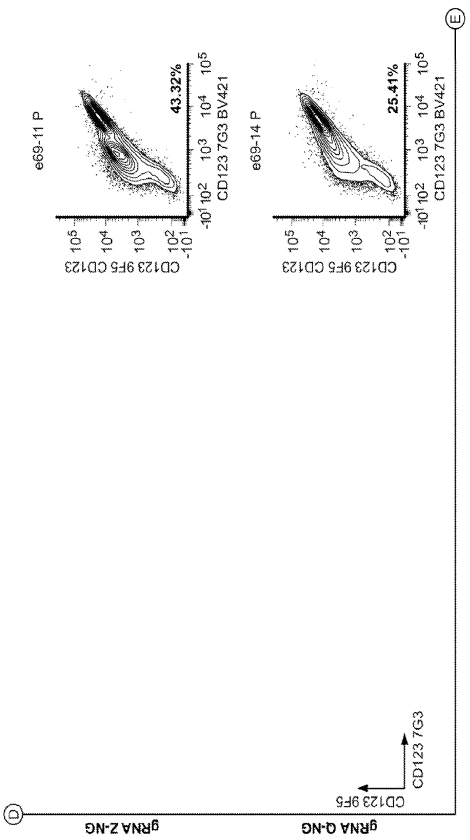
【図１１－４】



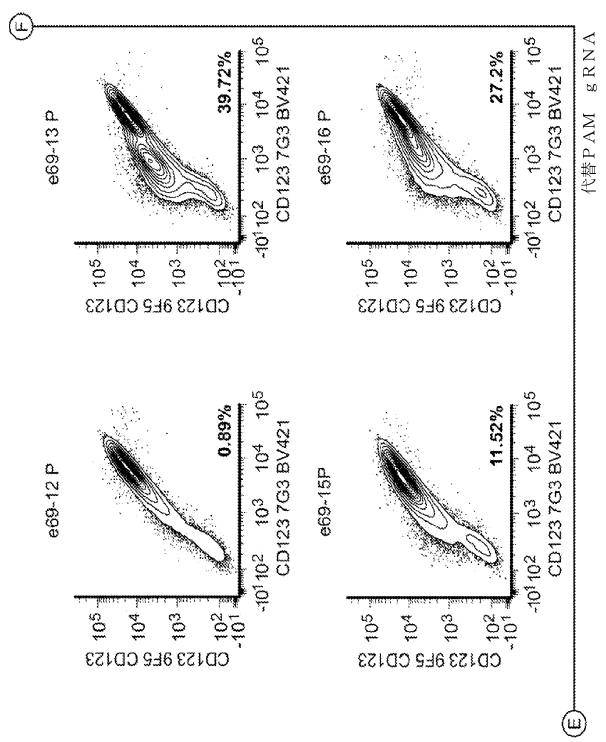
【図１１－５】



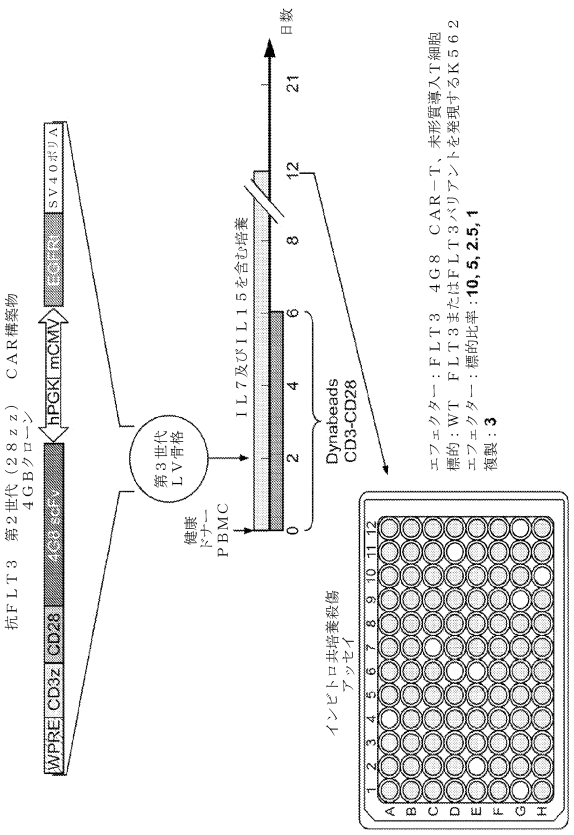
【図１１－６】



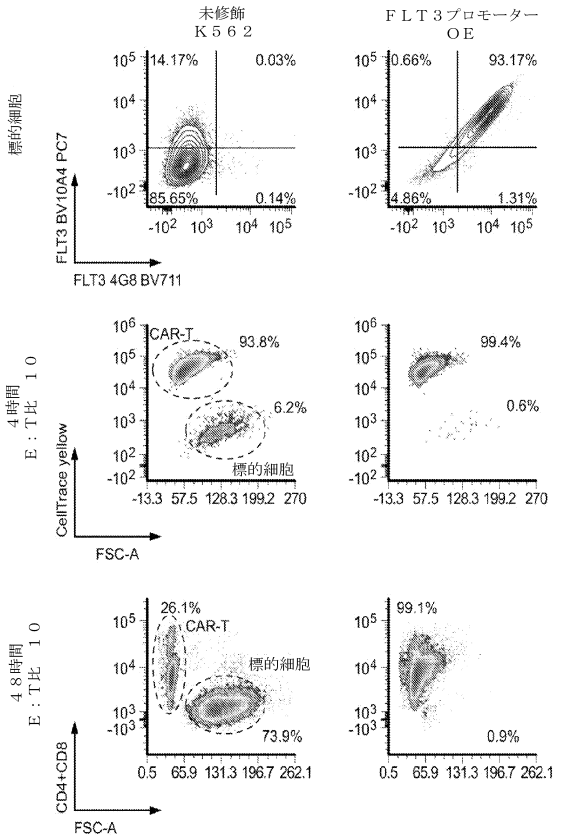
【図１１－７】



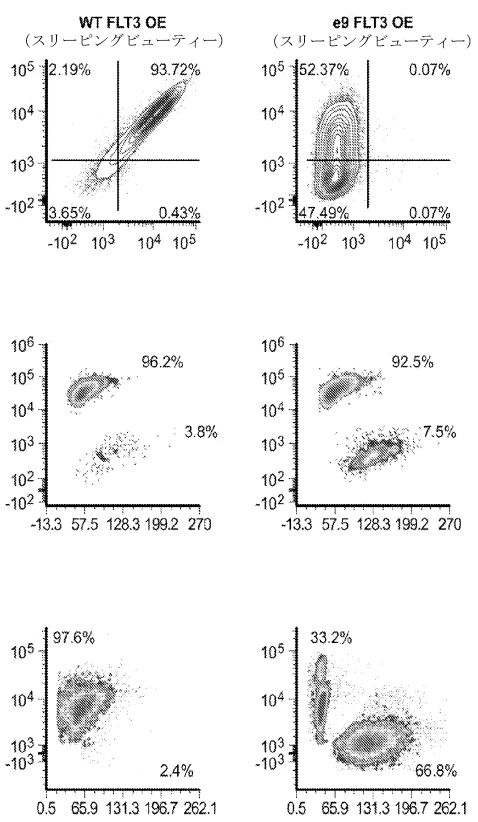
【図１２Ａ】



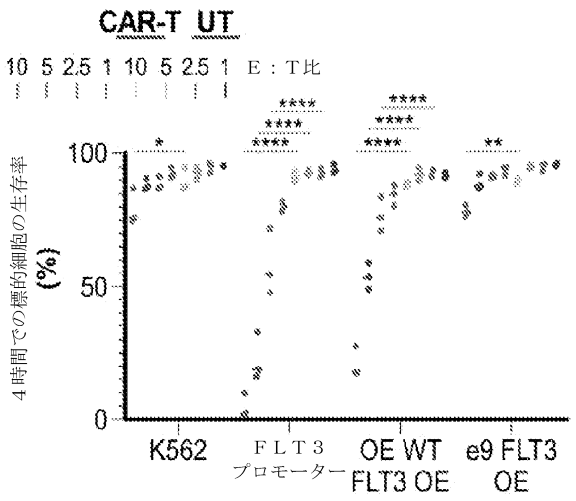
【図１２Ｂ－１】



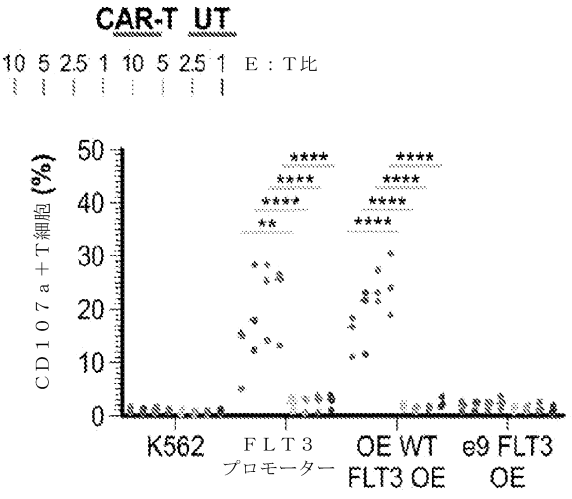
【図１２Ｂ－２】



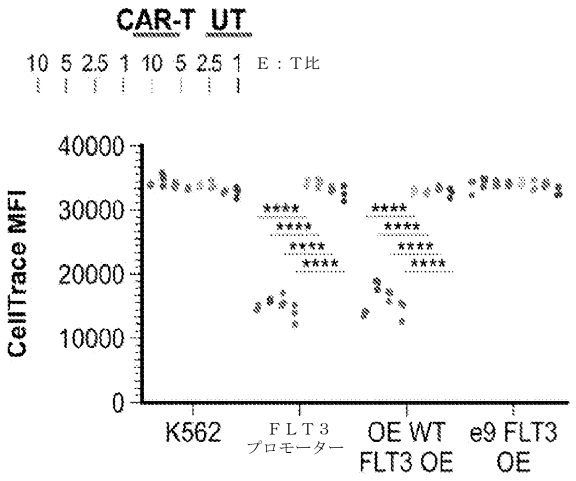
【図１２Ｃ】



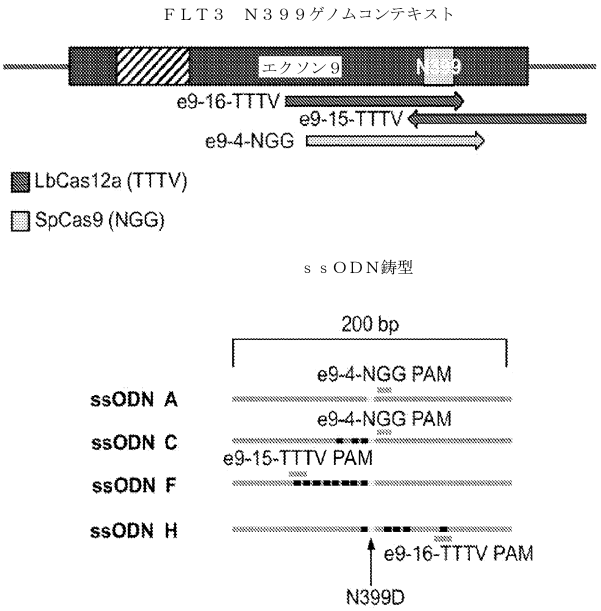
【図１２Ｄ】



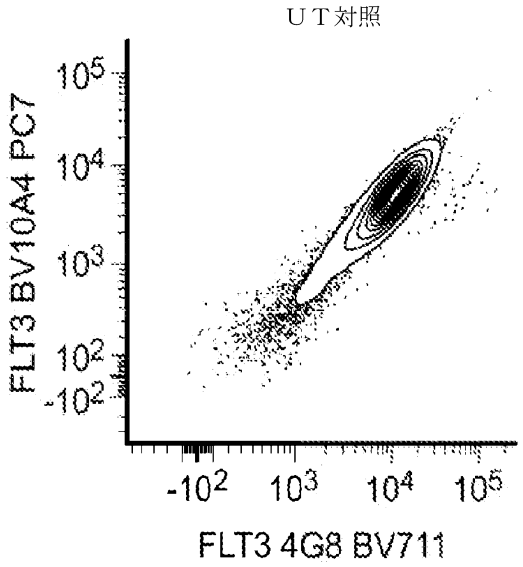
【図１２Ｅ】



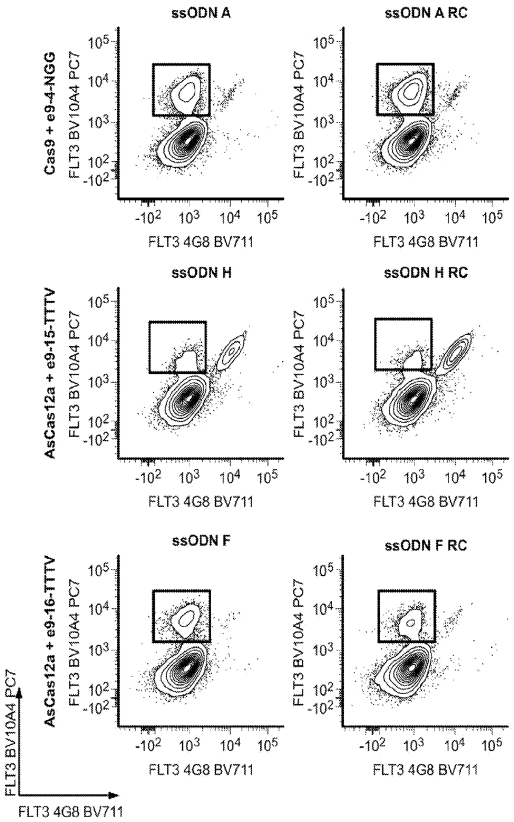
【図１３Ａ】



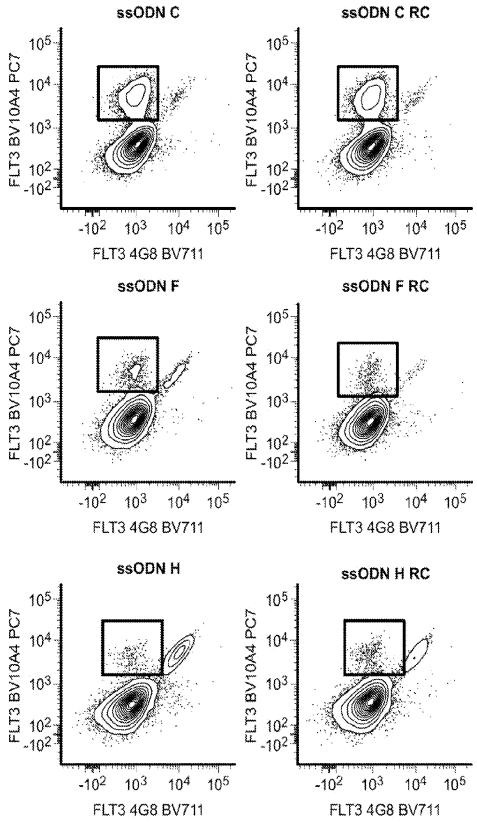
【図１３Ｂ－１】



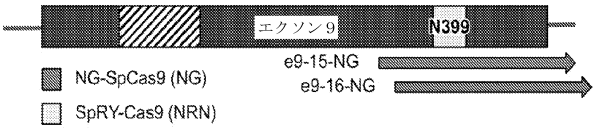
【図１３Ｂ－２】



【図１３Ｂ－３】



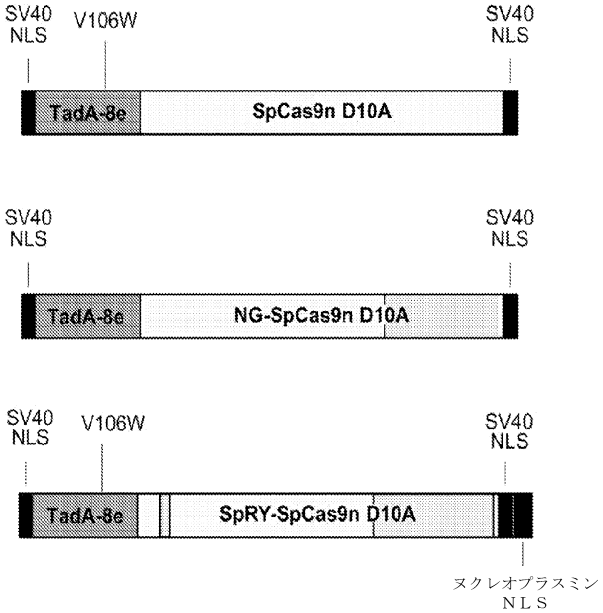
【図１４Ａ】



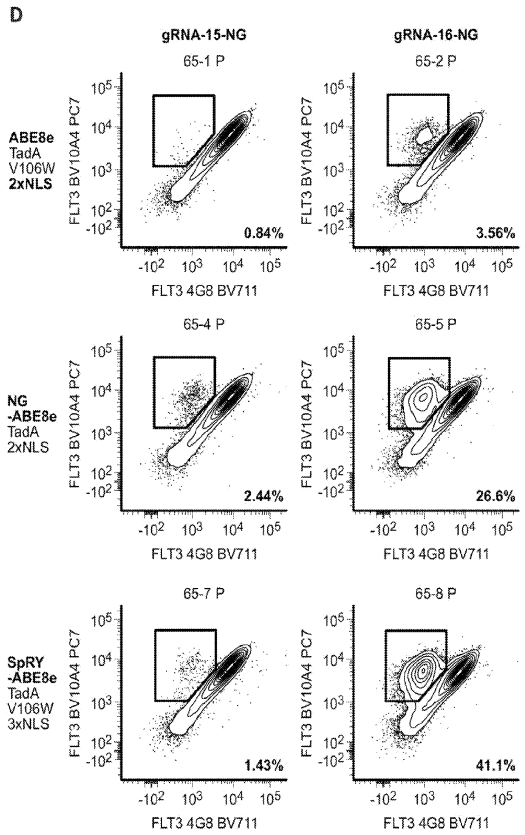
【図１４Ｂ】



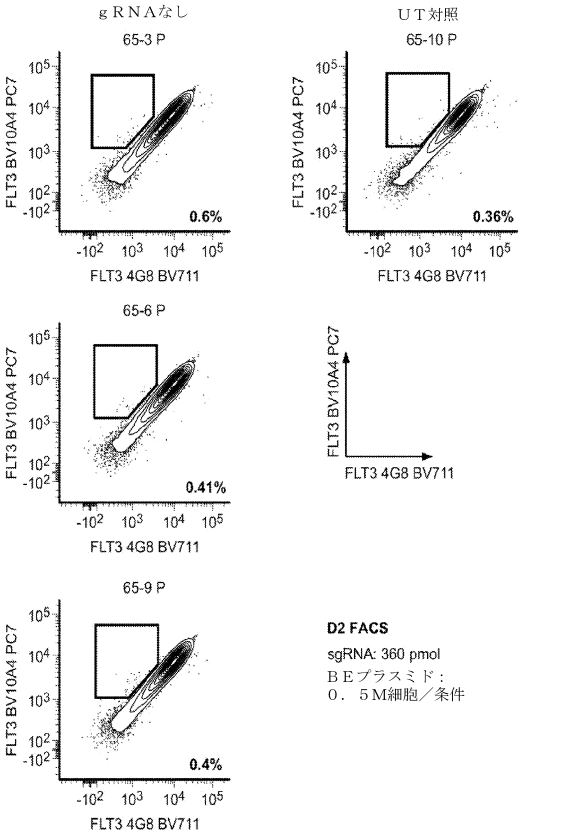
【図１４Ｃ】



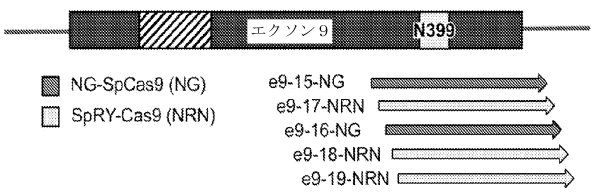
【図１４Ｄ－１】



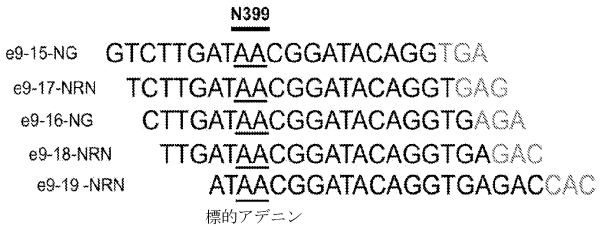
【図１４Ｄ－２】



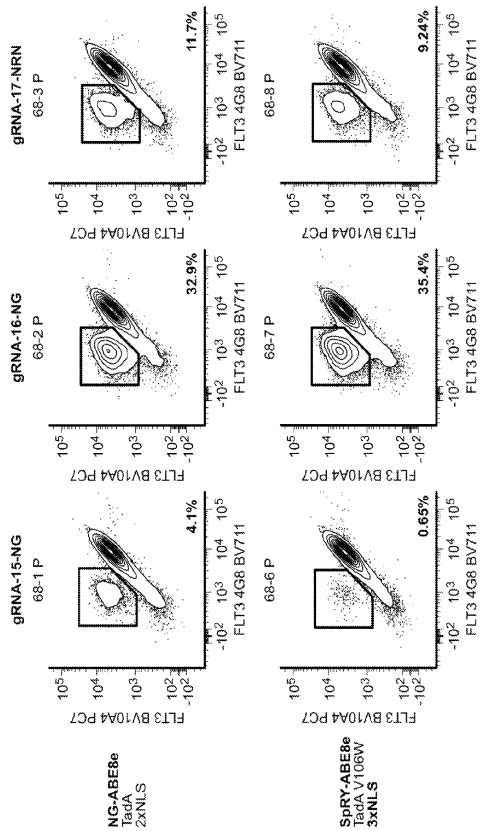
【図１５Ａ】



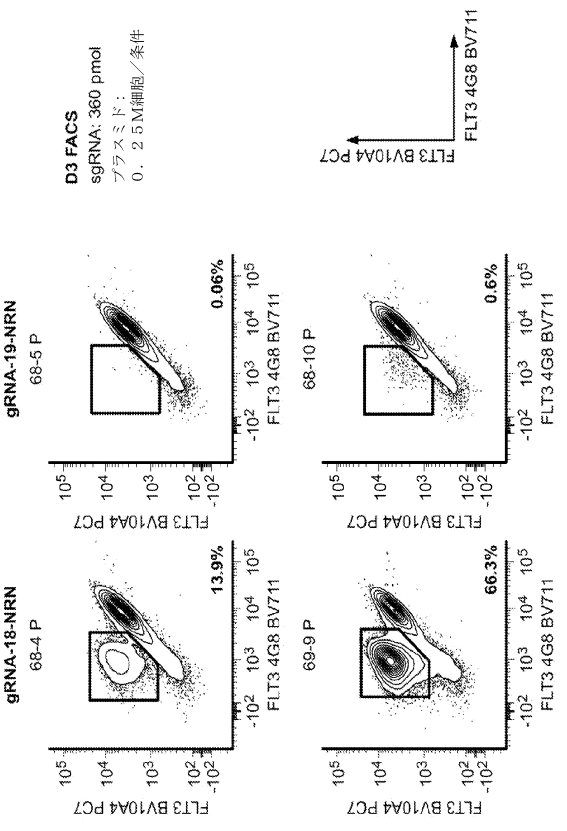
【図１５Ｂ】



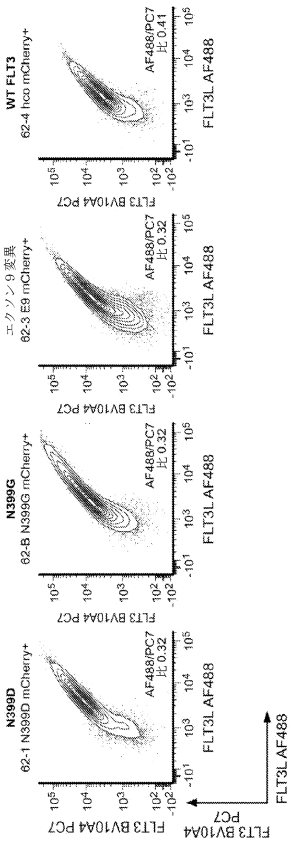
【図１５Ｃ－１】



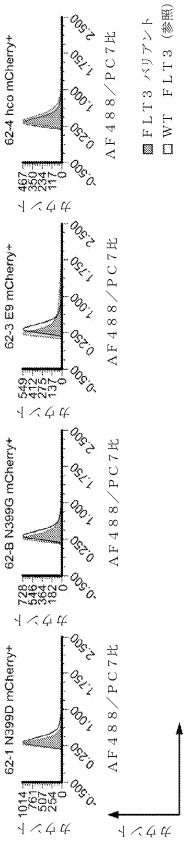
【図１５Ｃ－２】



【図１６Ａ】



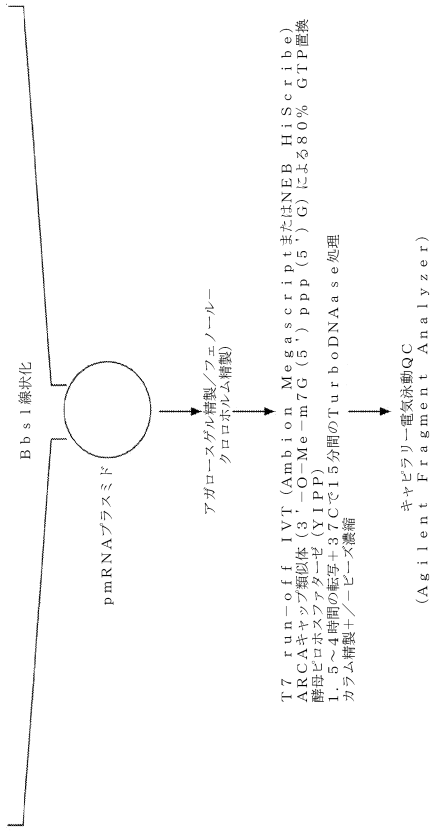
【図１６Ｂ】



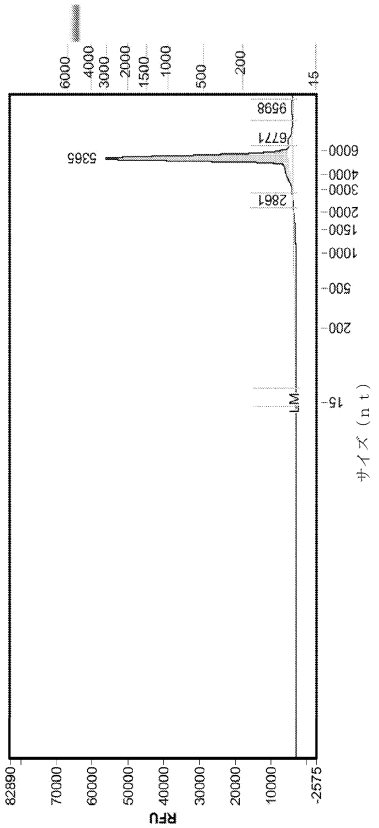
【図１７Ａ】



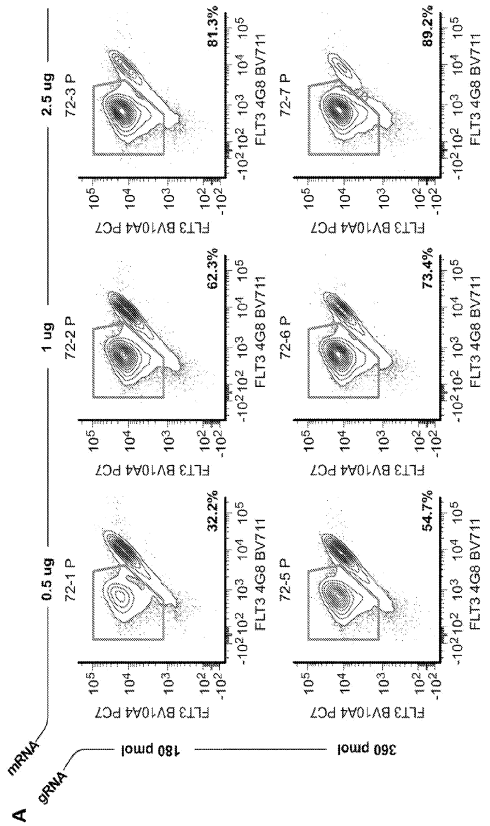
【図１７Ｂ】



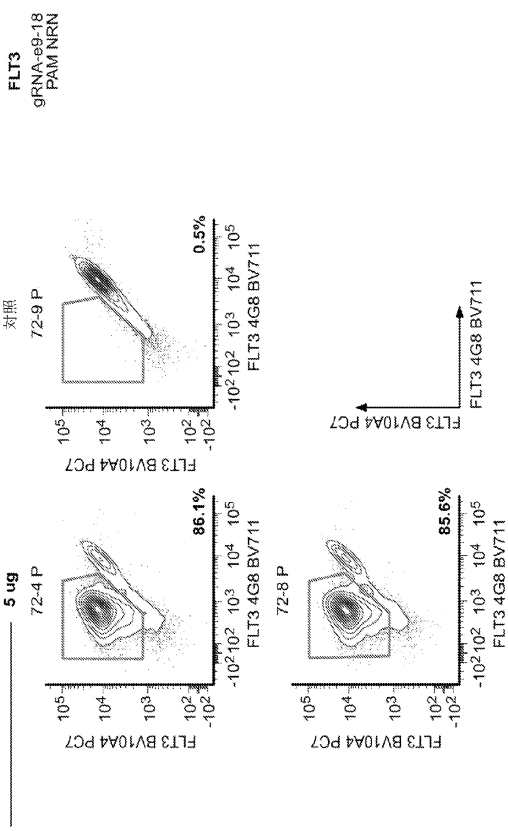
【図１７Ｃ】



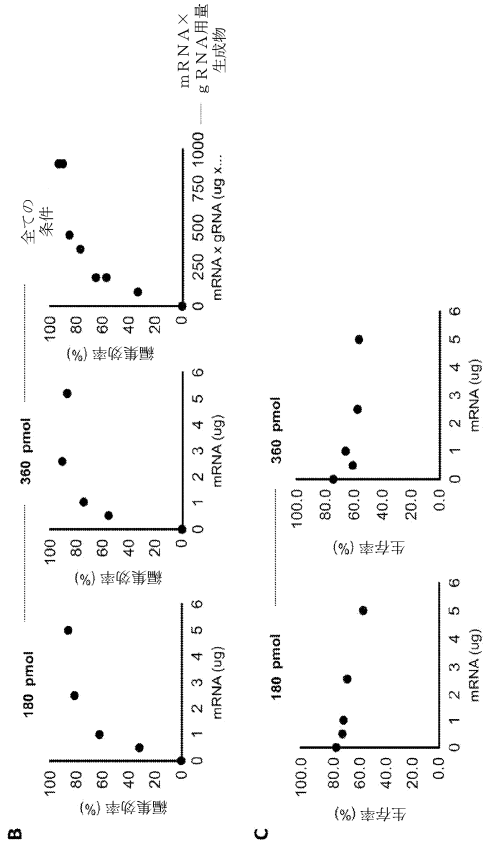
【図１８－１】



【図１８－２】



【図１８－３】



【図１９Ａ】

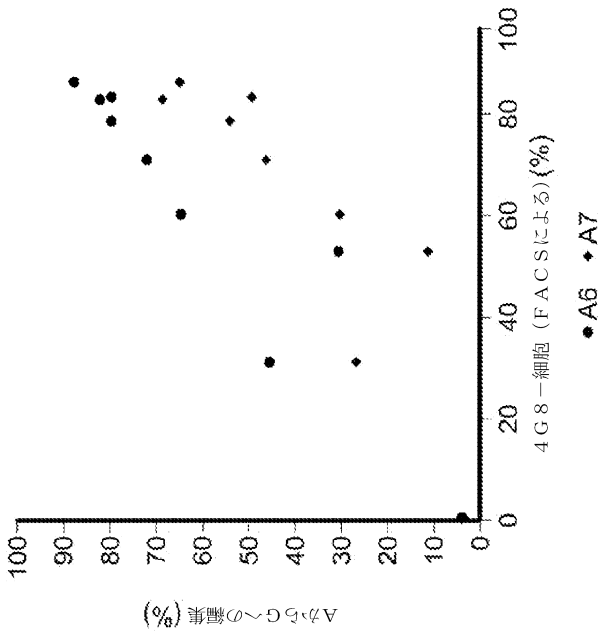
T T G A4 T A6 A7 C G G A11 T A 13 C A15 G G T G A

編集ウィンドウ

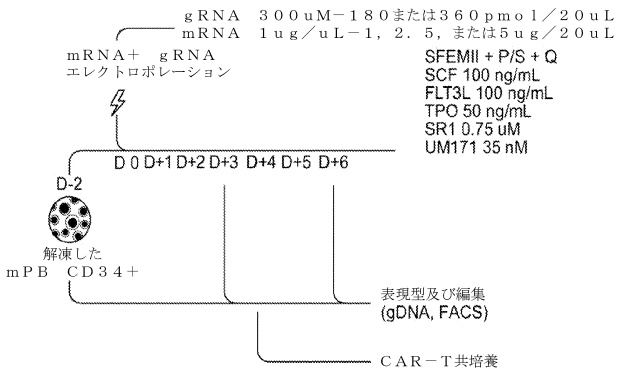
gRNA (pmol)	mRNA (ug)	gRNA x mRNA	条件番号	A4	A6	A7	A11	A13
180	0.5	90	1	17.4	45.8	27.0	14.9	11.9
180	1	180	2	30.3	65.0	30.5	11.0	4.4
180	2.5	450	3	15.9	80.2	54.5	14.9	8.4
180	5	900	4	30.4	80.2	49.6	26.6	42.3
360	0.5	180	5	9.8	30.9	11.4	19.4	0.4
360	1	360	6	20.1	72.5	46.6	16.6	9.8
360	2.5	900	7	27.6	88.3	65.3	21.0	19.8
360	5	1800	8	28.4	82.7	69.1	18.4	15.0
0	0	0	9	2.0	4.1	3.4	2.9	3.8

100 80 60 40 20 0

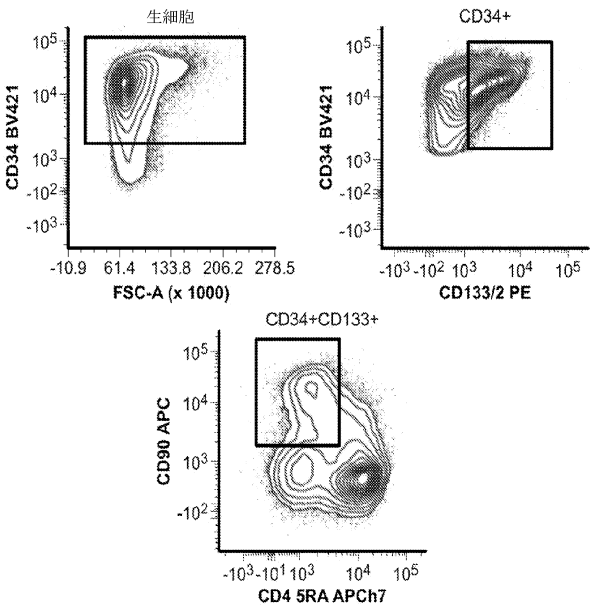
【図１９Ｂ】



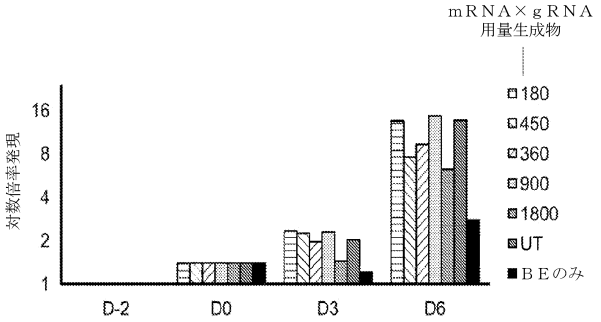
【図２０Ａ】



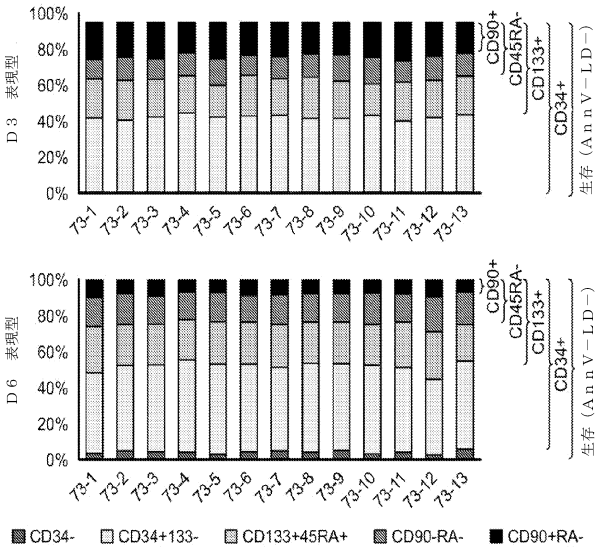
【図２０Ｂ】



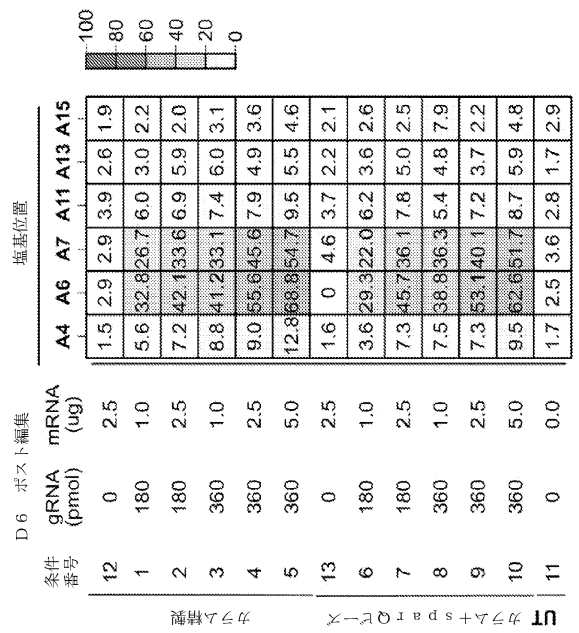
【図２０Ｃ】



【図２０Ｄ】

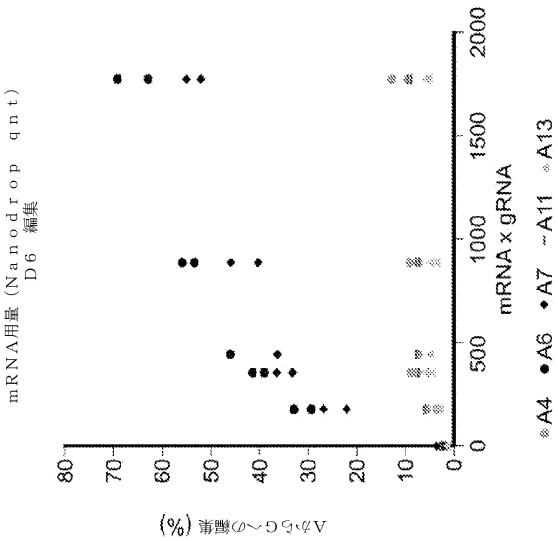


【図２１Ａ】

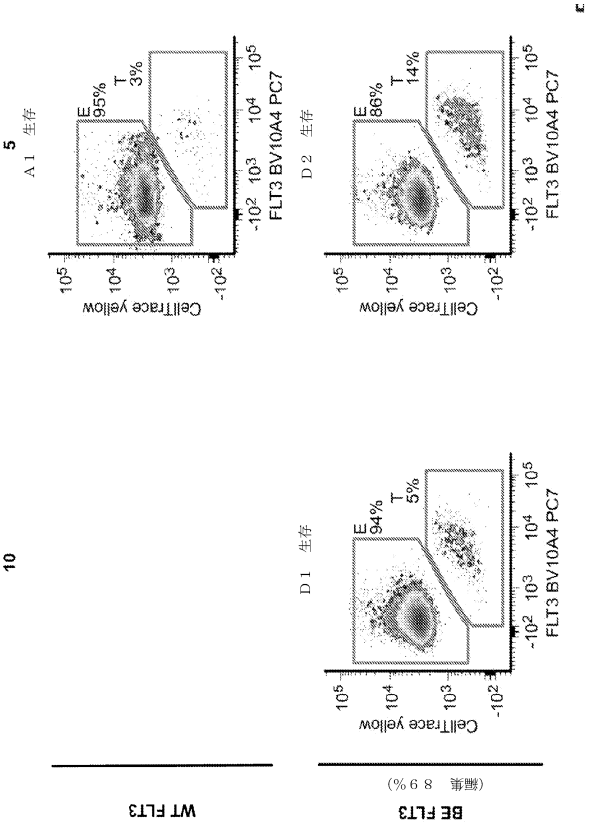


条件番号	gRNA (pmol)	mRNA (ug)	A4	A6	A7	A11	A13	A15
12	0	2.5	1.5	2.9	2.9	3.9	2.6	1.9
1	180	1.0	5.6	32.8	26.7	6.0	3.0	2.2
2	180	2.5	7.2	42.1	33.6	6.9	5.9	2.0
3	360	1.0	8.8	41.2	33.1	7.4	6.0	3.1
4	360	2.5	9.0	55.6	45.6	7.9	4.9	3.6
5	360	5.0	12.8	68.8	54.7	9.5	5.5	4.6
13	0	2.5	1.6	0	4.6	3.7	2.2	2.1
6	180	1.0	3.6	29.3	22.0	6.2	3.6	2.6
7	180	2.5	7.3	45.7	36.1	7.8	5.0	2.5
8	360	1.0	7.5	38.8	36.3	5.4	4.8	7.9
9	360	2.5	7.3	53.1	40.1	7.2	3.7	2.2
10	360	5.0	9.5	62.6	51.7	8.7	5.9	4.8
11	0	0.0	1.7	2.5	3.6	2.8	1.7	2.9

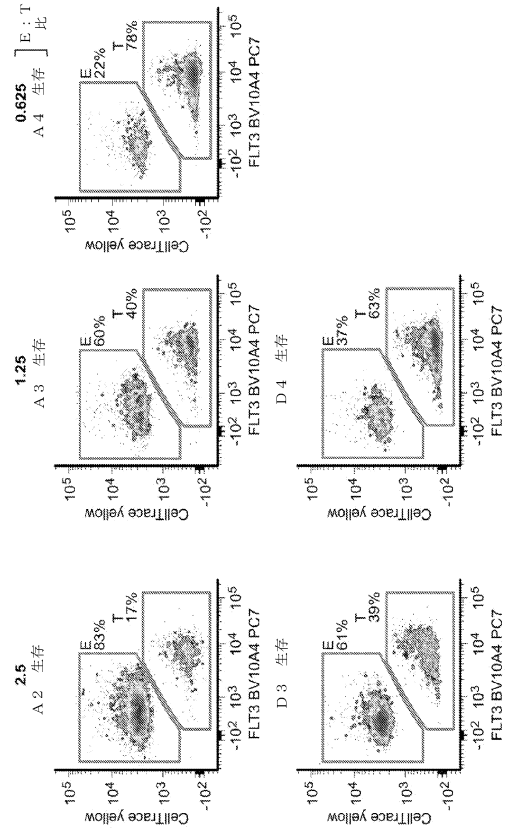
【図２１Ｂ】



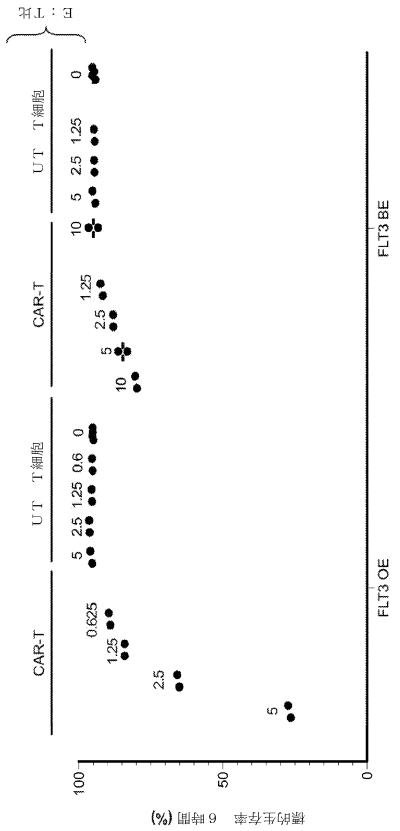
【図２２Ａ－１】



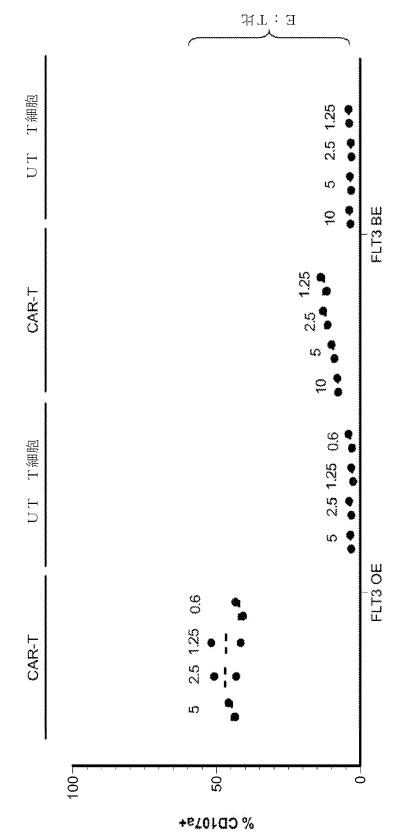
【図２２Ａ－２】



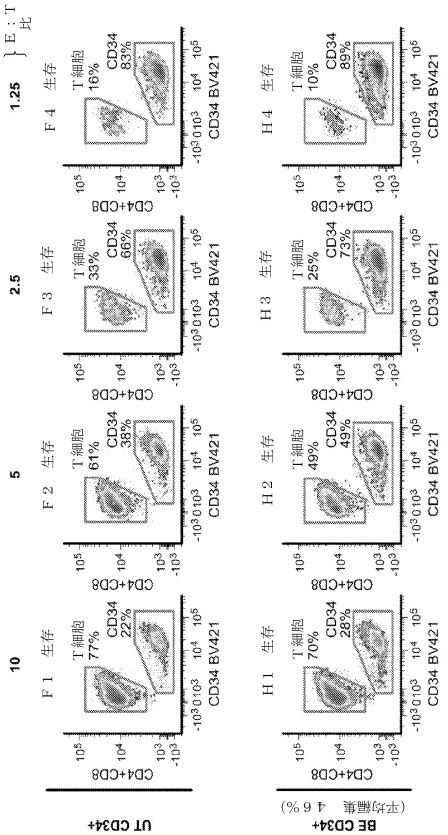
【図２２Ｂ】



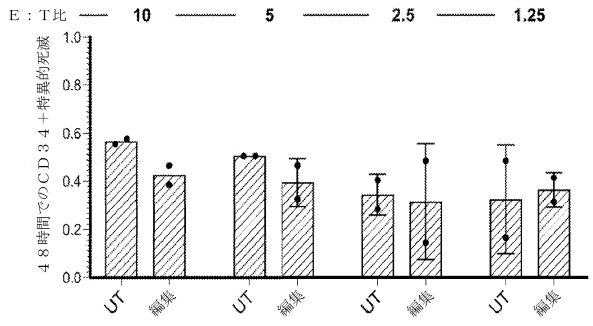
【図２２Ｃ】



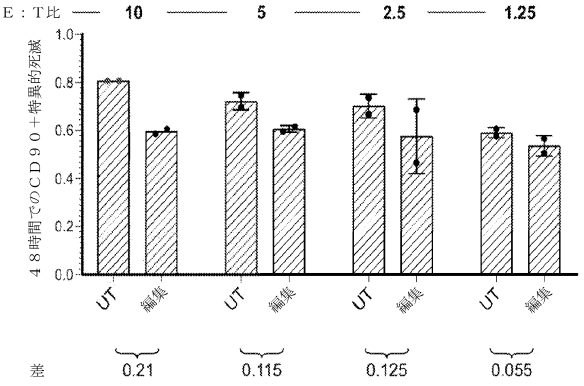
【図２３Ａ】



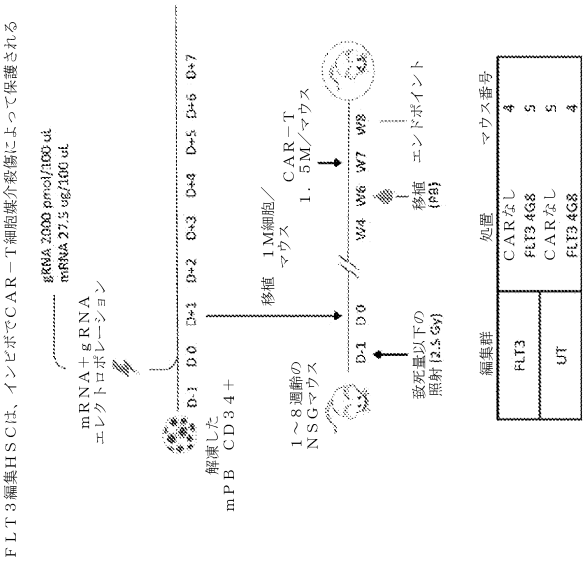
【図２３Ｂ】



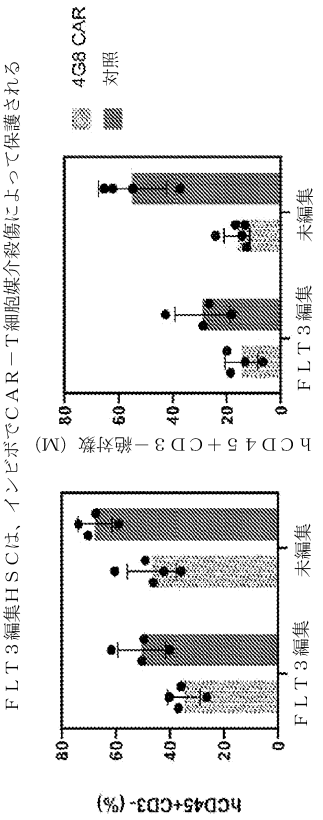
【図２３Ｃ】



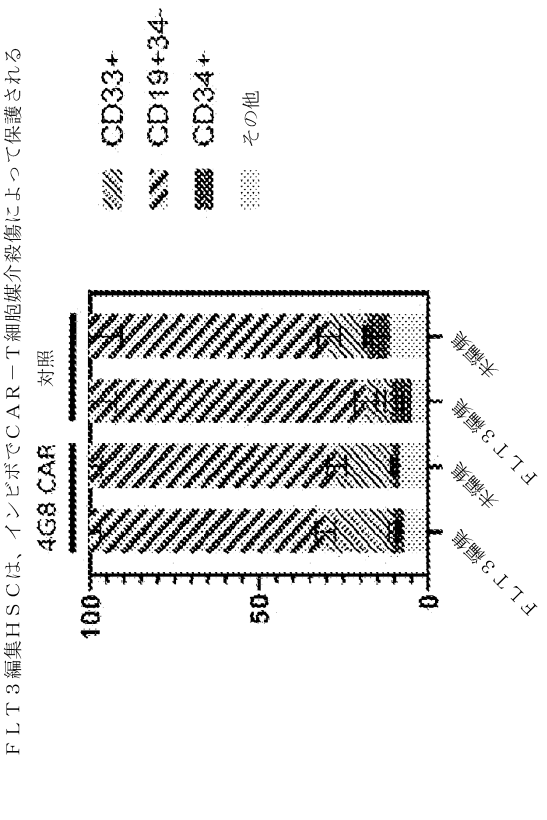
【図２４Ａ】



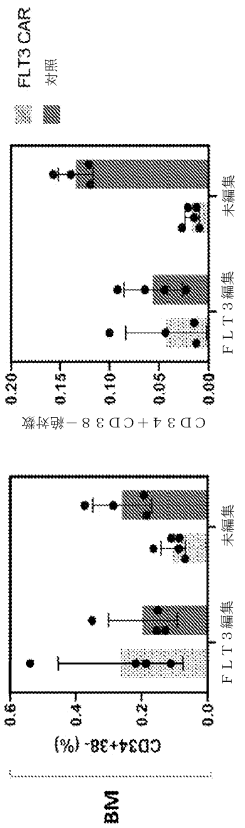
【図２４Ｂ】



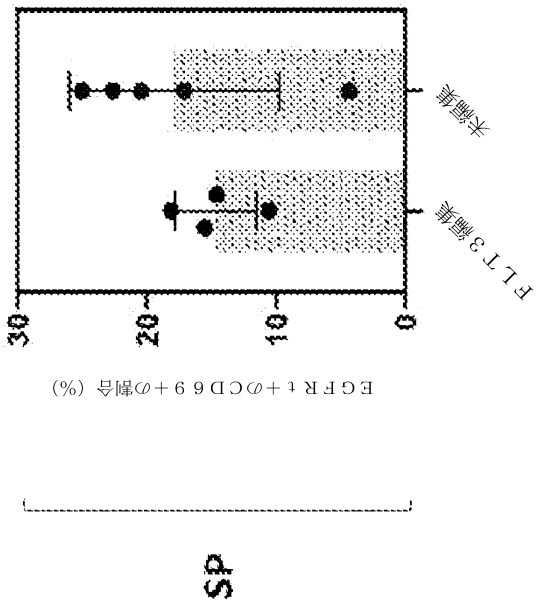
【図２４Ｃ】



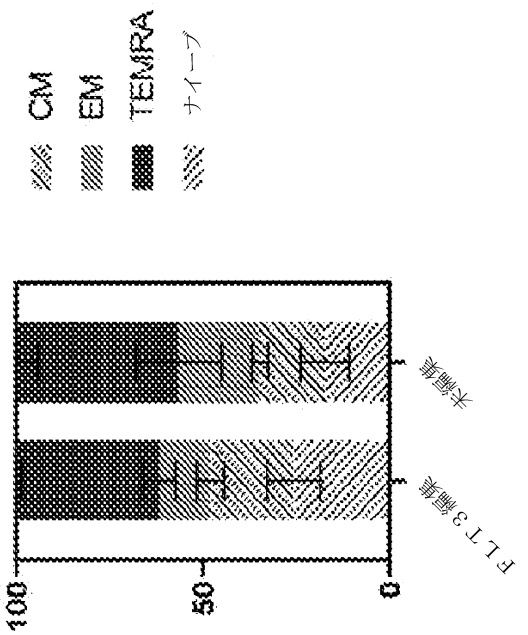
【図２５Ａ】



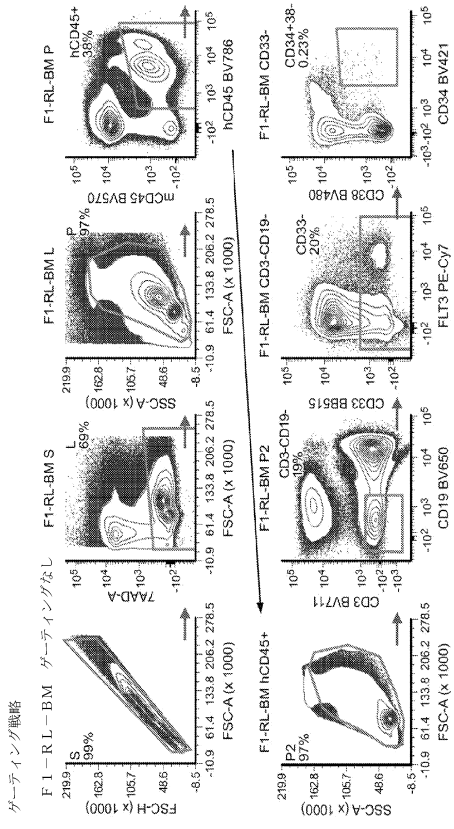
【図２５Ｂ】



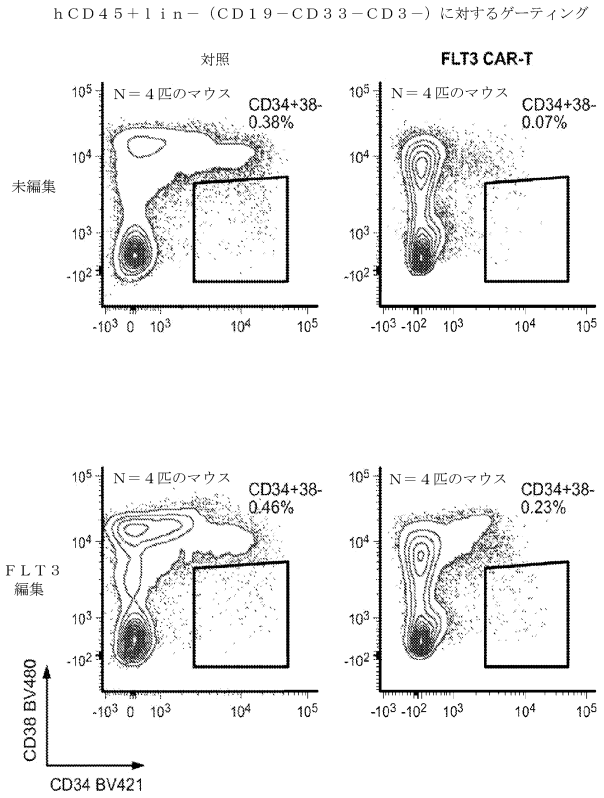
【図２５Ｃ】



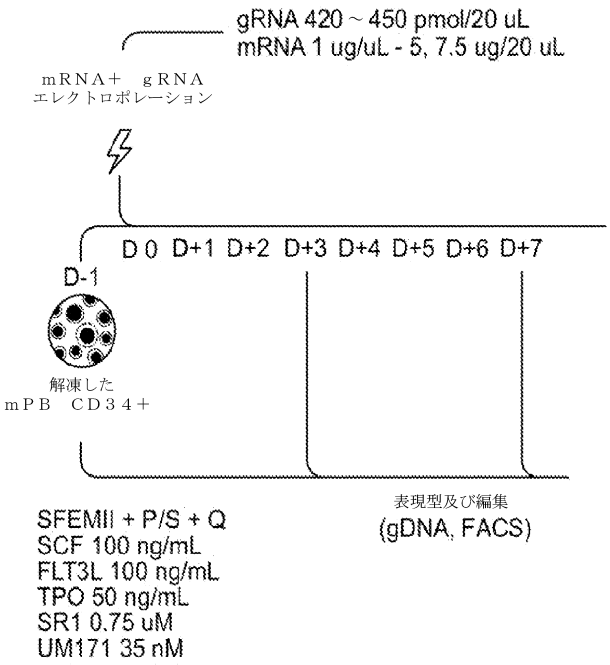
【図２５Ｄ】



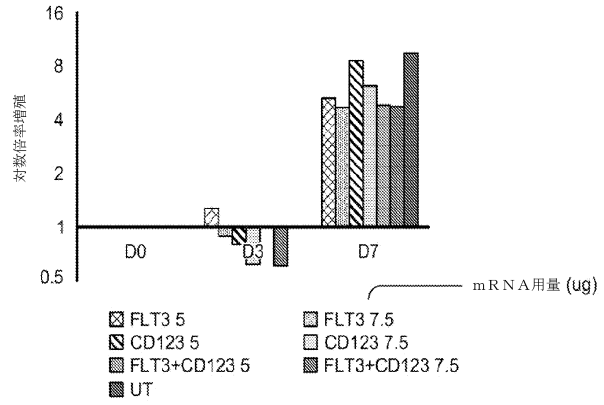
【図２５Ｅ】



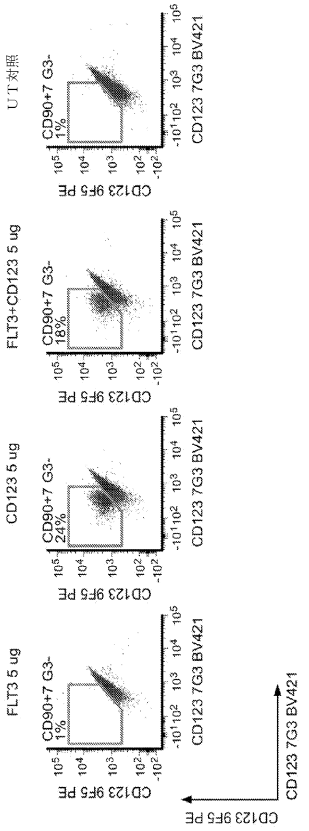
【図２６Ａ】



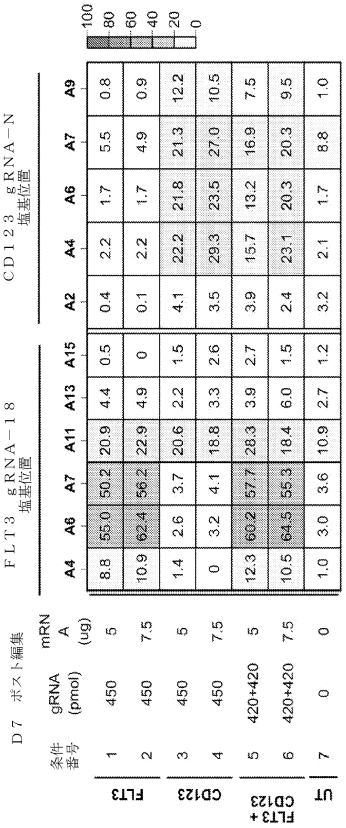
【図２６Ｂ】



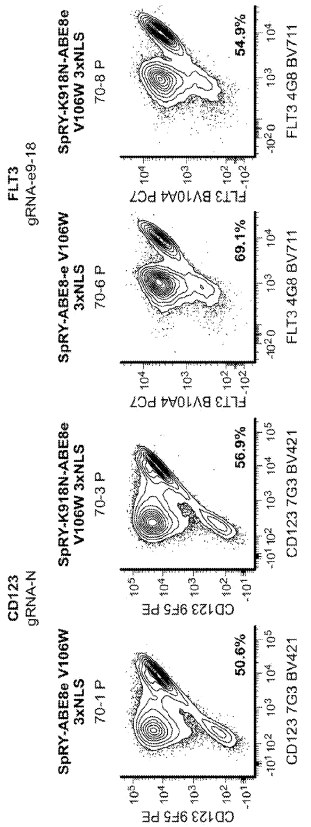
【図２６Ｃ】



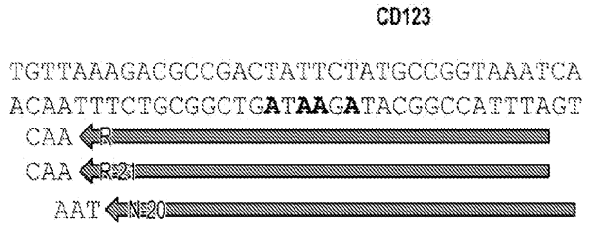
【図２７】



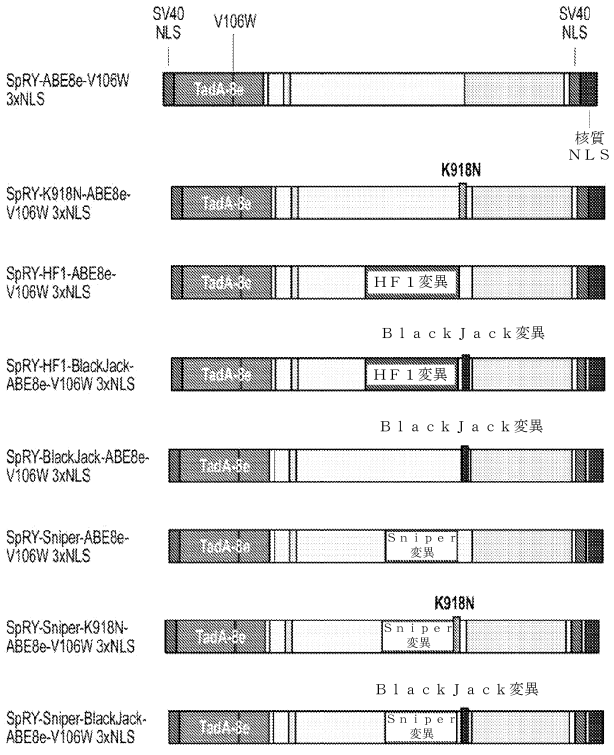
【図２８Ａ】



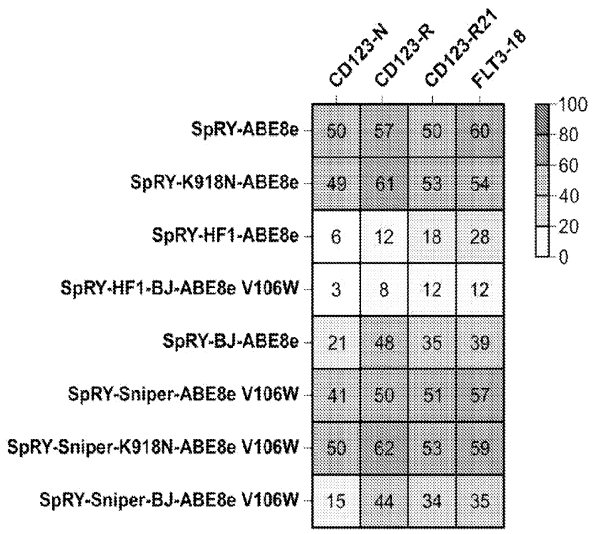
【図２８Ｂ】



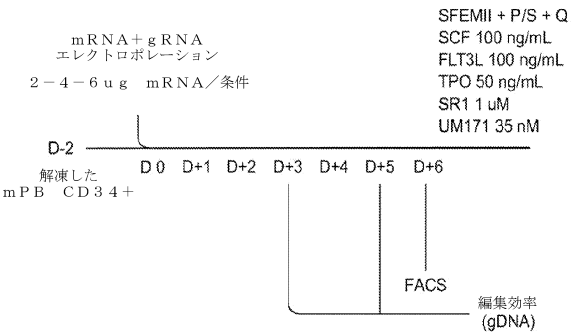
【図２８Ｃ】



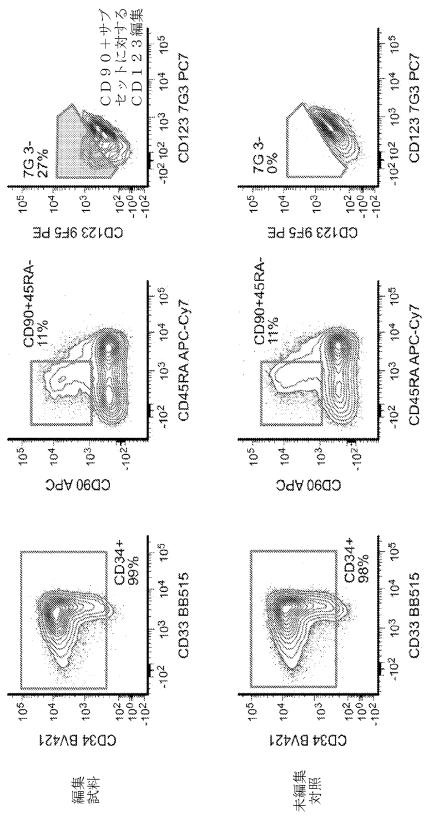
【図２８Ｄ】



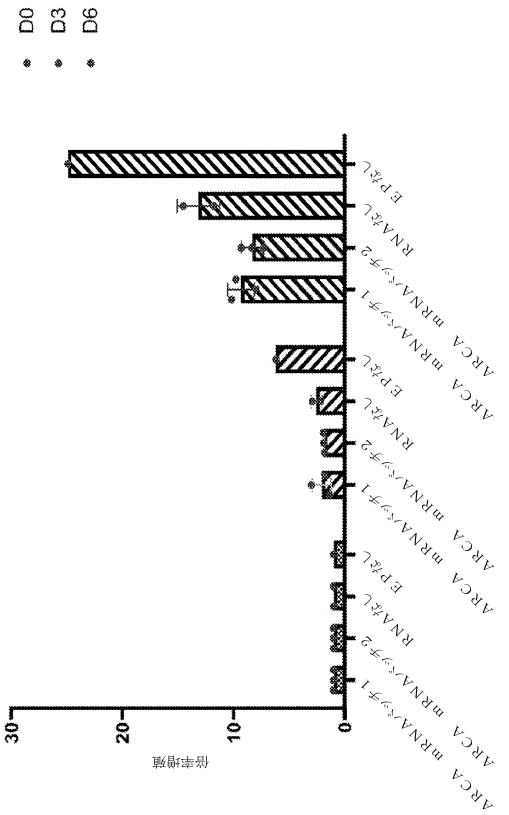
【図２９Ａ】



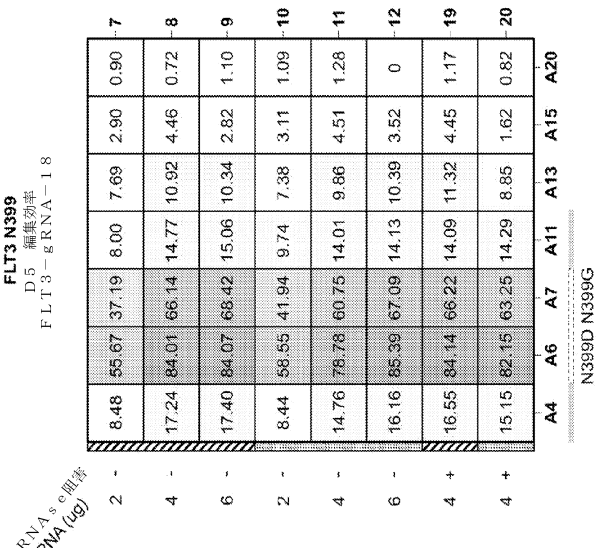
【図２９Ｂ】



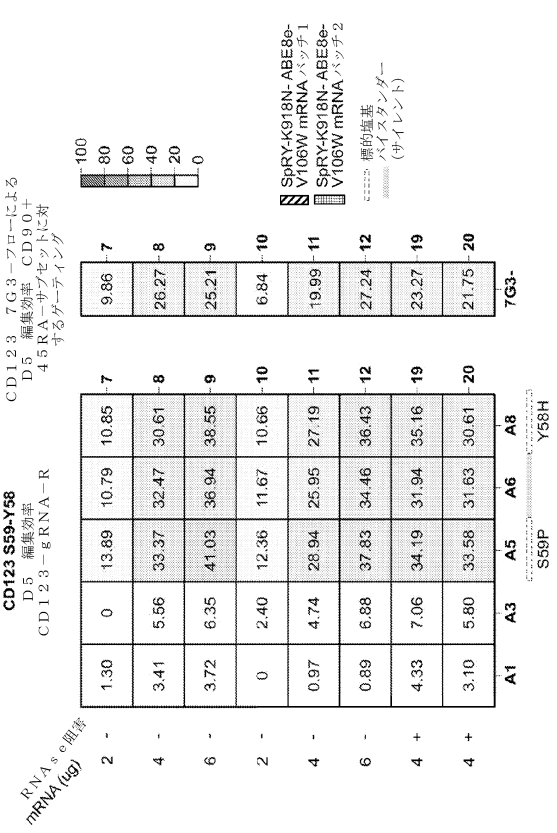
【図２９Ｃ】



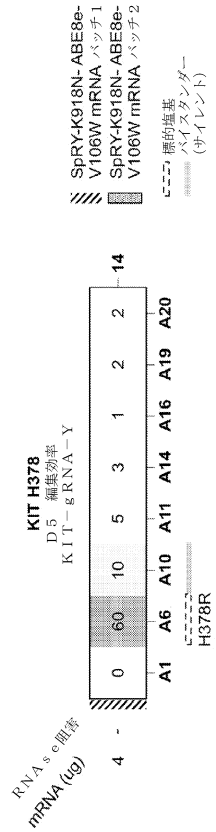
【図３０－１】



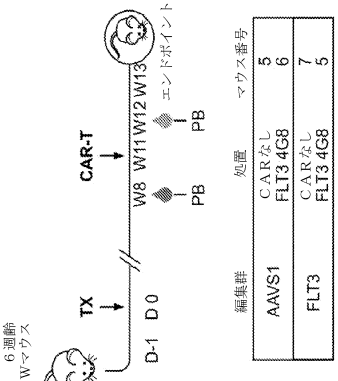
【図３０－２】



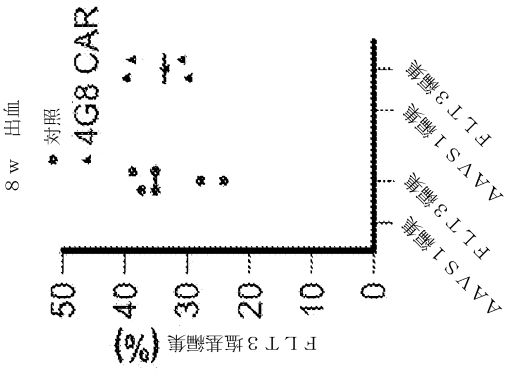
【図３１】



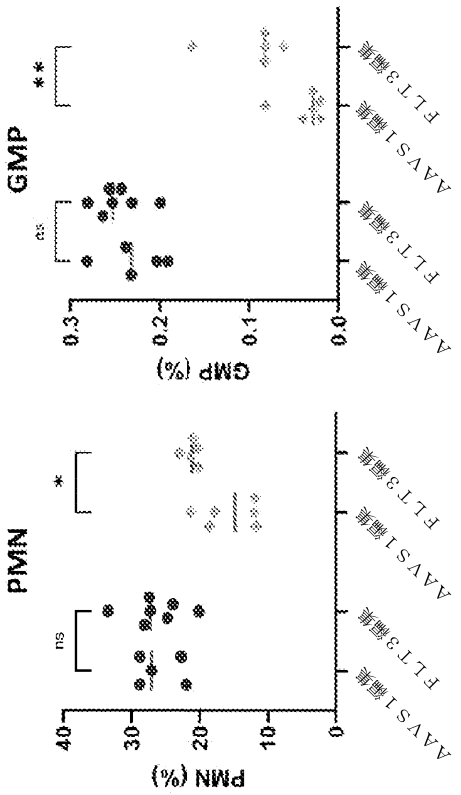
【図３２Ａ】



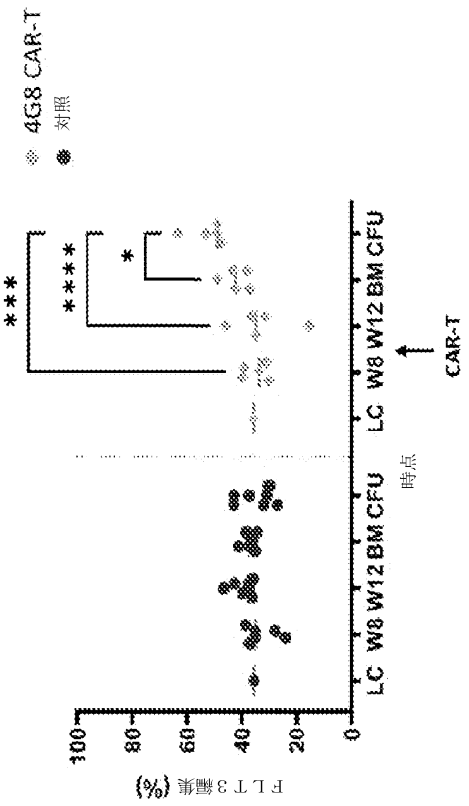
【図３２Ｂ】



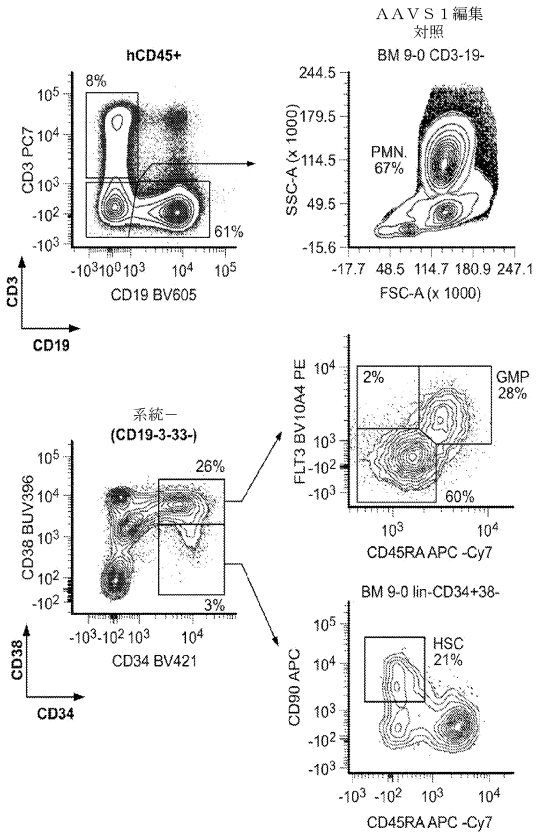
【図３３Ａ】



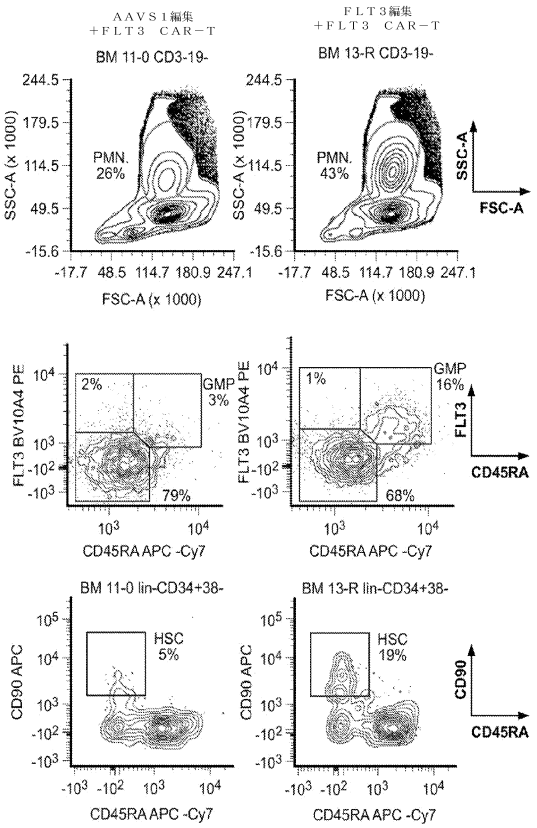
【図３３Ｂ】



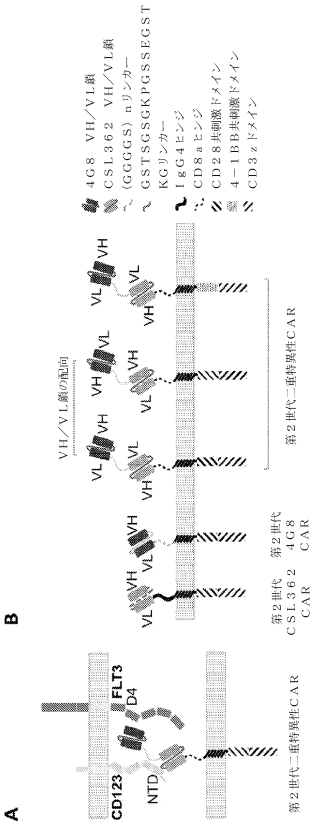
【図３４－１】



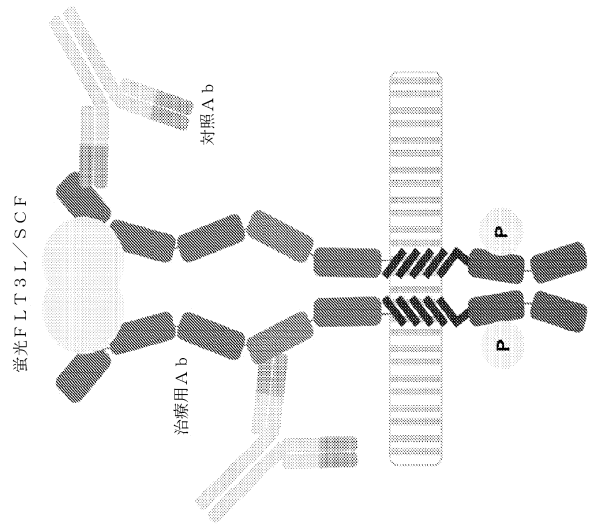
【図３４－２】



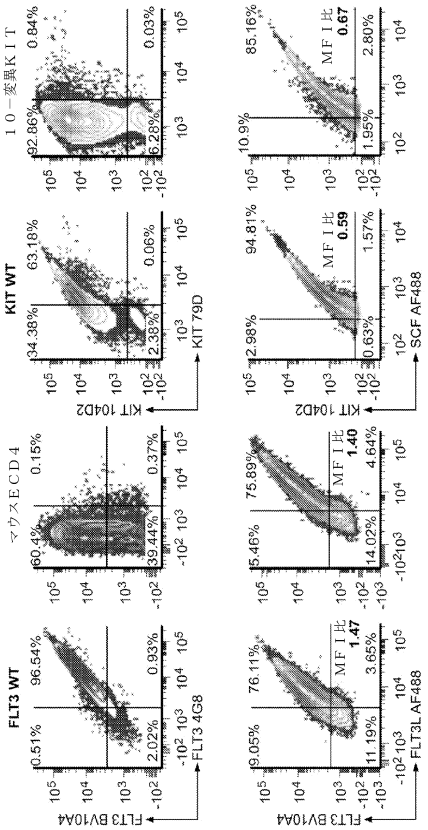
【図３５】



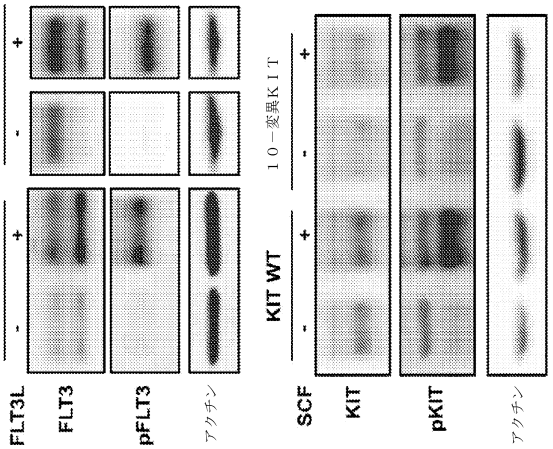
【図３６Ａ】



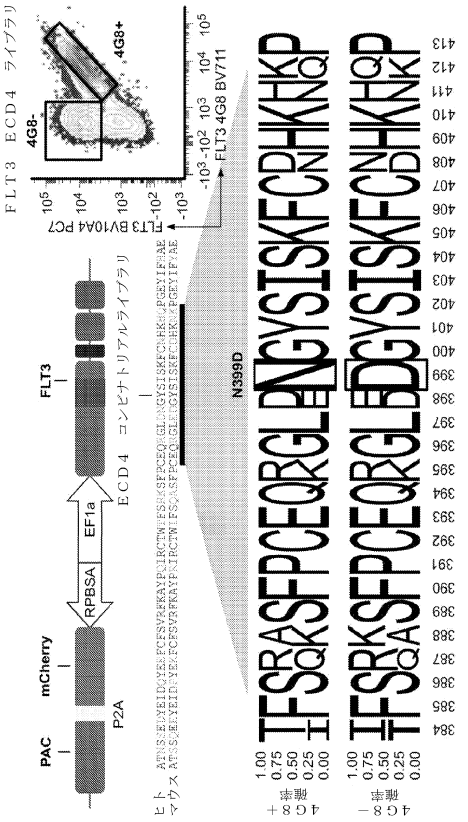
【図３６Ｂ】



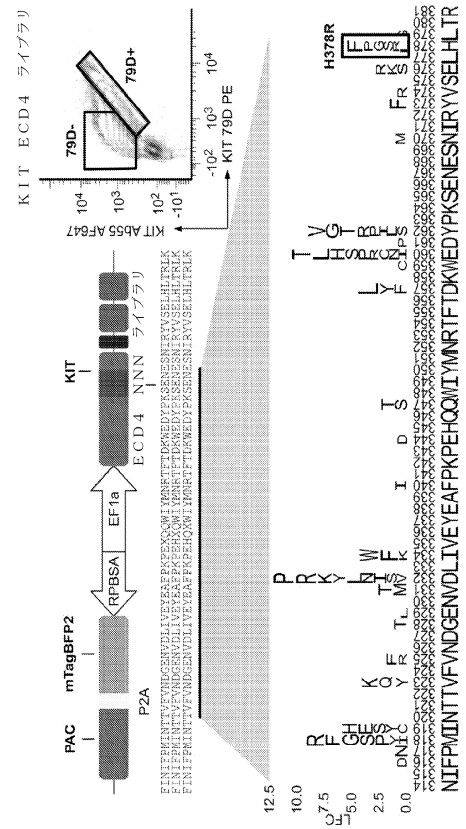
【図３６Ｃ】



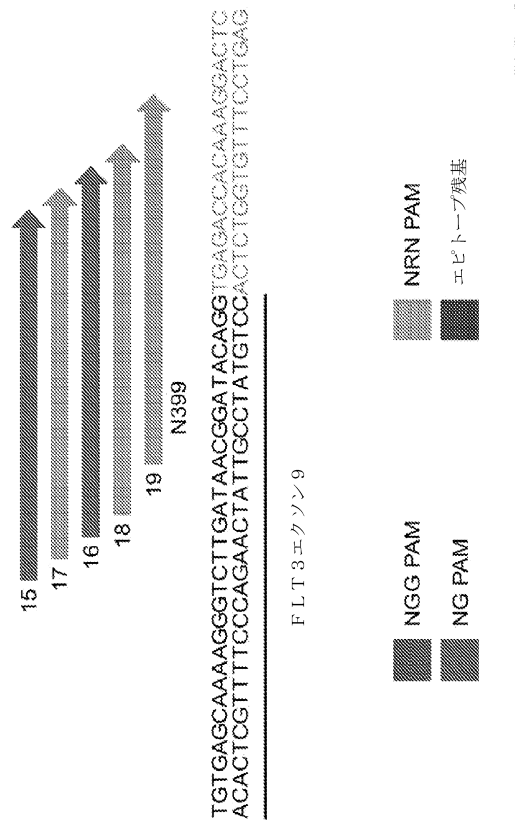
【図３６Ｄ】



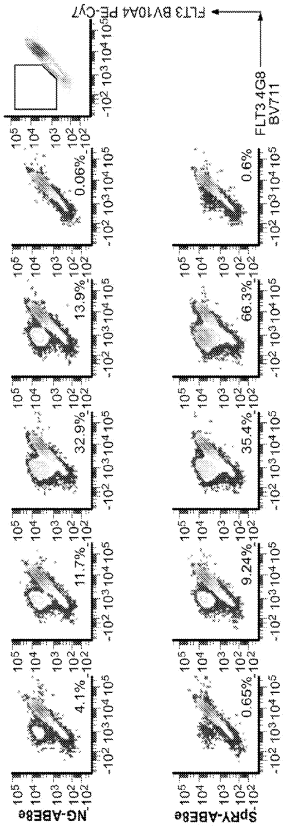
【図３６Ｅ】



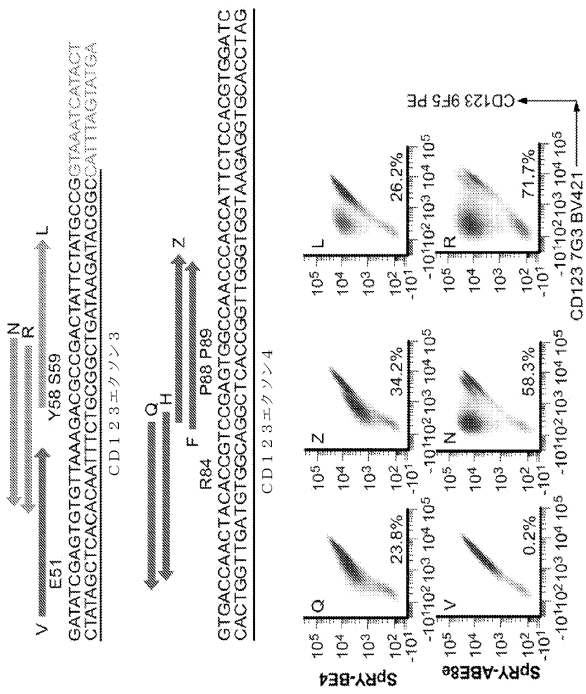
【図３６Ｆ－１】



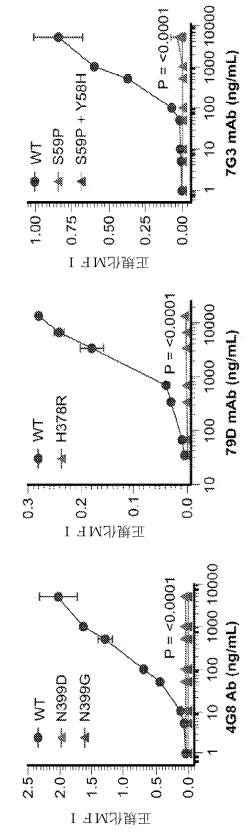
【図３６Ｆ－２】



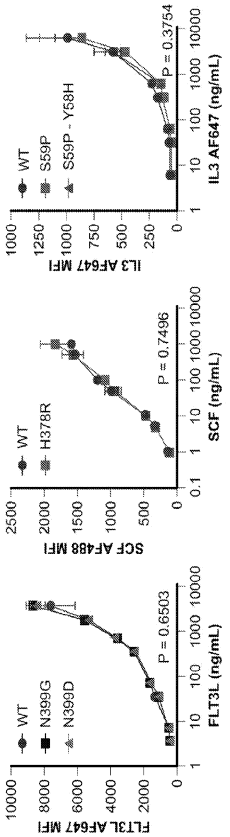
【図３６Ｇ】



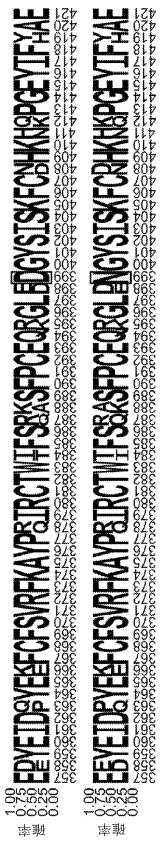
【図３６Ｈ】



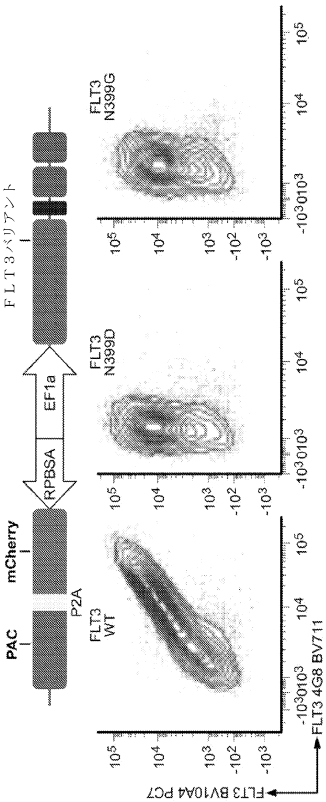
【図３６Ｉ】



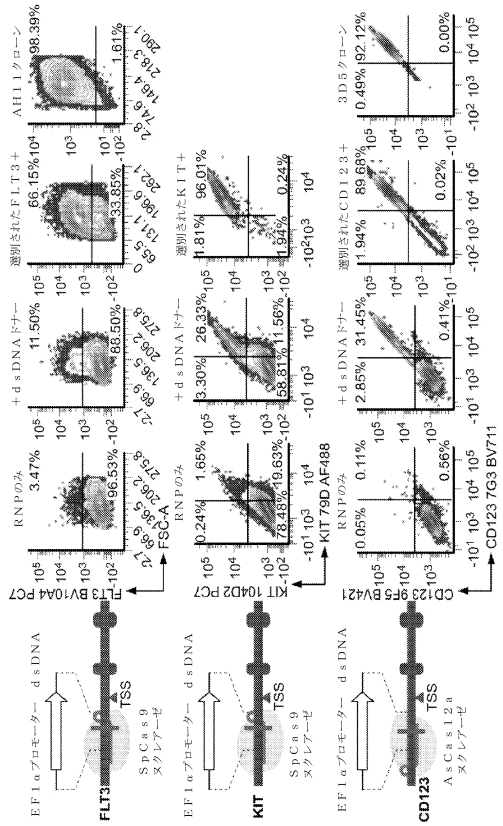
【図３７Ａ】



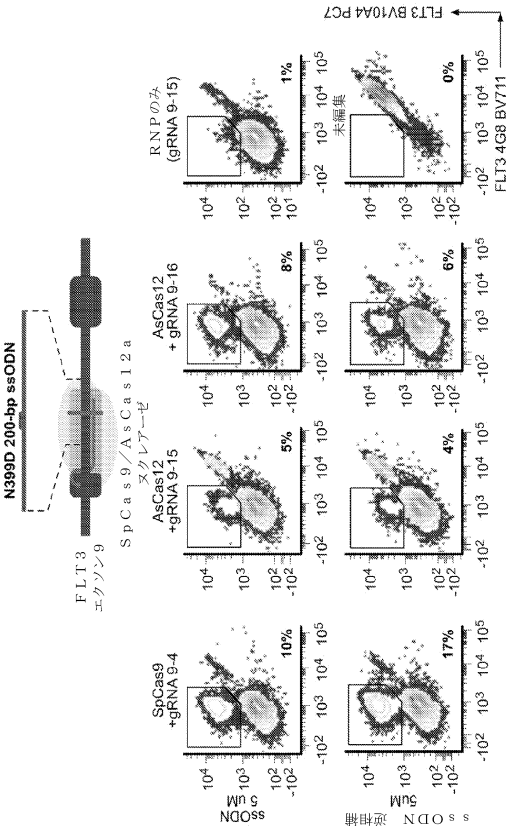
【図３７Ｂ】



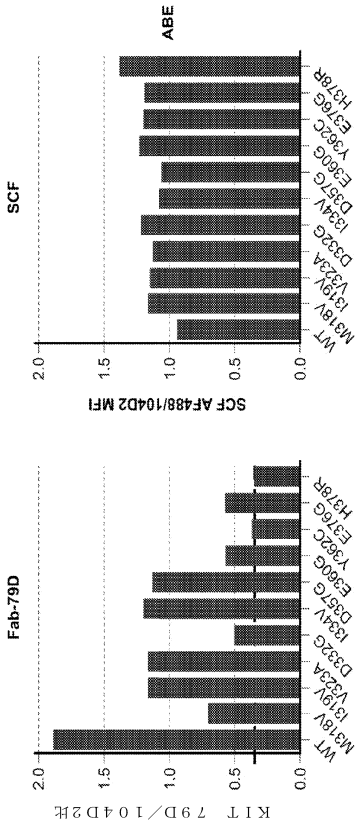
【図３７Ｃ】



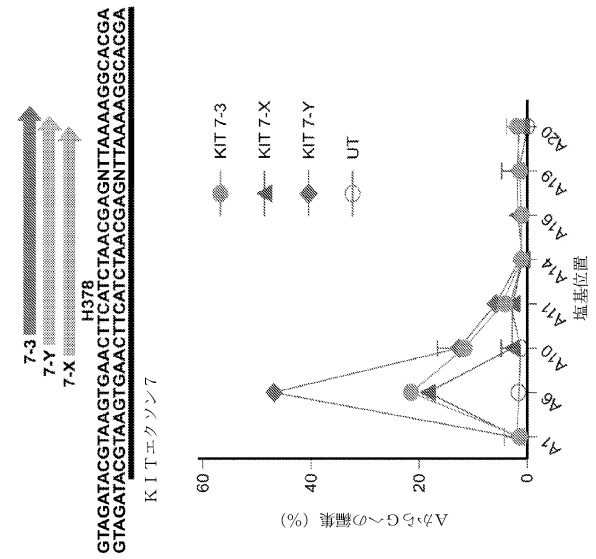
【図３７Ｄ】



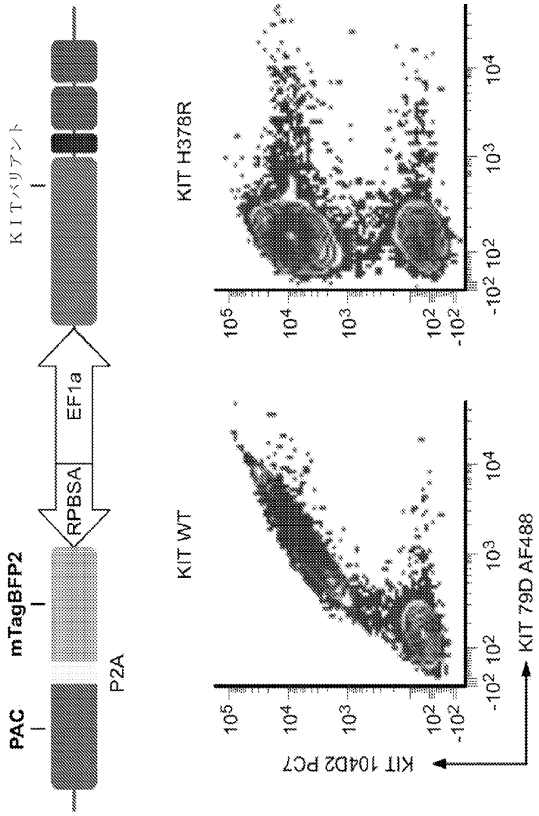
【図３７Ｅ】



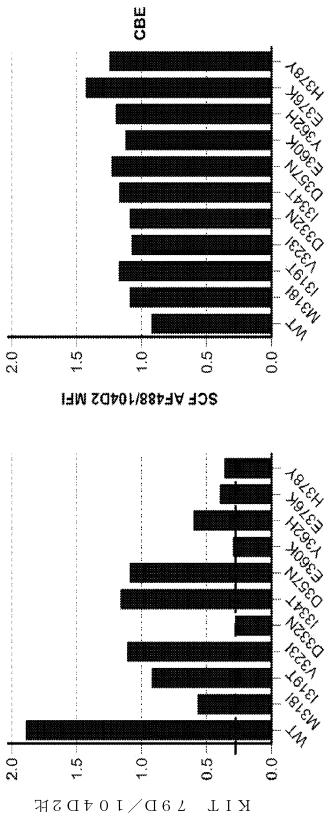
【図３７Ｆ】



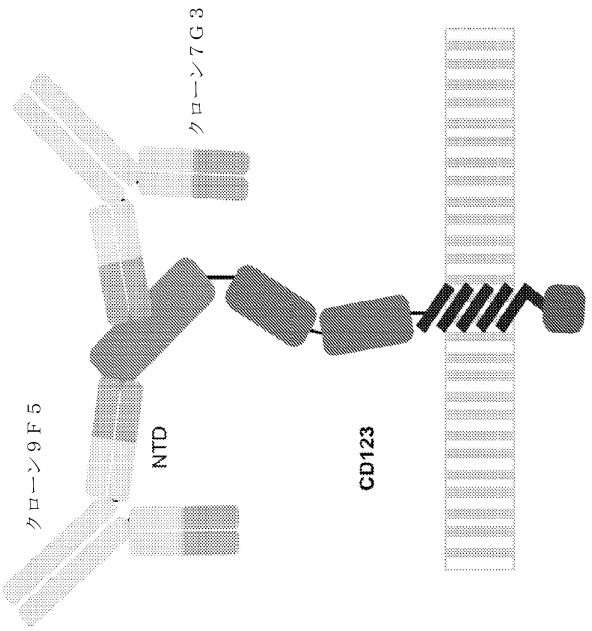
【図３７Ｇ－１】



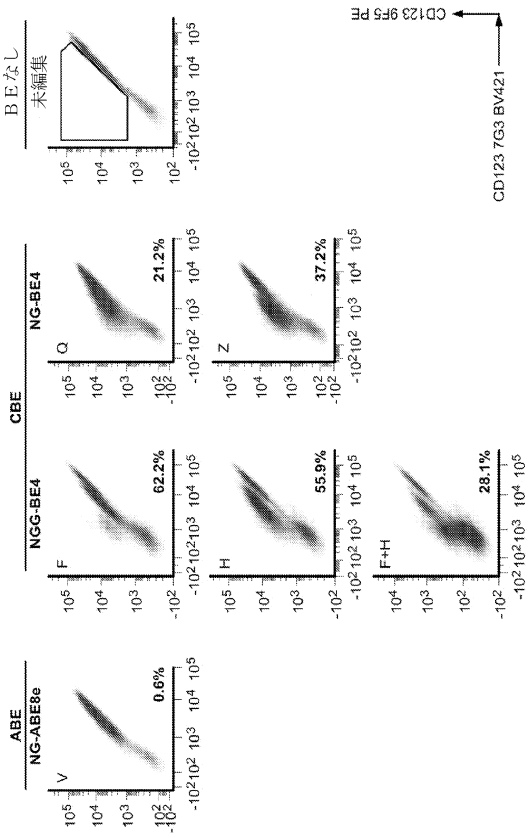
【図３７Ｇ－２】



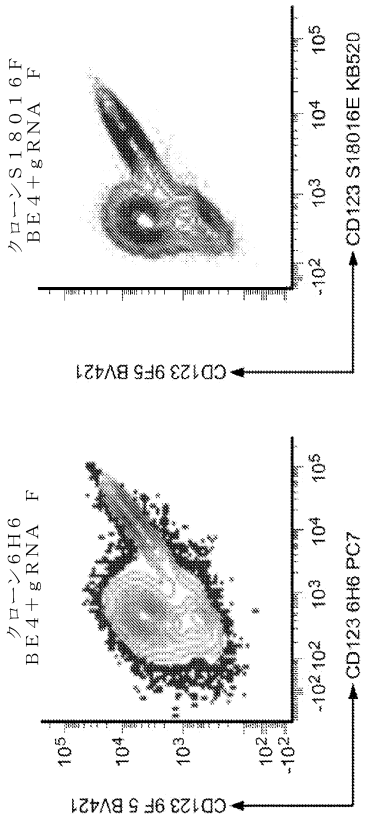
【図３７Ｈ－１】



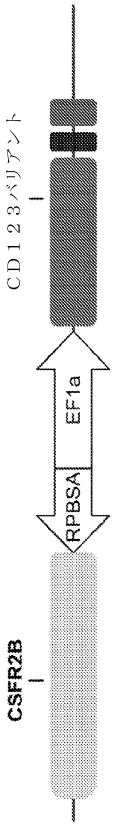
【図３７Ｈ－２】



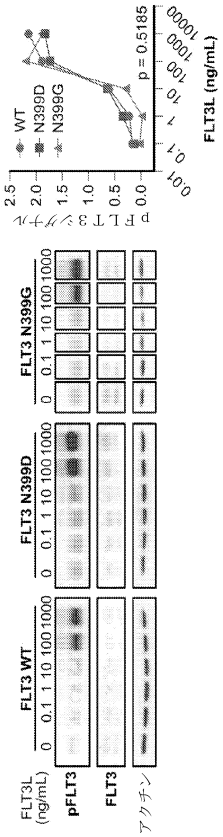
【図３７Ｉ】



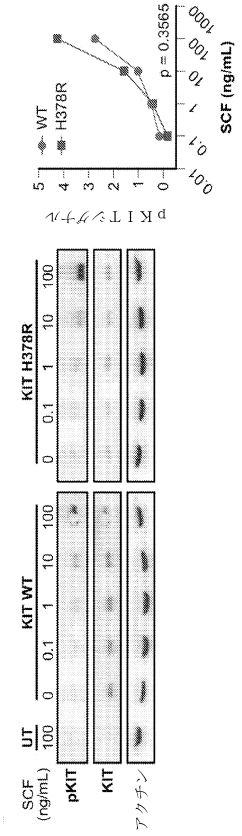
【図３７Ｊ】



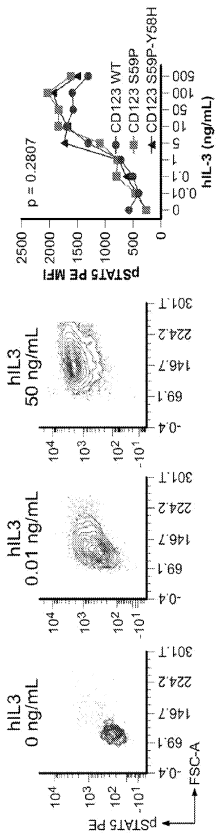
【図３８Ａ】



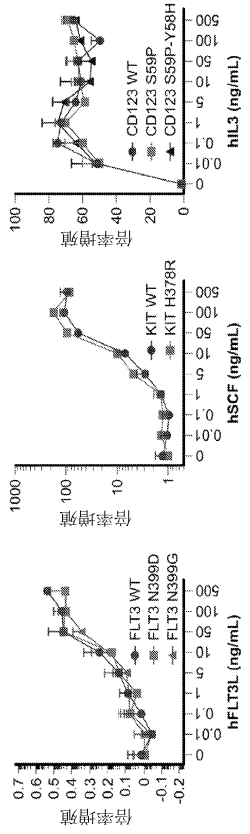
【図３８Ｂ】



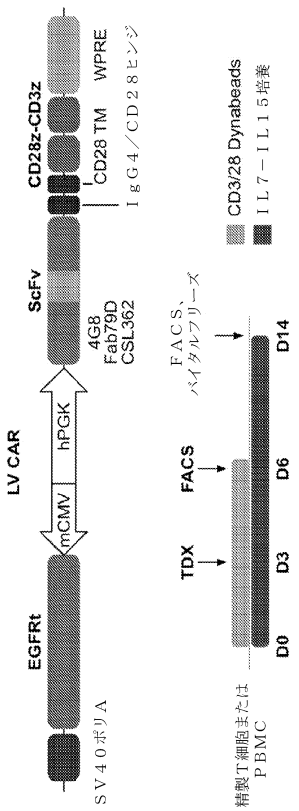
【図３８Ｃ】



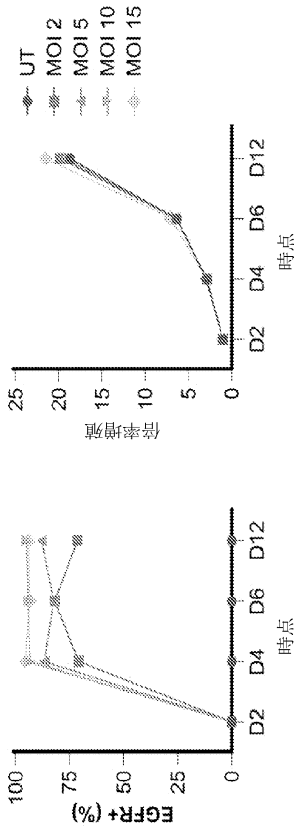
【図３８Ｄ】



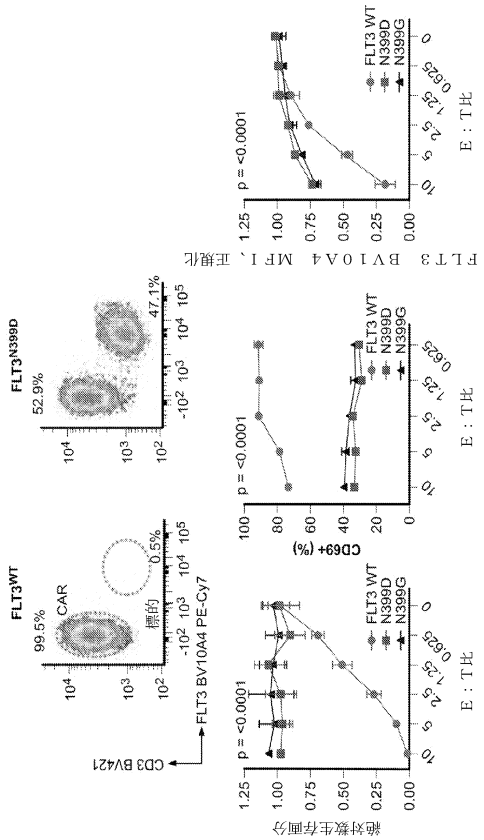
【図３９Ａ】



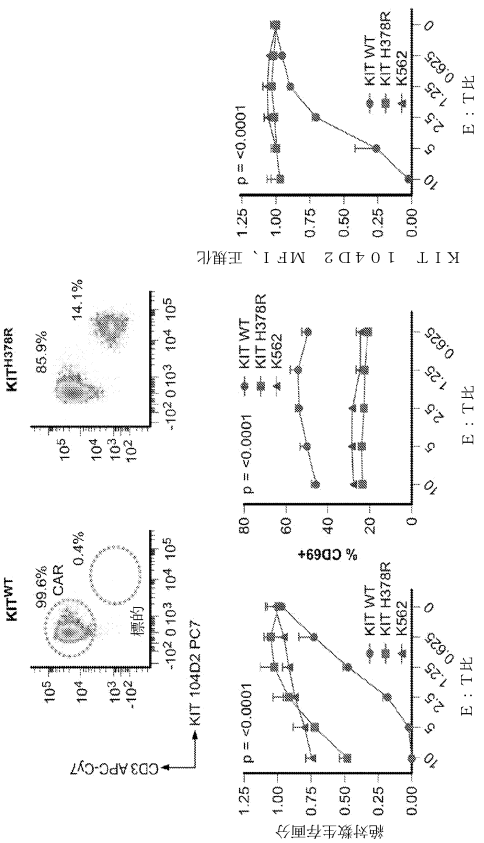
【図３９Ｂ】



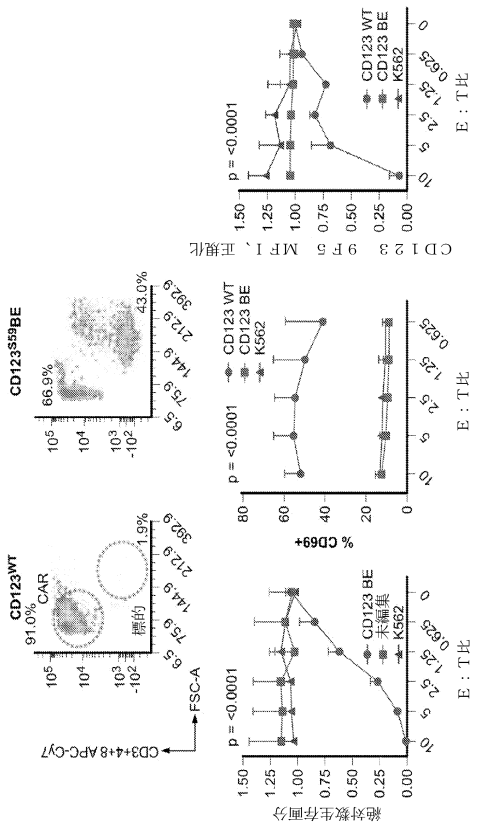
【図３９Ｃ】



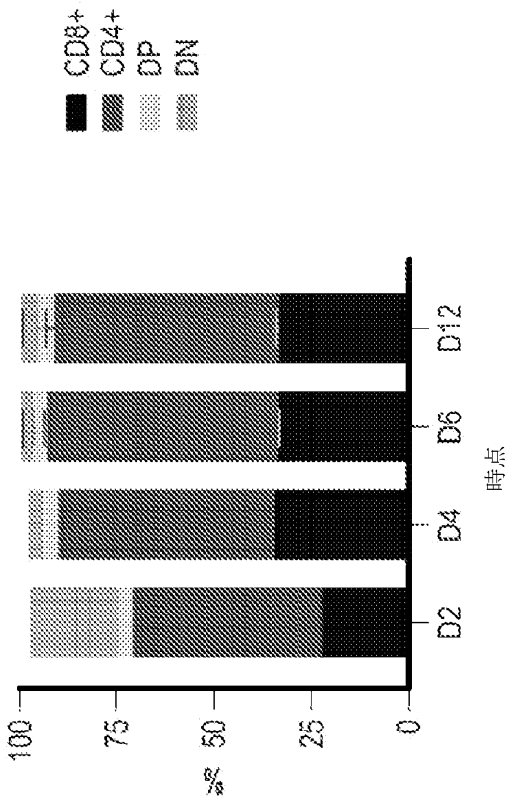
【図３９Ｄ】



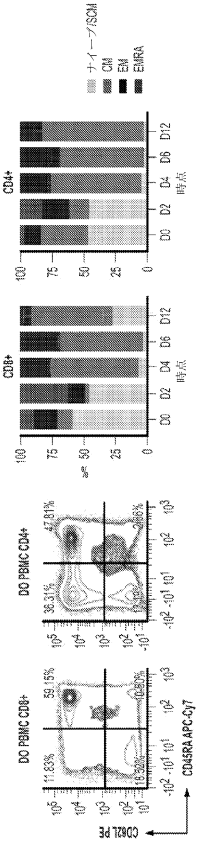
【図３９Ｅ】



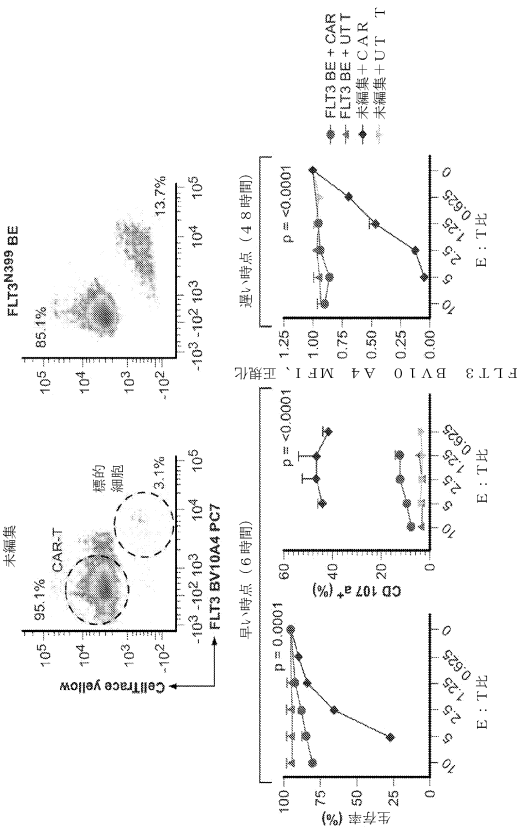
【図４０Ａ】



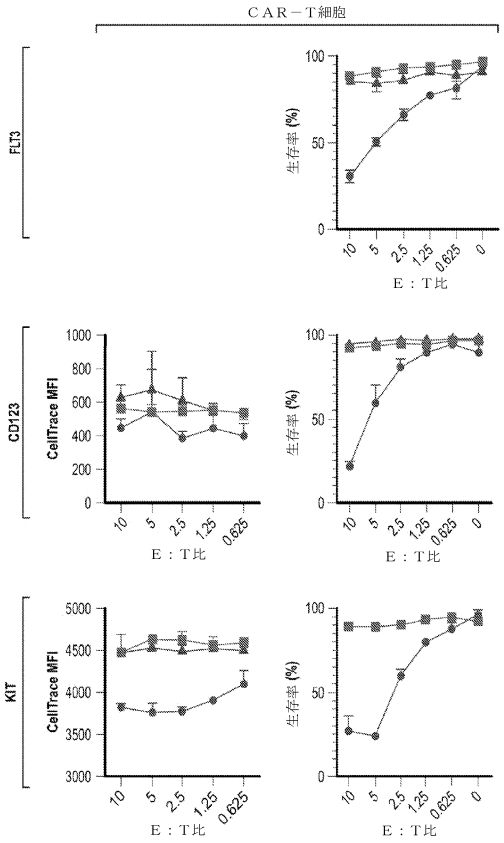
【図４０Ｂ】



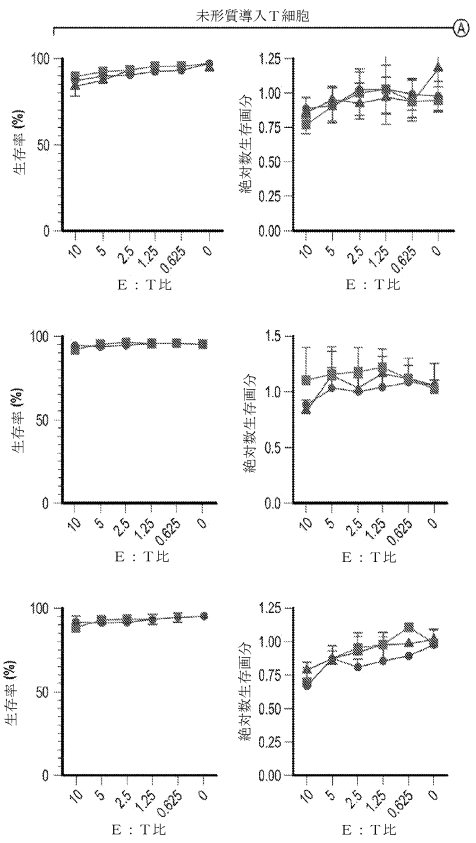
【図４０Ｃ】



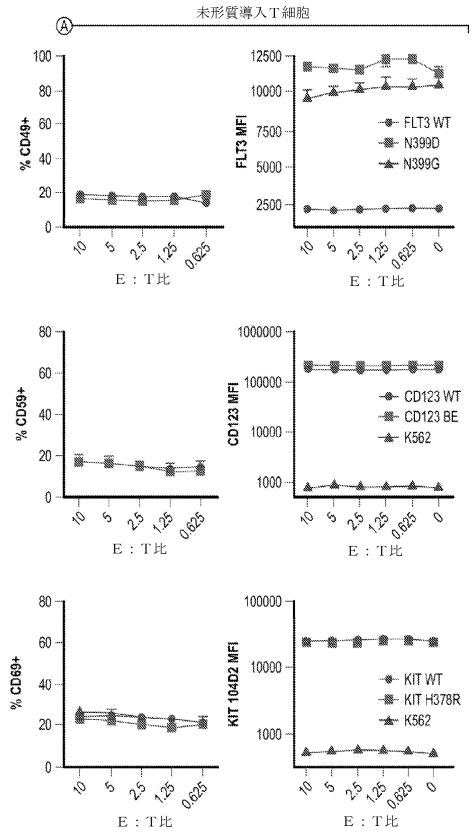
【図４０Ｄ－１】



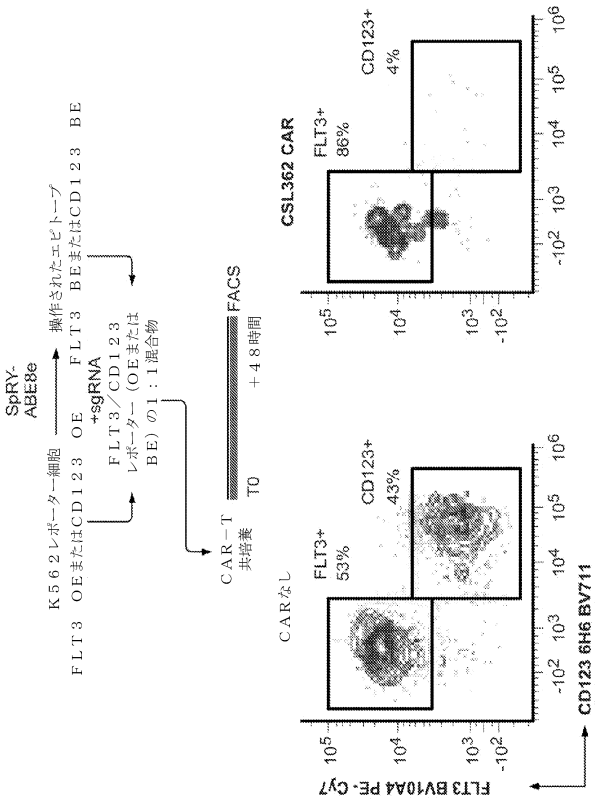
【図４０Ｄ－２】



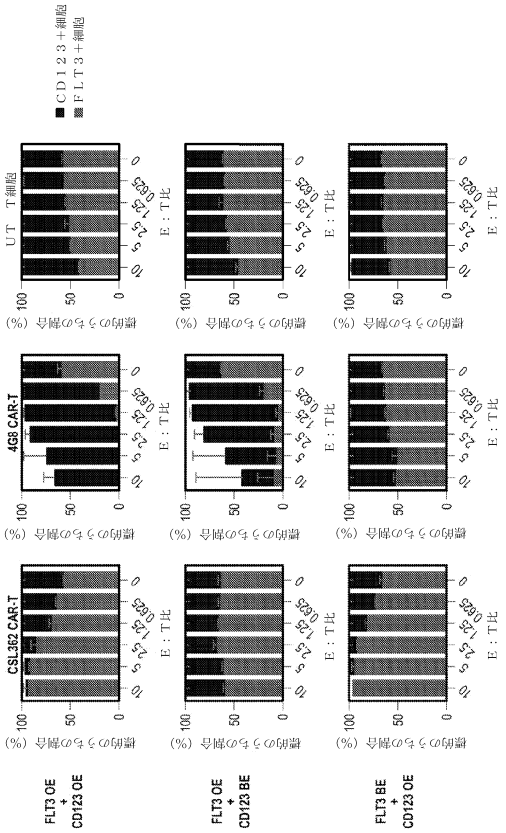
【図４０Ｄ－３】



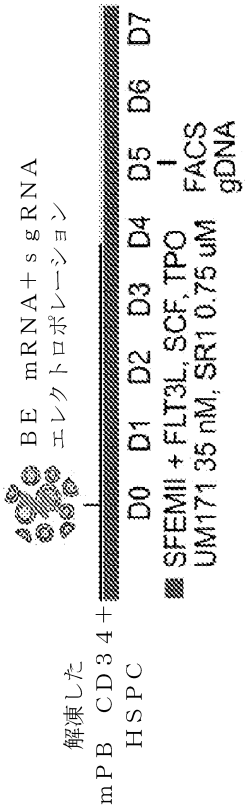
【図４０Ｅ－１】



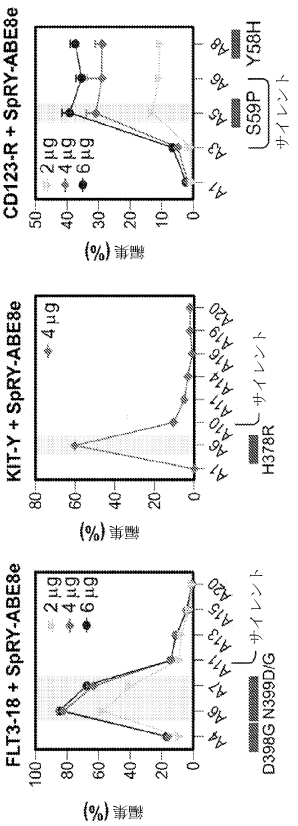
【図４０Ｅ－２】



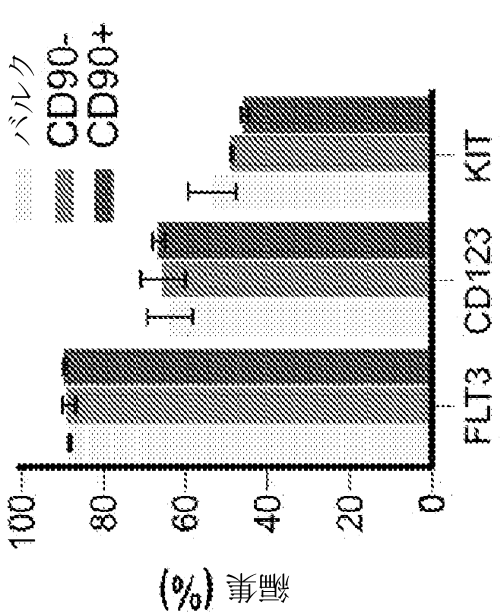
【図４１Ａ】



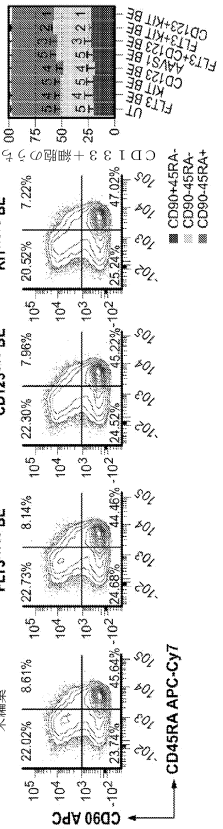
【図４１Ｂ】



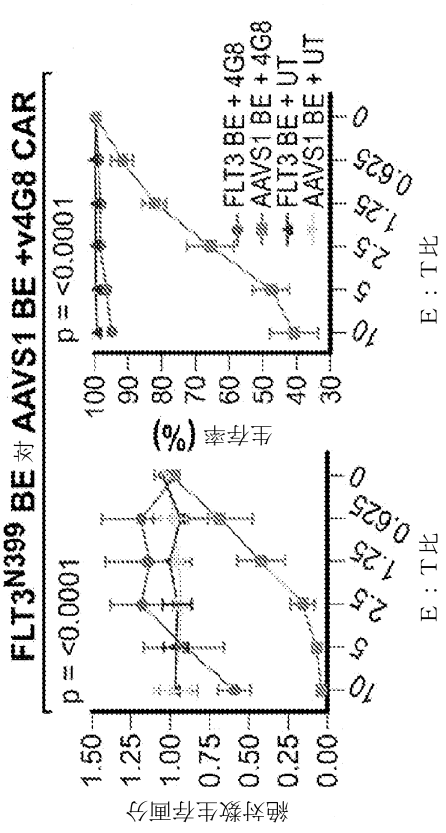
【図４１Ｃ】



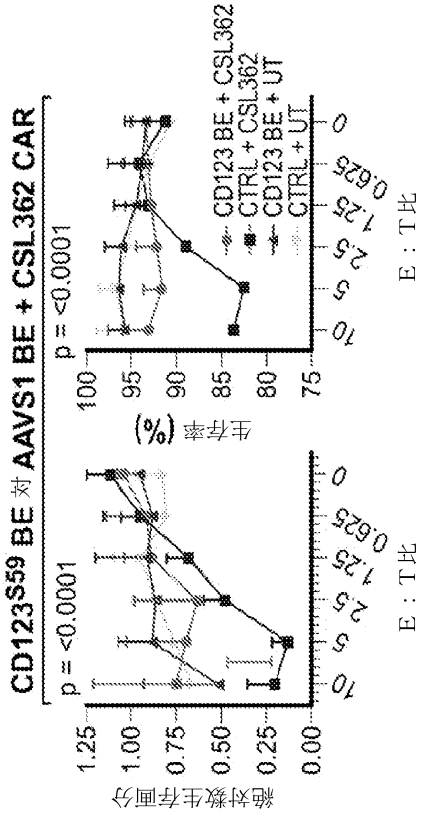
【図４１Ｄ】



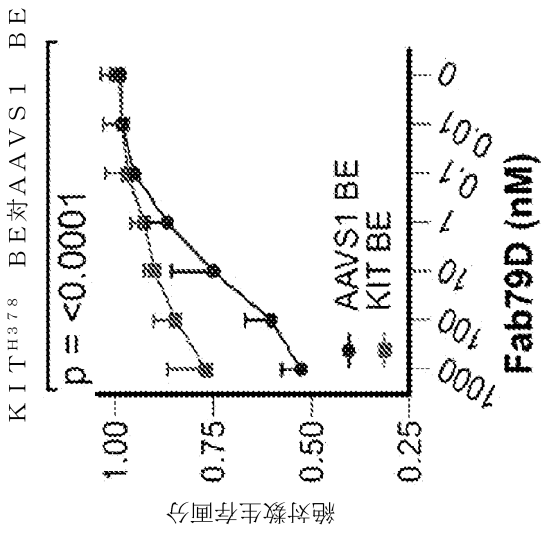
【図４１Ｅ】



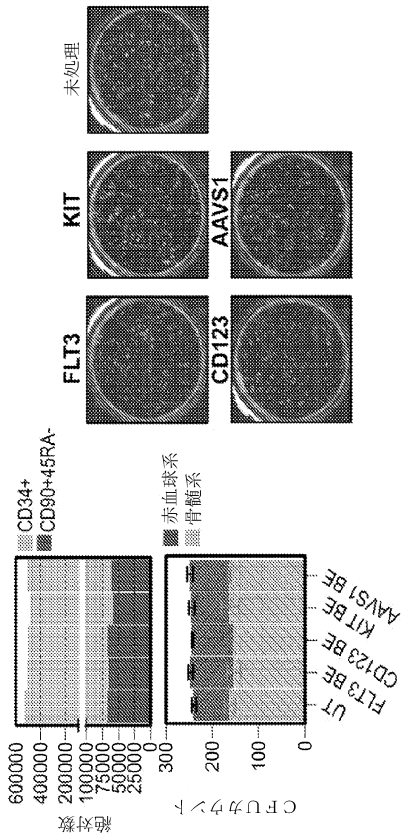
【図４１Ｆ】



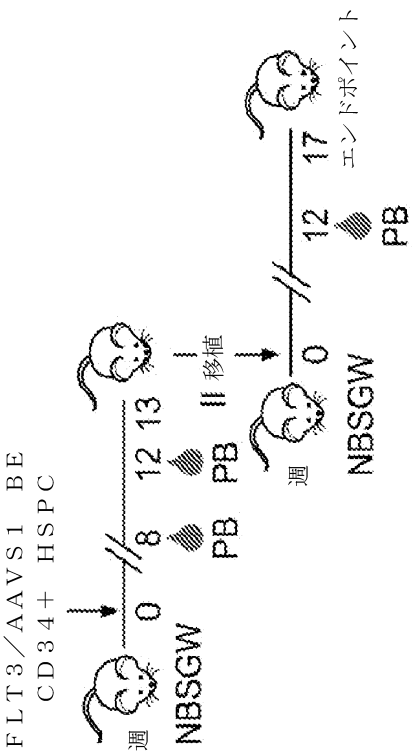
【図４１Ｇ】



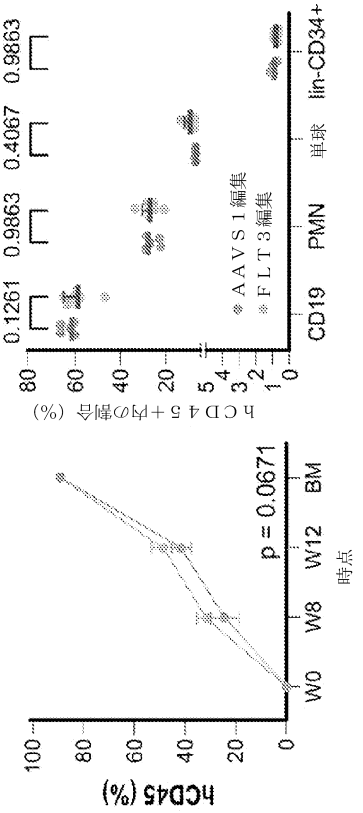
【図４１Ｈ】



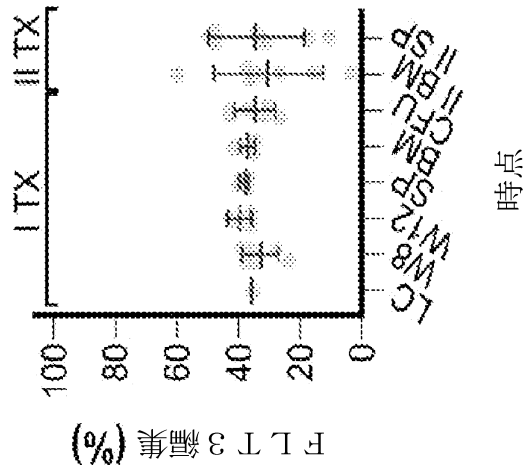
【図４１Ｉ】



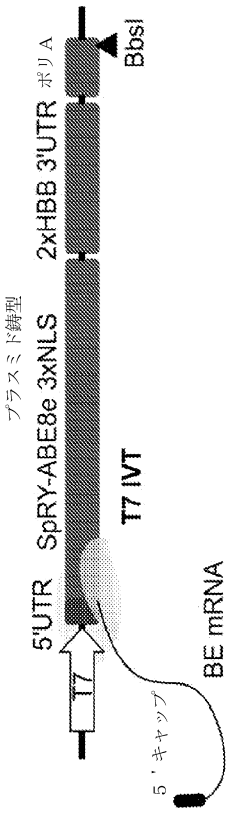
【図４１Ｊ】



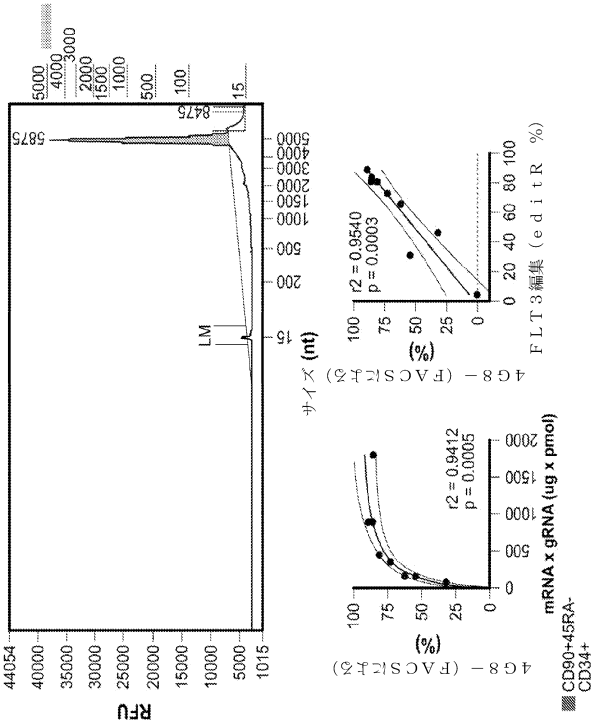
【図４１Ｋ】



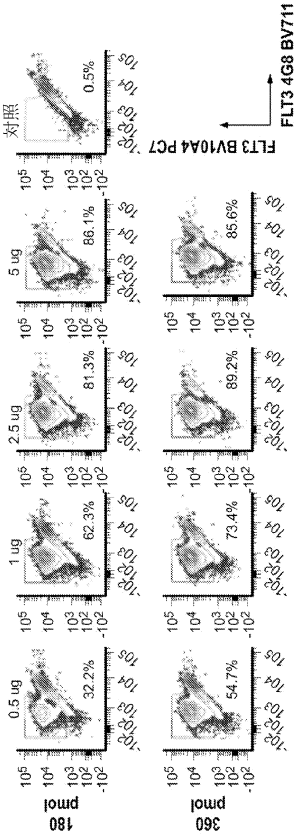
【図４２Ａ】



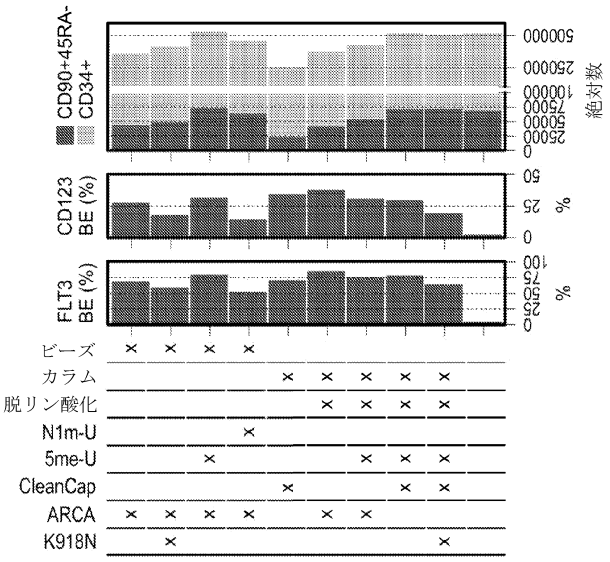
【図４２Ｂ】



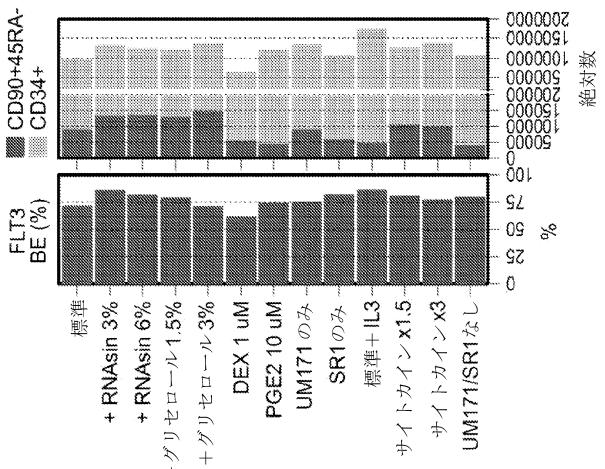
【図４２Ｃ】



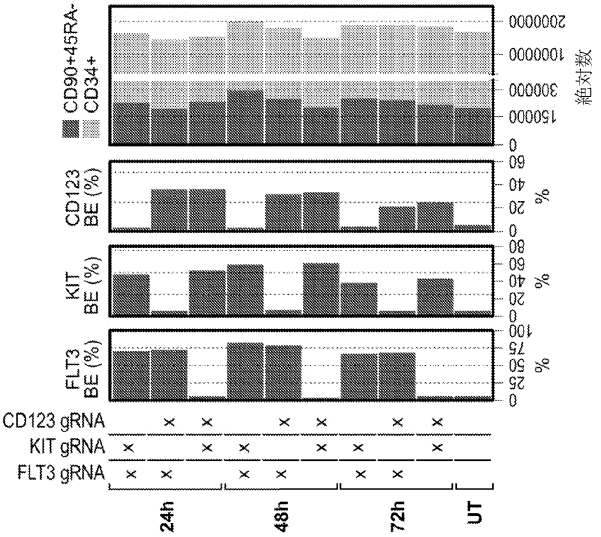
【図４２Ｄ】



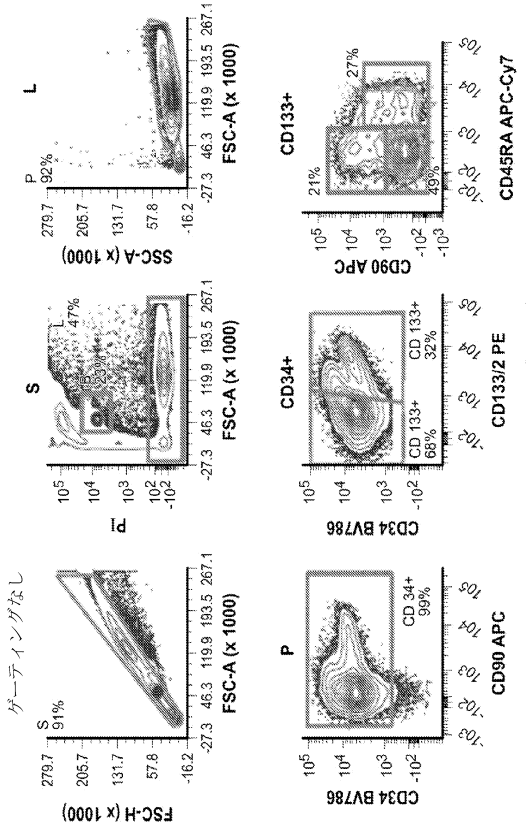
【図４２Ｅ】



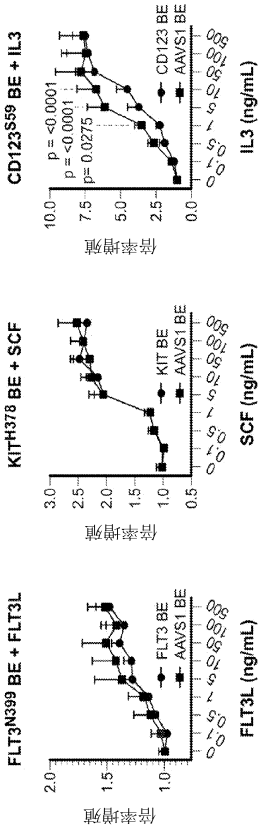
【図４２Ｆ】



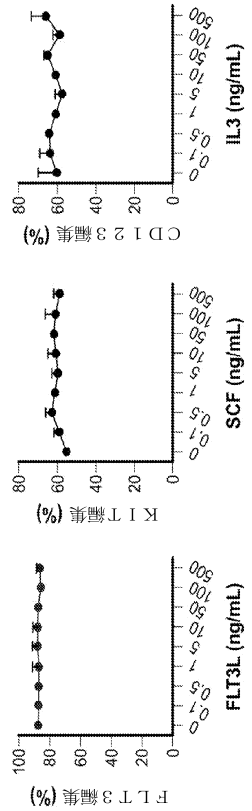
【図４２Ｇ】



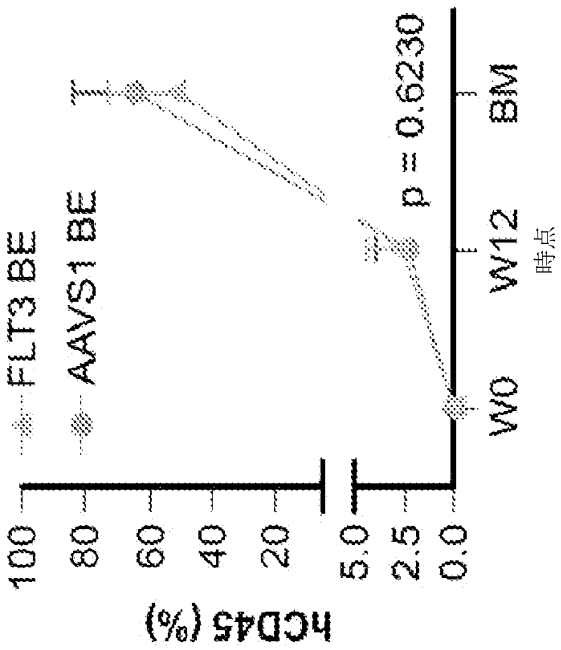
【図４２Ｈ】



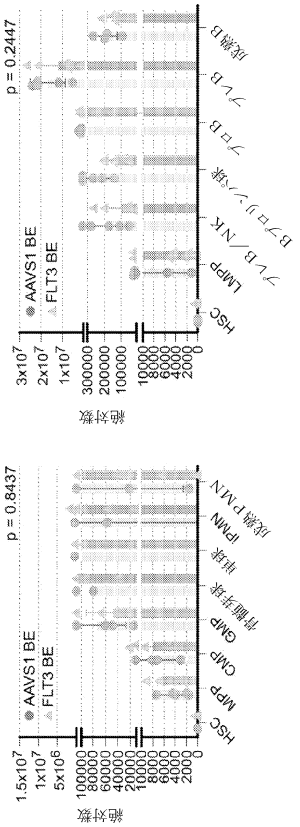
【図４２Ｉ】



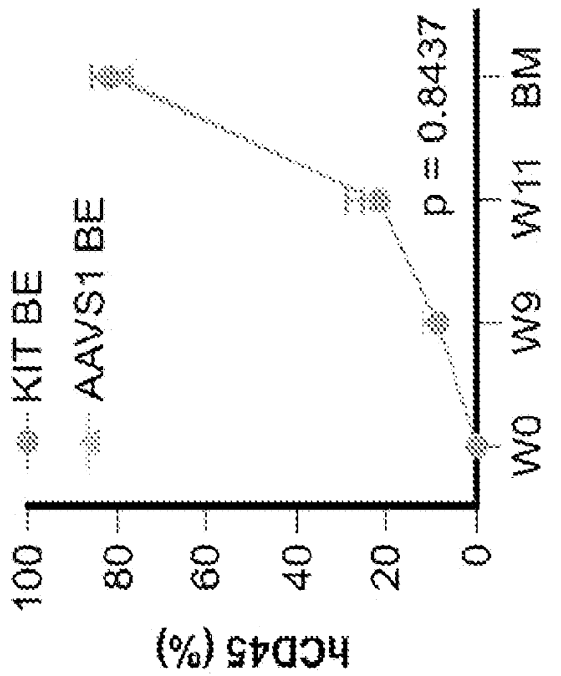
【図４３Ａ】



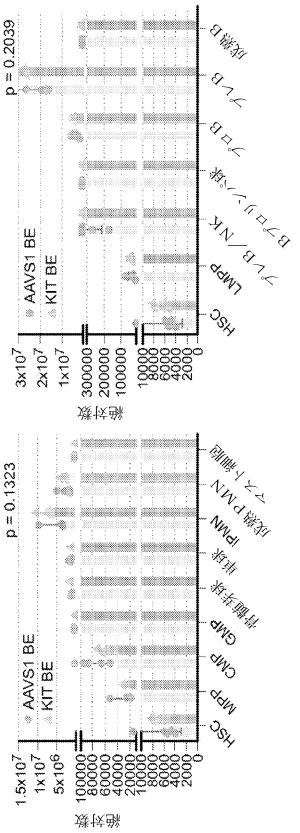
【図４３Ｂ】



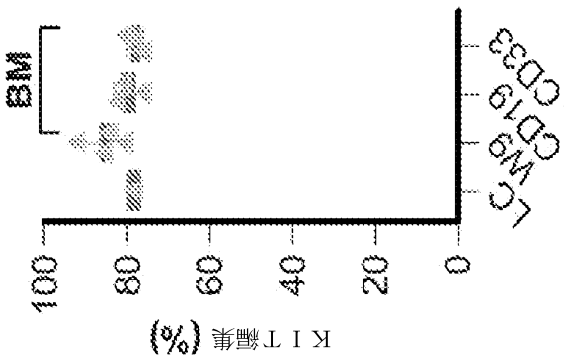
【図４３Ｃ】



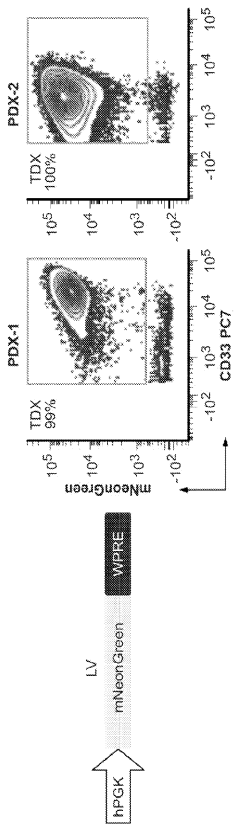
【図４３Ｄ】



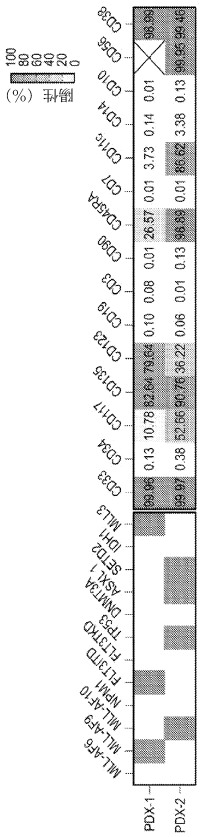
【図４３Ｅ】



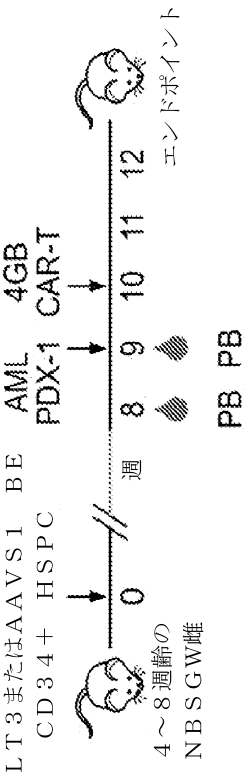
【図４３Ｆ】



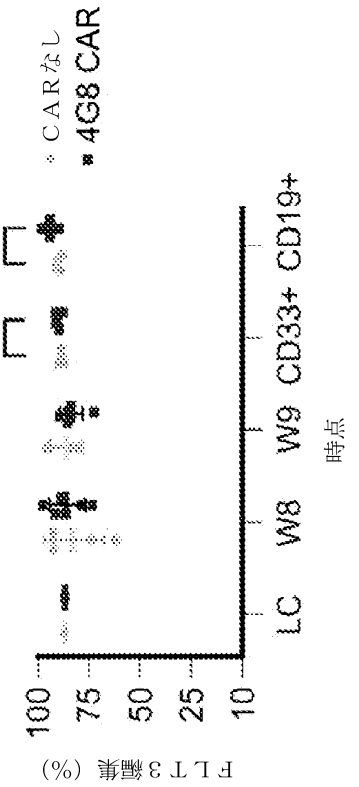
【図４３Ｇ】



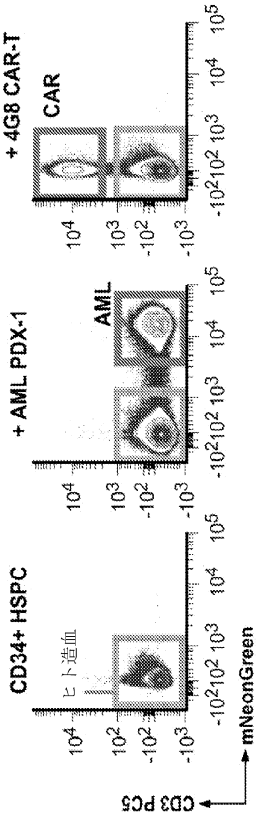
【図４４Ａ】



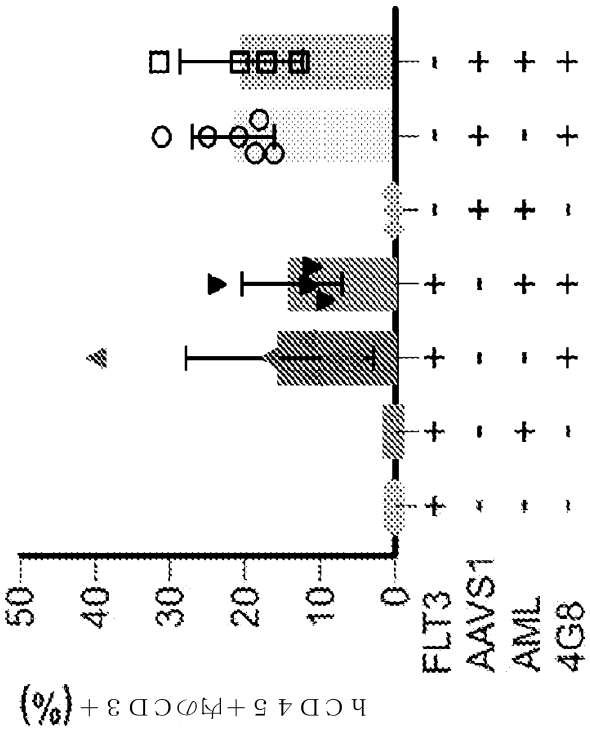
【図４４Ｂ】



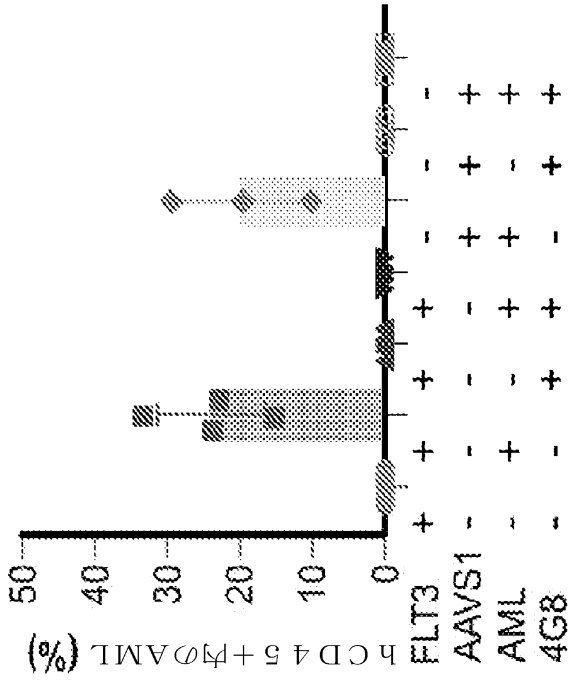
【図４４Ｃ】



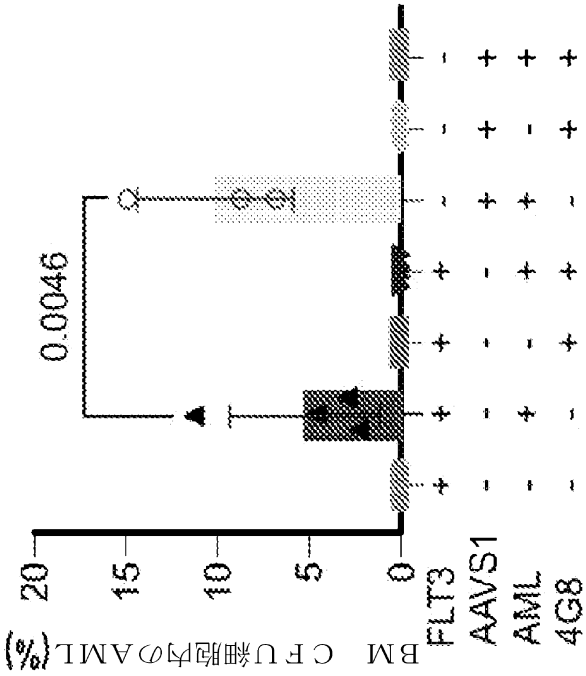
【図４４Ｄ】



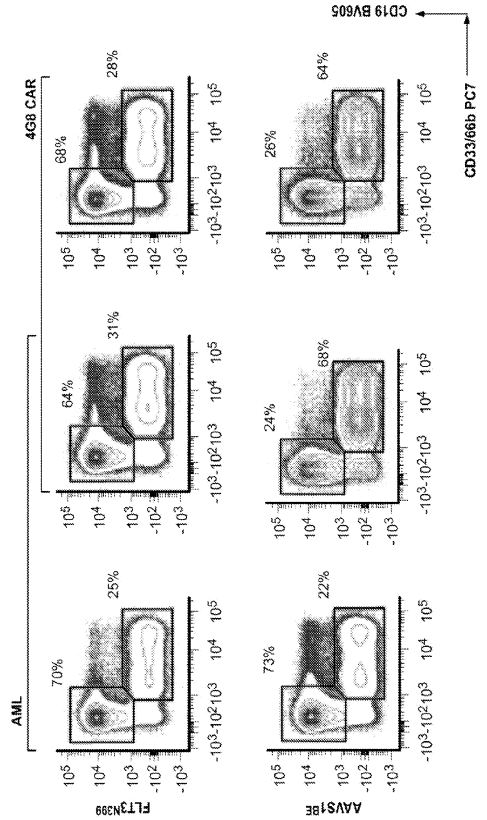
【図４４Ｅ】



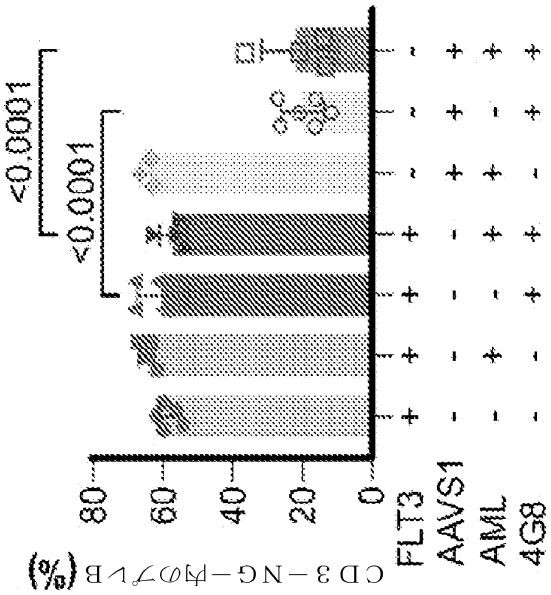
【図４４Ｆ】



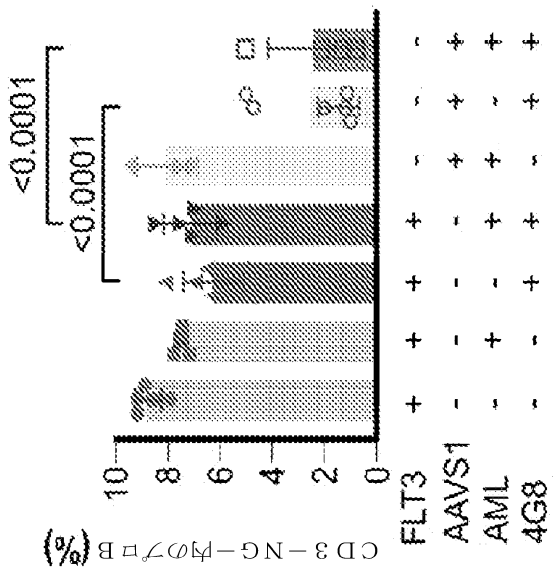
【図４４Ｇ】



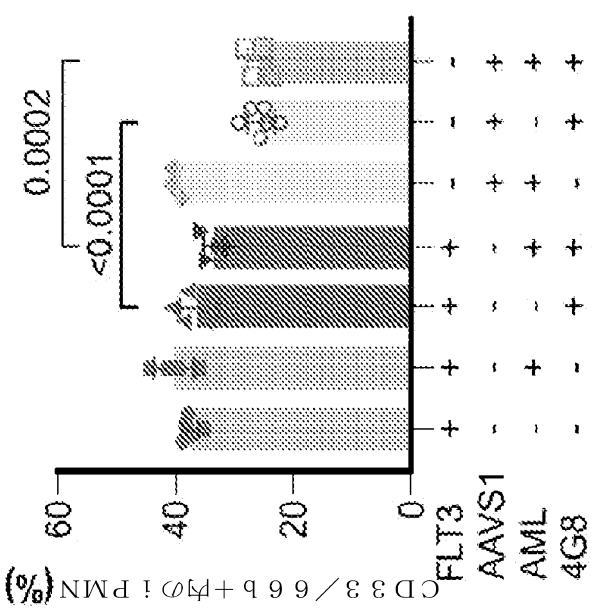
【図４４Ｈ】



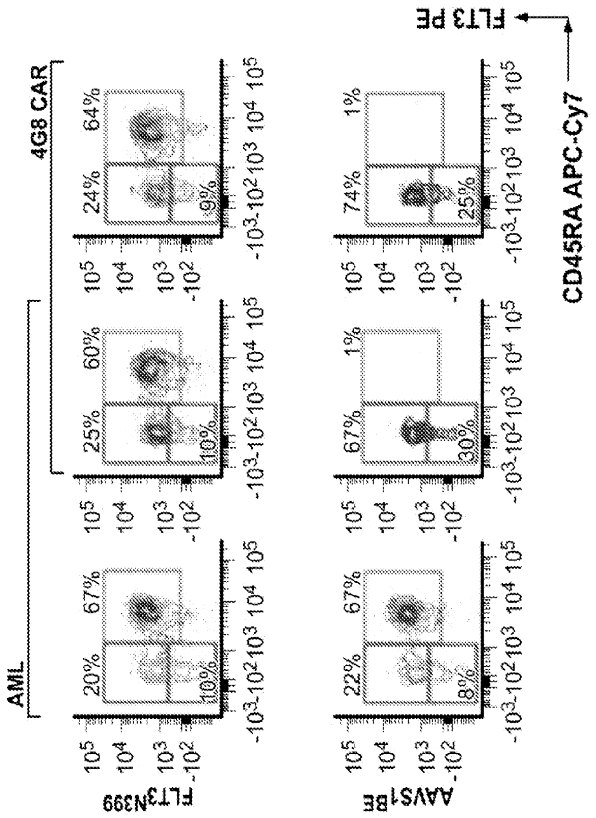
【図４４Ｉ】



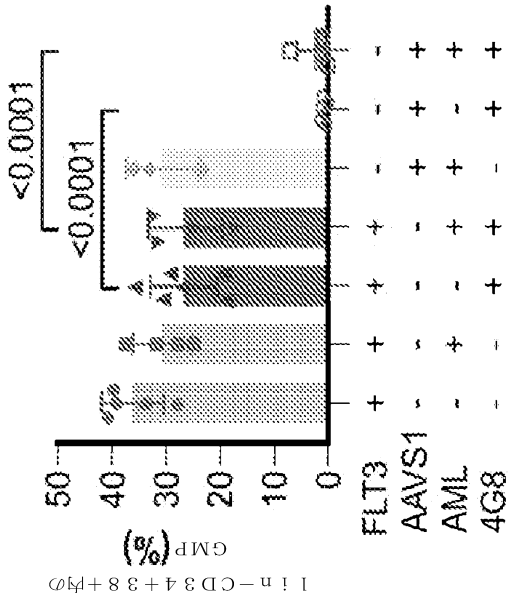
【図４４Ｊ】



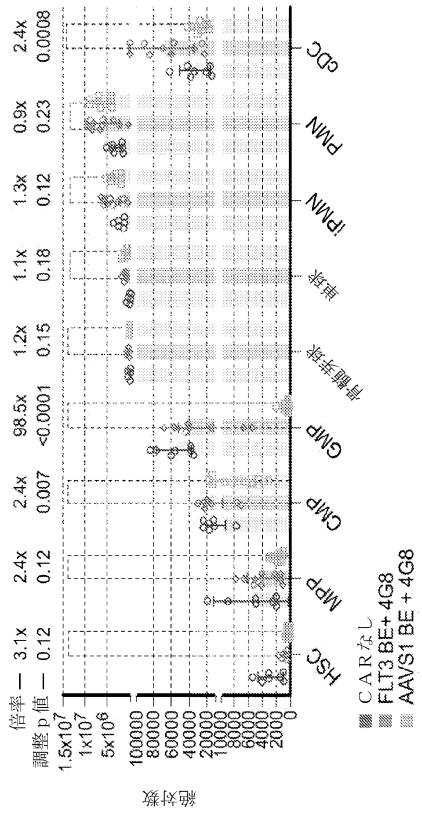
【図４４Ｋ】



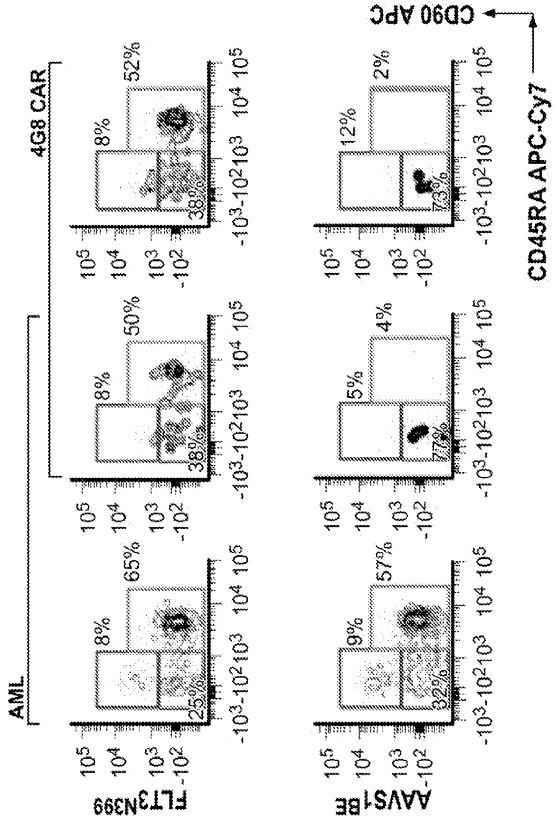
【図４４Ｌ】



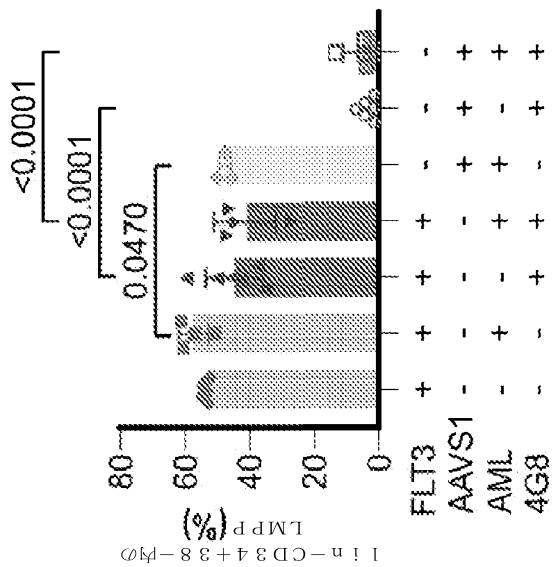
【図４４Ｍ】



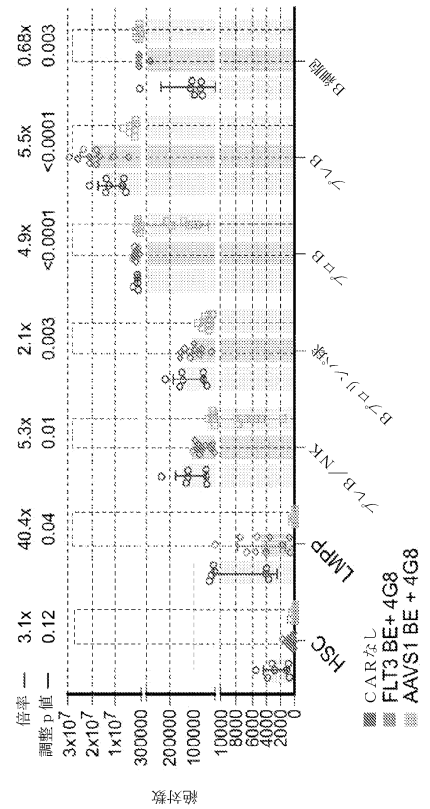
【図４４Ｎ】



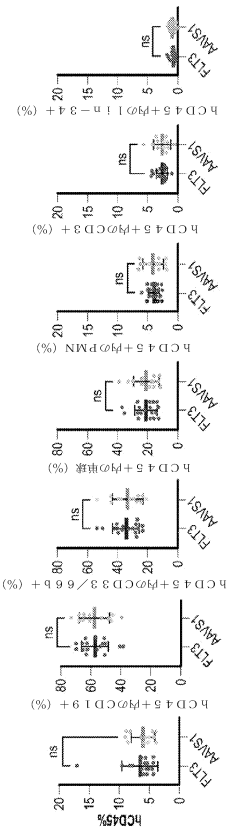
【図４４Ｏ】



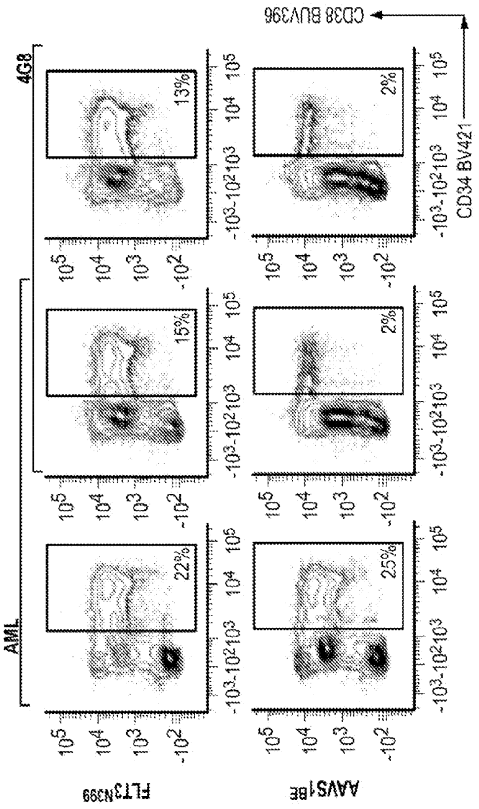
【図４４Ｐ】



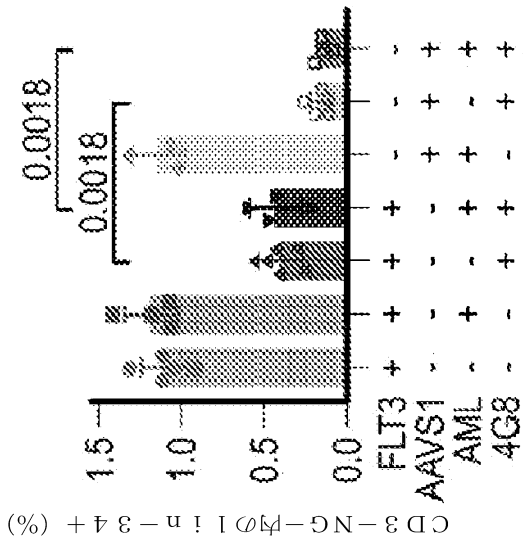
【図４５Ａ】



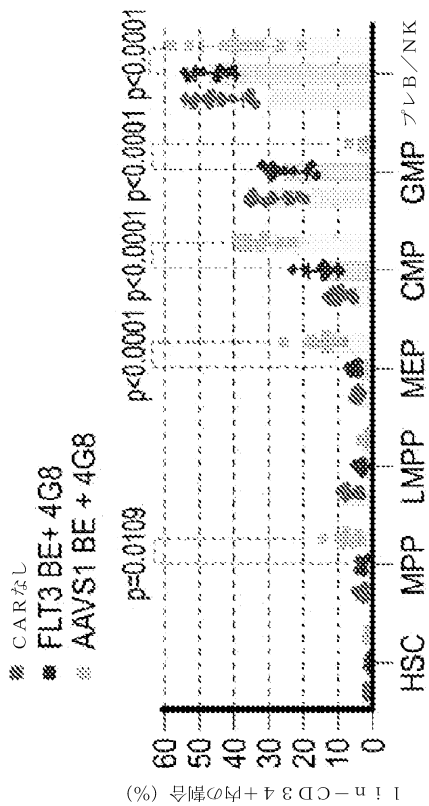
【図４５Ｂ】



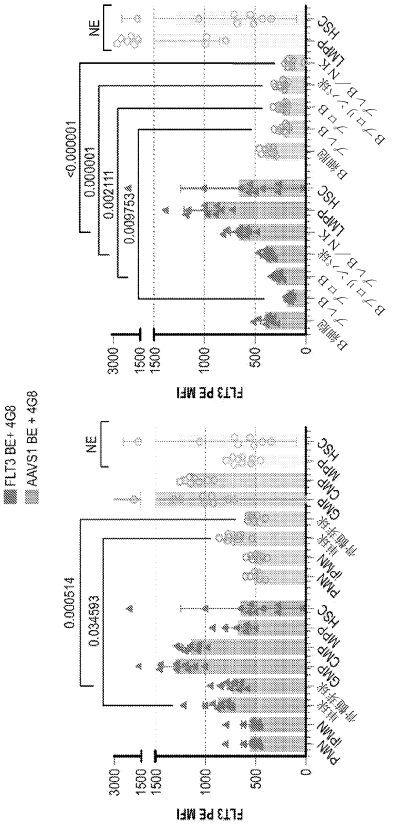
【図４５Ｃ】



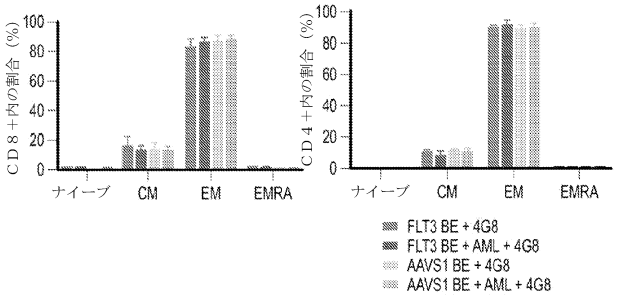
【図４５Ｄ】



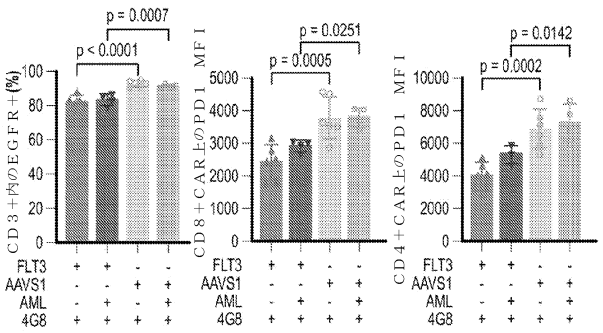
【図４５Ｅ】



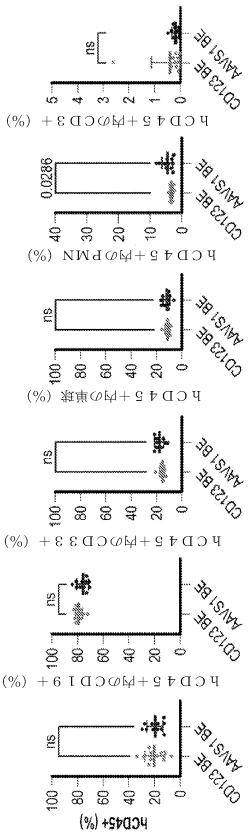
【図４５Ｆ】



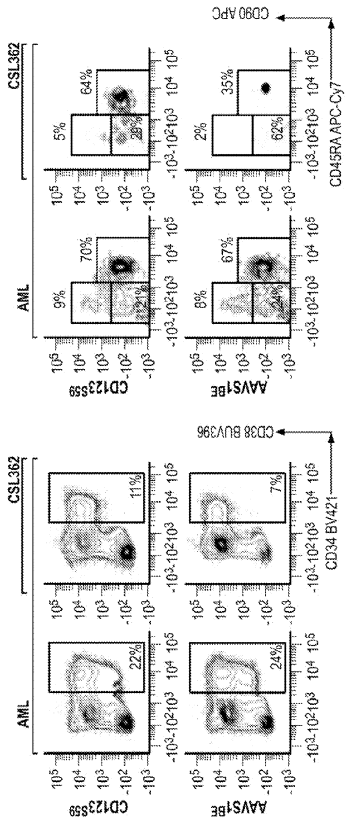
【図４５Ｇ】



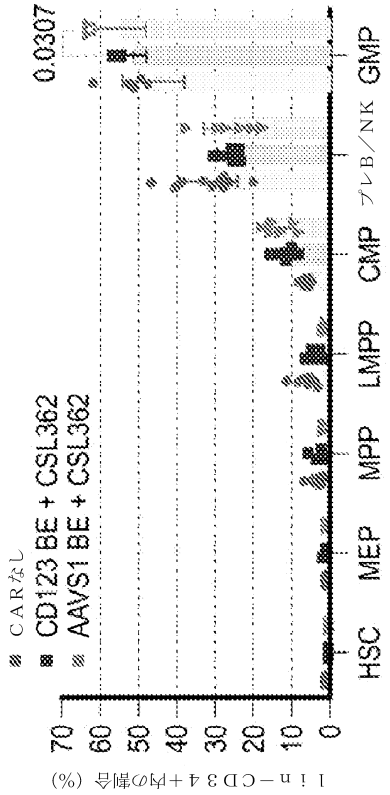
【図４５Ｈ】



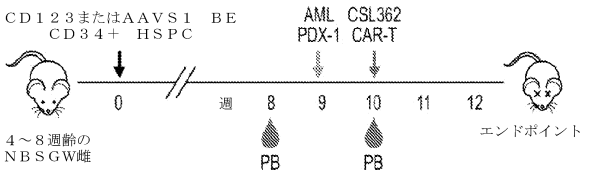
【図４５Ｉ】



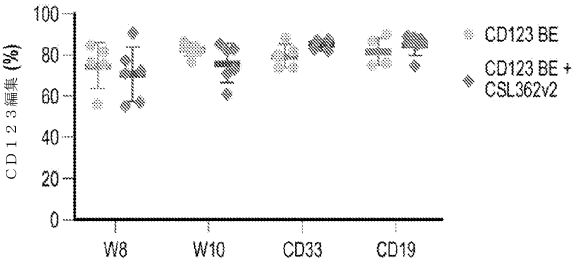
【図４５Ｊ】



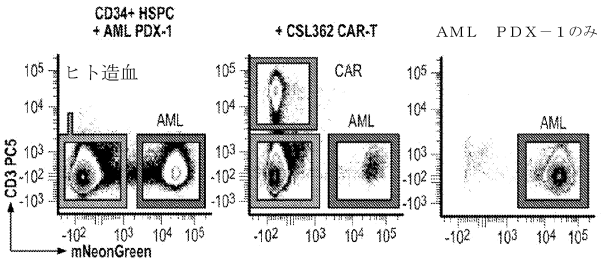
【図４６Ａ】



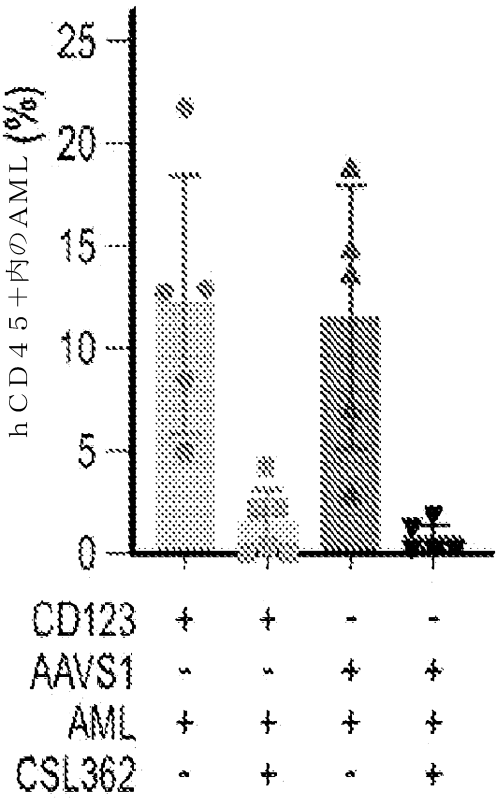
【図４６Ｂ】



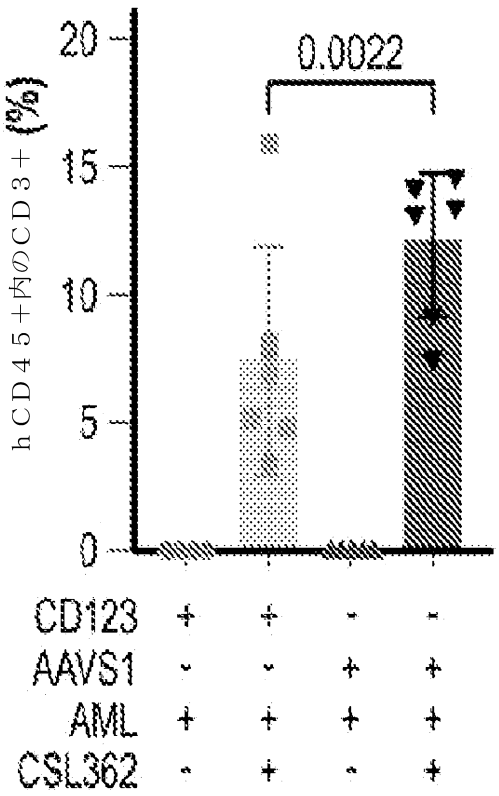
【図４６Ｃ】



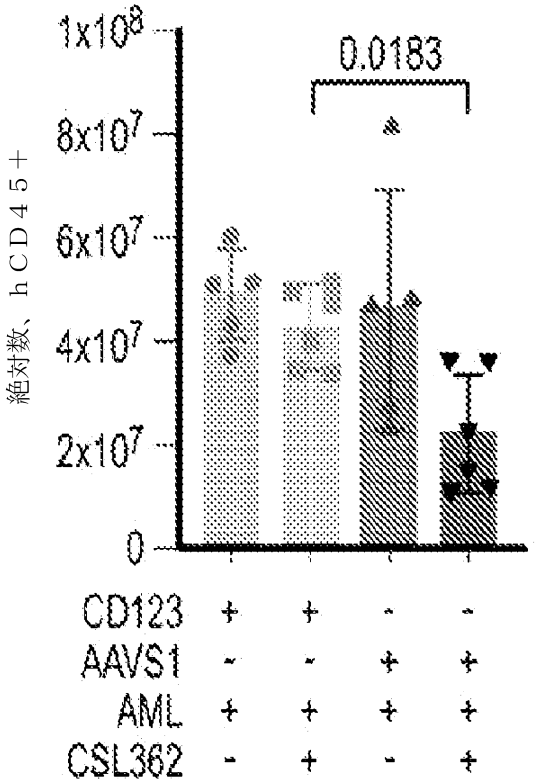
【図４６Ｄ】



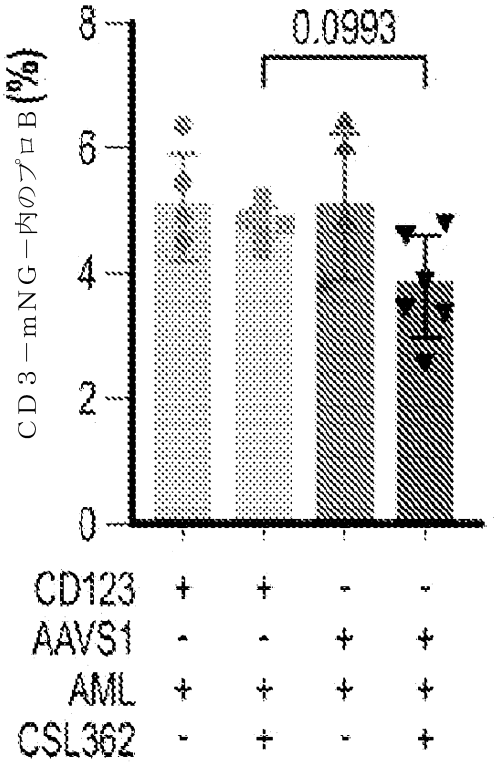
【図４６Ｅ】



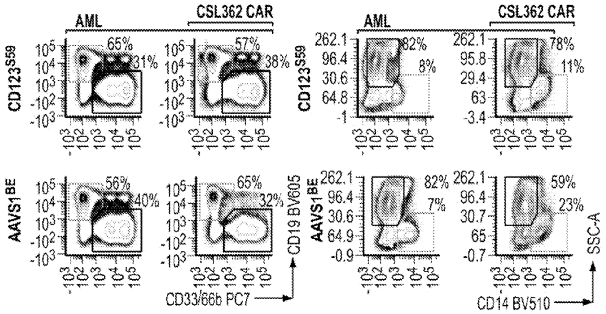
【図４６Ｆ】



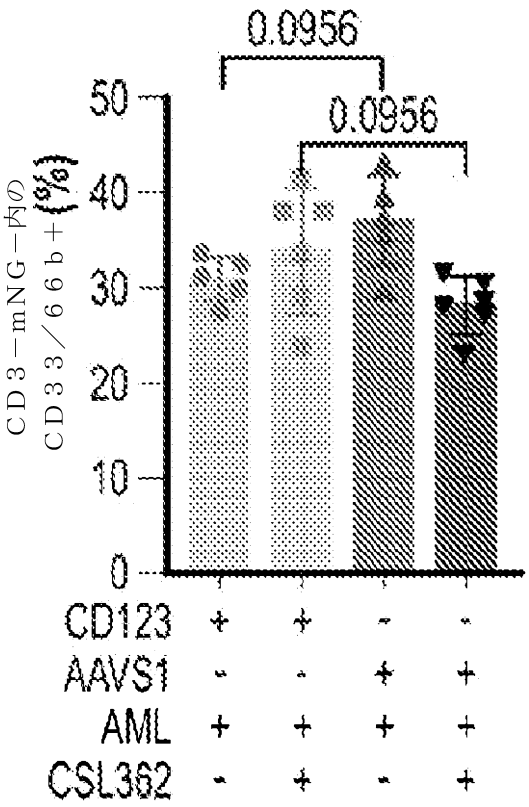
【図４６Ｇ】



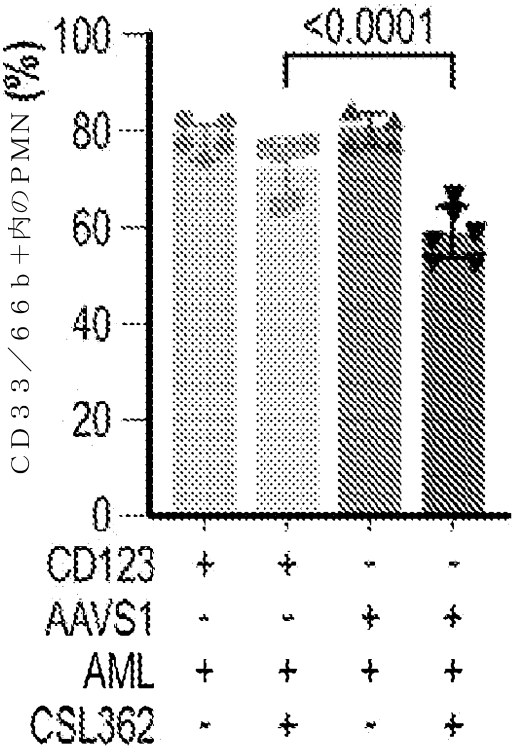
【図４６Ｈ】



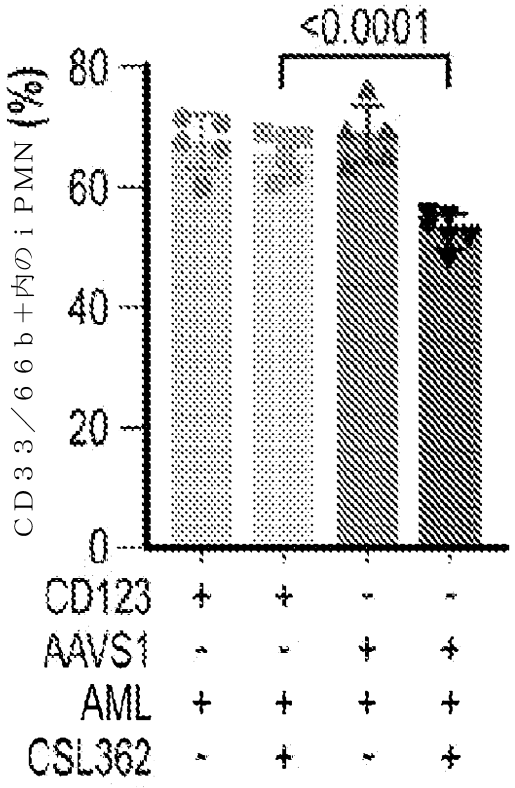
【図４６Ｉ】



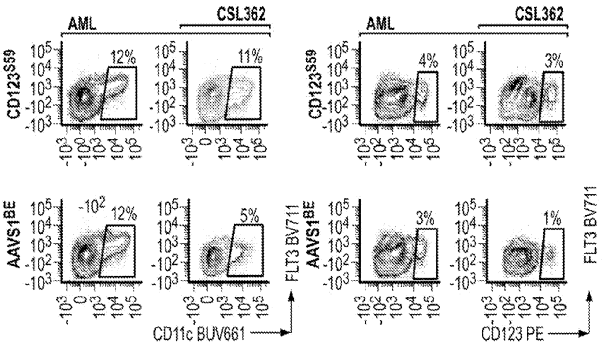
【図４６Ｊ】



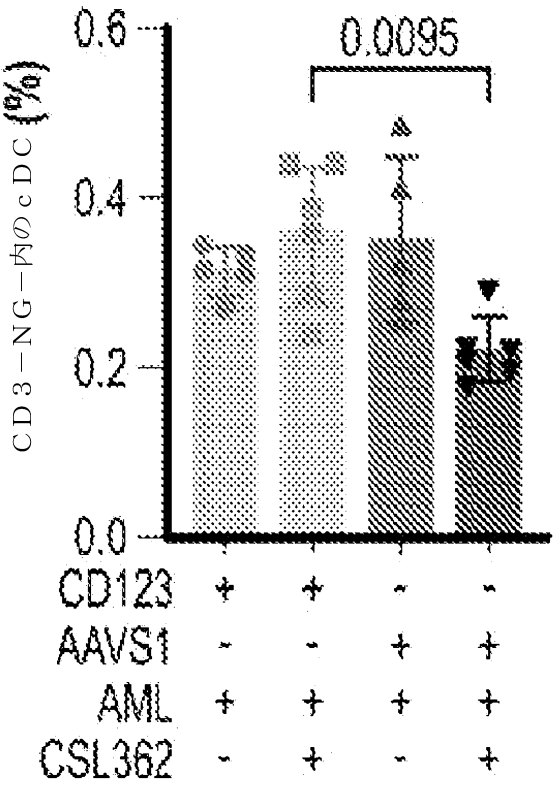
【図４６Ｋ】



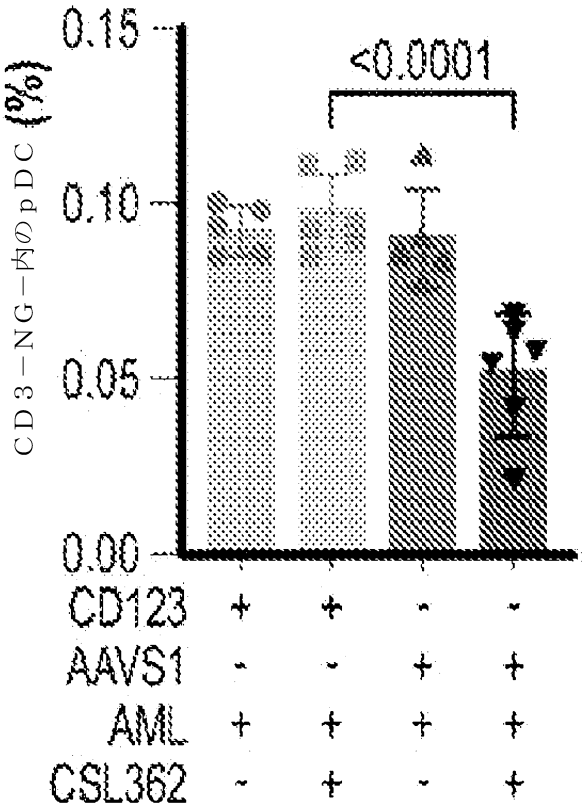
【図４６Ｌ】



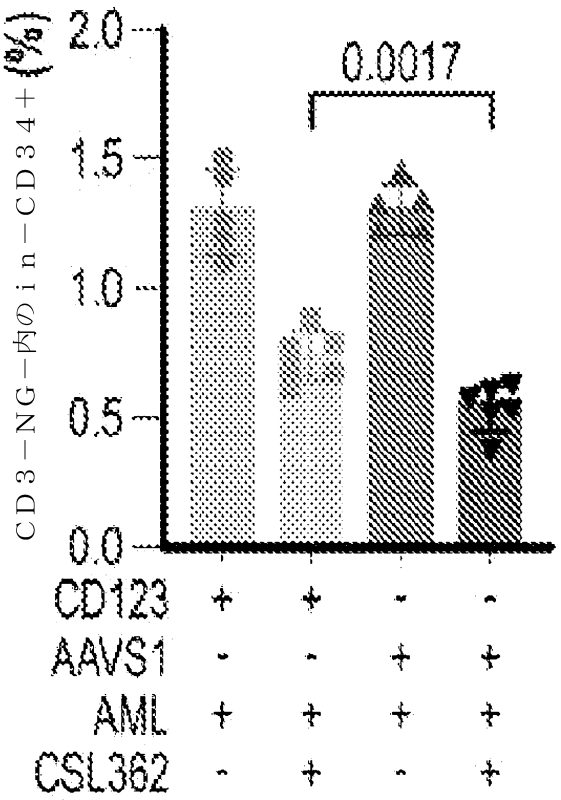
【図４６Ｍ】



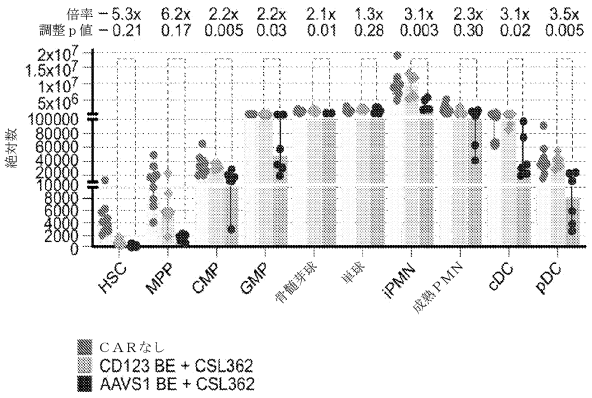
【図４６Ｎ】



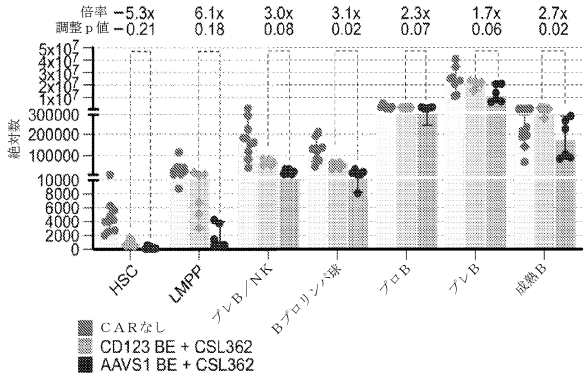
【図４６Ｏ】



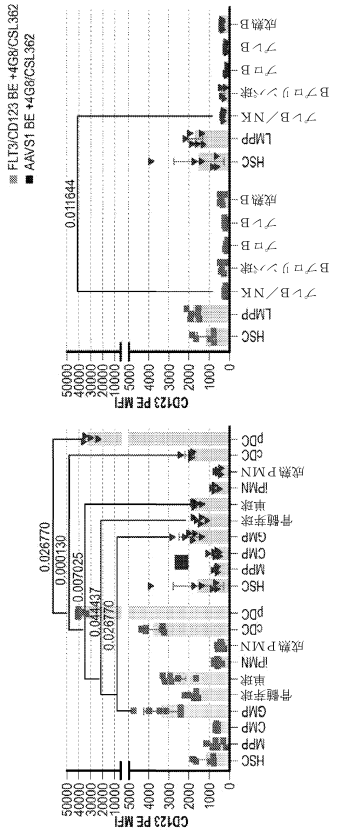
【図４６Ｐ】



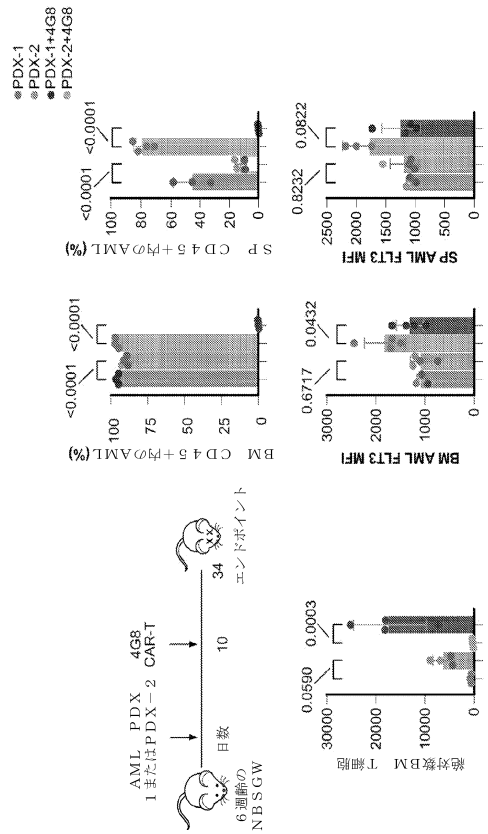
【図４６Ｑ】



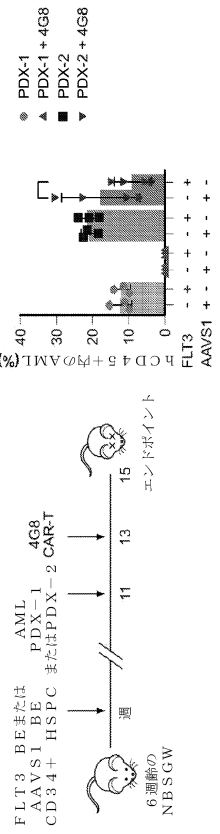
【図４７Ａ】



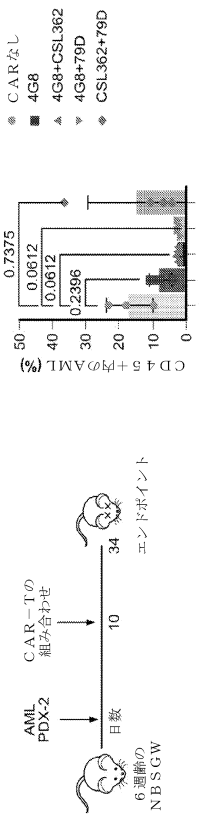
【図４７Ｂ】



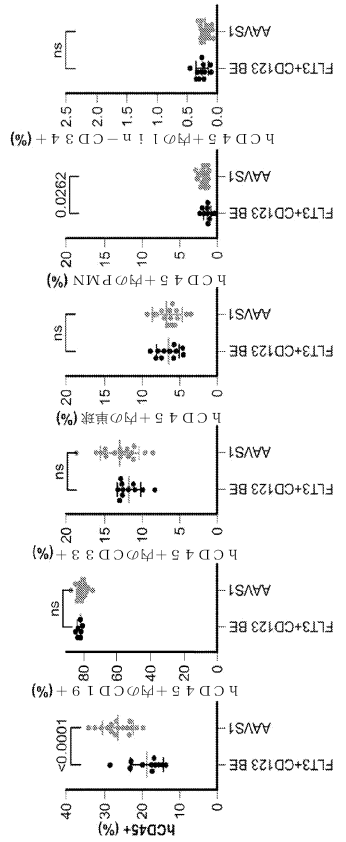
【図４７Ｃ】



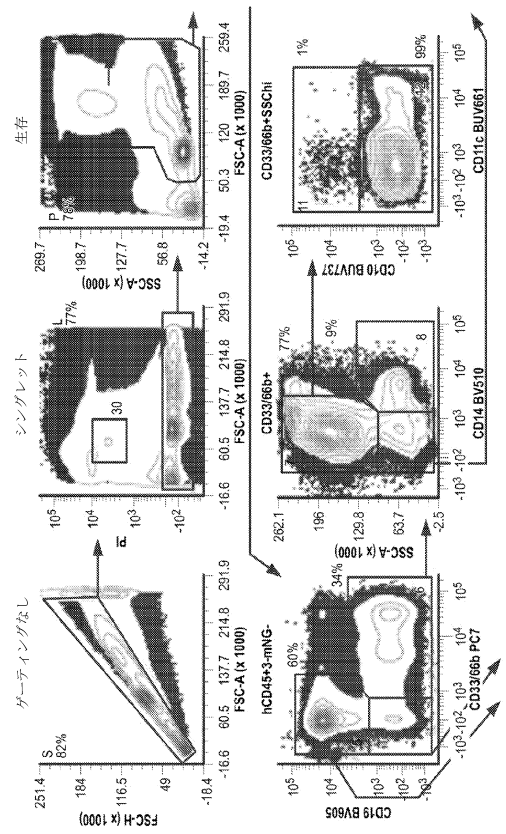
【図４７Ｄ】



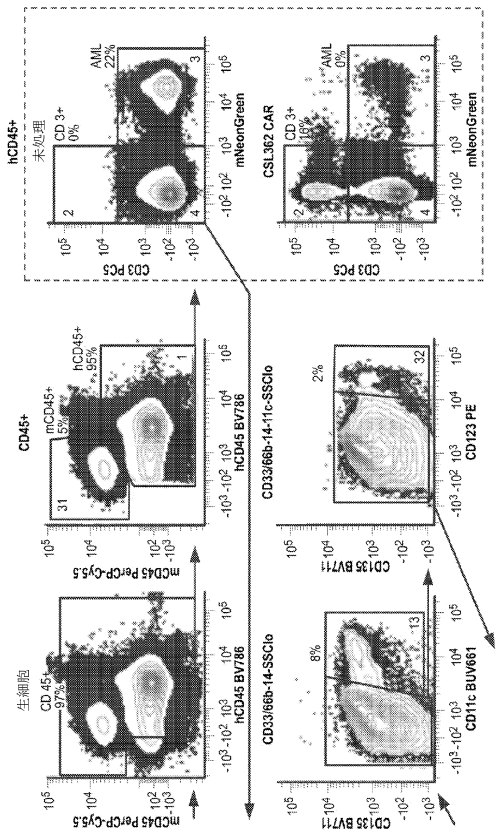
【図４７Ｅ】



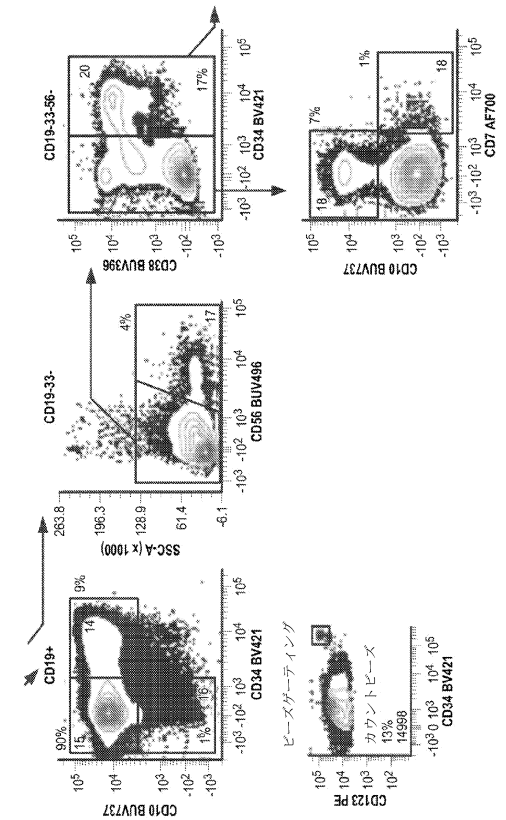
【図４８Ａ－１】



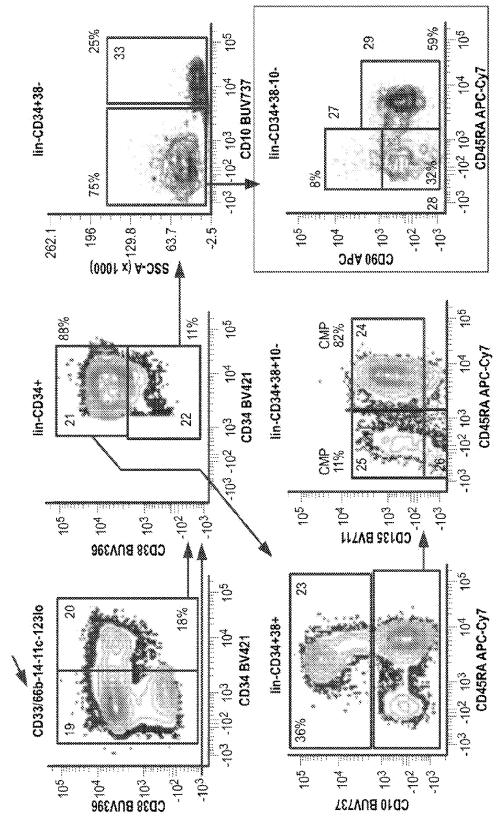
【図４８Ａ－２】



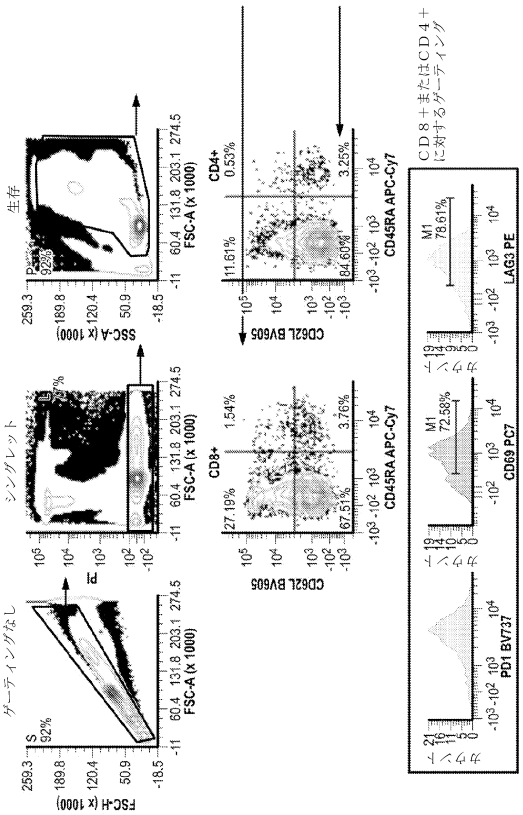
【図４８Ａ－３】



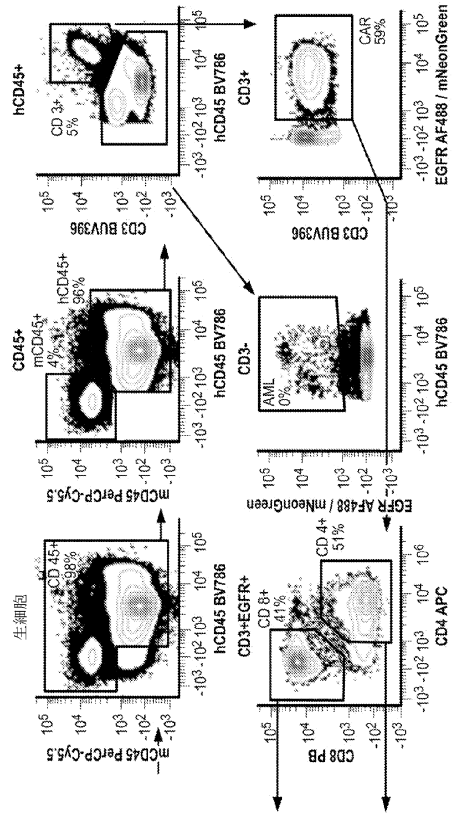
【図４８Ａ－４】



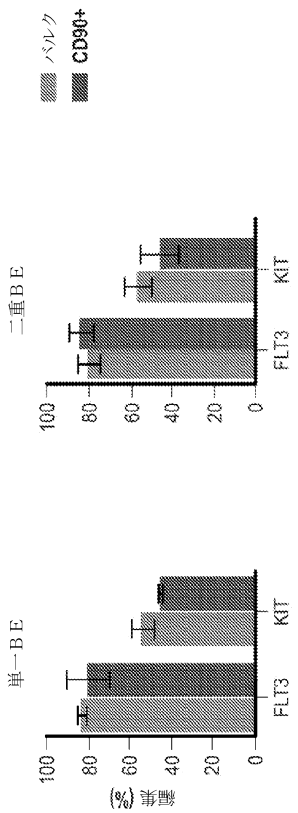
【図４８Ｂ－１】



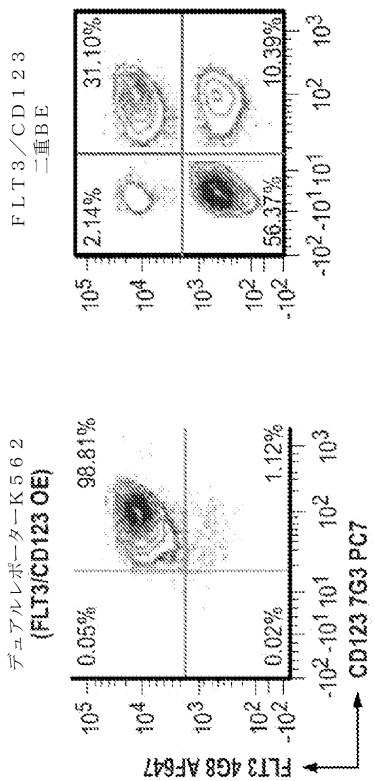
【図４８Ｂ－２】



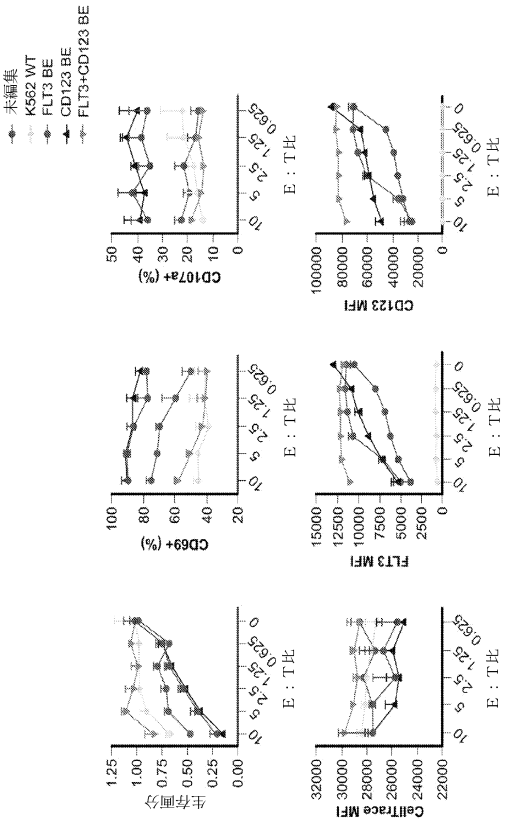
【図４９Ａ】



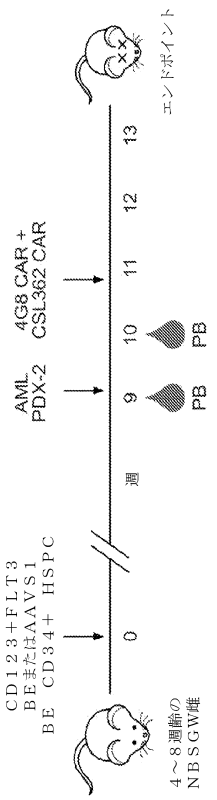
【図４９Ｂ】



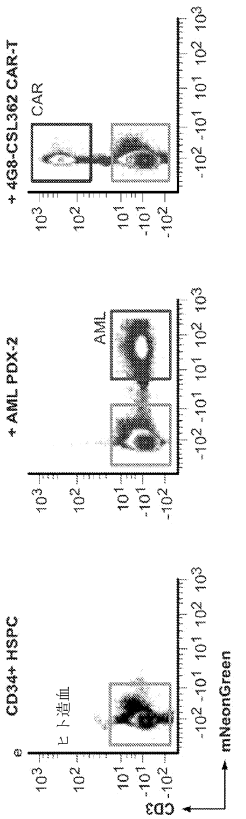
【図４９Ｃ】



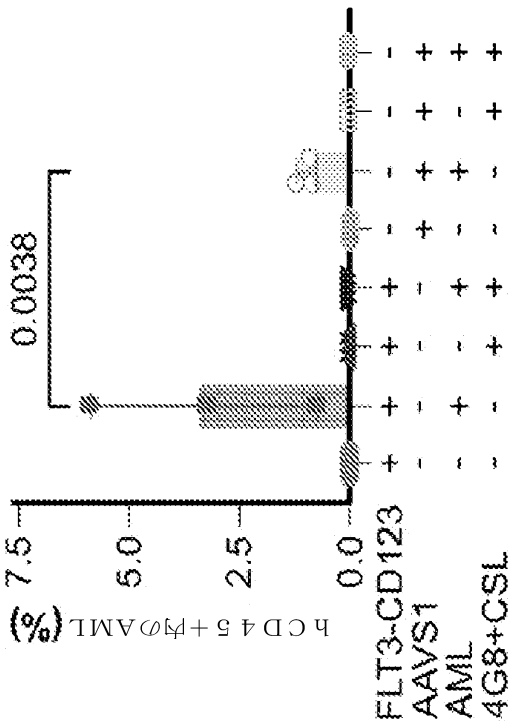
【図４９Ｄ】



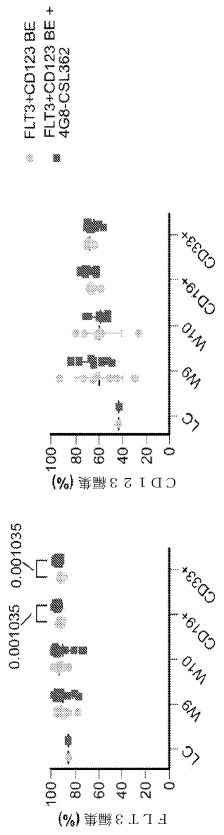
【図４９Ｅ】



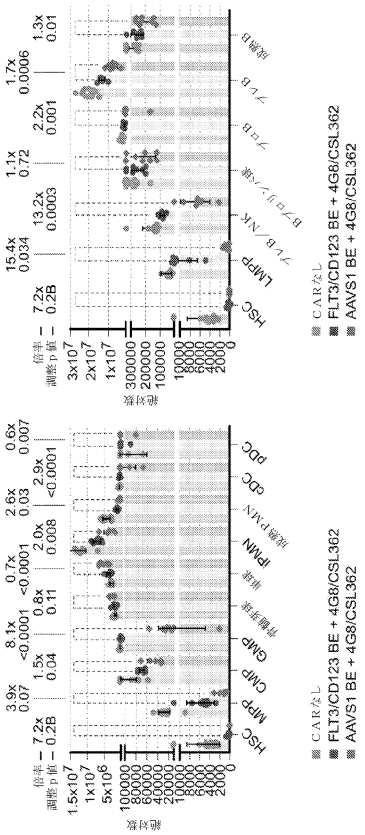
【図４９Ｆ】



【図４９Ｇ】


FLT3+CD123 BE
FLT3+CD123 BE + 4G8-CSL362
CD123陽性 (%)
FLT3陽性 (%)
0.001035
0.001035
LC
W9
W10
CD19+
CD33+

【図４９Ｈ】


絶対数
調整p値
倍率
HSC
LMPP
プレB/NK
B/プロリンパ球
プロB
プレB
成熟B
MPP
CMP
GMP
単球
骨髄球系
IPMN
成熟PMN
eDC
pDC
CAR なし
FLT3/CD123 BE + 4G8/CSL362
AAVS1 BE + 4G8/CSL362

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/705 C07K14/725 C07K14/715 C12N9/22 A61K35/28
A61P35/00 C12N5/0789 C12N9/12 C07K16/28
ADD. A61K35/12
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N A61P A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAYER A ET AL: "Modifying an immunogenic epitope on a therapeutic protein: a step towards an improved system for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 90, no. 12, 25 May 2004 (2004-05-25), pages 2402-2410, XP093060696, London ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/sj.bjc.6601888 abstract page 2402, right-hand column, paragraph 2 page 2403, left-hand column, paragraph 1 figure 3 page 2406, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, line 2 page 2406, right-hand column, paragraph 3 - page 2407, left-hand column, line 5 -/--	1-132, 155-164

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 July 2023	05/10/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Tudor, Mark

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062757

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	page 2410, left-hand column, paragraph 1	
A	CHIRINO A J ET AL: "Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics", DRUG DISCOVERY TODAY: BIOSILICO, ELSEVIER, AVANEL, US, vol. 9, no. 2, 15 January 2004 (2004-01-15), pages 82-90, XP002395255, ISSN: 1741-8364 abstract page 87, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1	1-132, 155-164
A	SALIH HELMUT R ET AL: "Elimination Of Minimal Residual Disease (MRD) In AML Patients With a Novel Fc-Optimized FLT3 Antibody (4G8-SDIEM)", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 122, no. 21, 15 November 2013 (2013-11-15), page 1454, XP086752851, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD.V122.21.1454.1454 [retrieved on 2021-07-07] abstract	1-132, 155-164
A	ERNST DANIEL ET AL: "Humanized anti-CD123 antibody facilitates NK cell antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of Hodgkin lymphoma targets via ARF6/PLD-1", BLOOD CANCER JOURNAL, vol. 9, no. 2, 15 January 2019 (2019-01-15), XP055903478, DOI: 10.1038/s41408-018-0168-2 abstract	1-132, 155-164
A	TERHORST-MOLAWI DOROTHEA ET AL: "The Anti-KIT Antibody, CDX-0159, Reduces Mast Cell Numbers and Circulating Tryptase and Improves Disease Control in Patients with Chronic Inducible Urticaria (Cindu)", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 149, no. 2, 1 February 2022 (2022-02-01), XP086946980, ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/J.JACI.2021.12.587 [retrieved on 2022-02-01] abstract	1-132, 155-164

-/--

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062757

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GILL SAAR ET AL: "Anti-CD123 Chimeric Antigen Receptor T Cells (CART-123) Provide A Novel Myeloablative Conditioning Regimen That Eradicates Human Acute Myeloid Leukemia In Preclinical Models", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 122, no. 21, 15 November 2013 (2013-11-15), pages 143-145, XP086753620, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD.V122.21.143.143 [retrieved on 2021-07-07] abstract page 143 - page 145	1-132, 155-164
X	DATABASE NCBI [Online] NIH, BETHESDA, MA, USA; 28 February 2018 (2018-02-28), "receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3 isoform X1 (Pongo abelii)", XP002809718, retrieved from NIH accession no. XP_024086677 Database accession no. XP_024086677 abstract	155
A	DATABASE USPTO Proteins [Online] 15 February 2019 (2019-02-15), "Sequence 1 from patent US 10160755.", XP002809719, retrieved from EBI accession no. USPOP:QBC90169 Database accession no. QBC90169 abstract & US 10 160 755 B2 (PLEXXIKON INC [US]) 25 December 2018 (2018-12-25) sequence 1	156
X,P	DATABASE Geneseq [Online] 23 March 2023 (2023-03-23), "Human mutant (S59F) CD123 protein.", XP002809722, retrieved from EBI accession no. GSP:BML93483 Database accession no. BML93483 abstract	159

-/--

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062757

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	-& DATABASE Geneseq [Online] 23 March 2023 (2023-03-23), "Human mutant (S59P) CD123 protein.", XP002809720, retrieved from EBI accession no. GSP:BML93478 Database accession no. BML93478 abstract & WO 2023/012367 A1 (UNIV BASEL [CH]; CIMEIO THERAPEUTICS AG [CH]) 9 February 2023 (2023-02-09) figure 1	157
A	DATABASE USPTO Proteins [Online] 12 August 2020 (2020-08-12), "Sequence 187 from patent US 10662248.", XP002809721, retrieved from EBI accession no. USPOP:QNC46534 Database accession no. QNC46534 abstract & US 10 662 248 B2 (SUBDOMAIN LLC [US]; ARCELLX INC [US]) 26 May 2020 (2020-05-26) sequence 187	157,158, 160,161
X	DATABASE NCBI [Online] NIH, BETHESDA, MA, USA; 25 September 2019 (2019-09-25), "Interleukin-3 receptor subunit alpha isoform X2 (Rhinopithecus roxellana)", XP002809723, retrieved from NIH accession no. XP_010362785 Database accession no. XP_010362785 abstract	159
A	DATABASE USPTO Proteins [Online] 13 August 2010 (2010-08-13), "Sequence 1 from patent US 7727731.", XP002809724, retrieved from EBI accession no. USPOP:ADM02943 Database accession no. ADM02943 abstract & US 7 727 731 B2 (AB SCIENCE [FR]) 1 June 2010 (2010-06-01) sequence 1	162,163

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/062757

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 13*ter*.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.

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/062757

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-132, 155-164

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/US2023/062757

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-132, 155-164

A genetically engineered hematopoietic stem cell (HSPC), comprising a genetically engineered FLT3 gene, CD123 gene, or KIT gene, wherein said genetically engineered FLT3 gene, CD123 gene, or KIT gene is engineered such that its encoded protein has reduced binding to a therapeutic anti-FLT3 antibody, anti-CD123 antibody, or anti-KIT antibody, respectively; and subject-matter related thereto.

---

2. claims: 133-154

A chimeric antigen receptor (CAR) comprising a polypeptide comprising: (a) one or more epitope binding fragments that bind to an epitope of FLT3, CD123, or KIT, (b) a hinge domain, (c) a transmembrane domain, (d) a co-stimulatory domain, and (e) a cytoplasmic signaling domain; and subject-matter related thereto.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	FI			テーマコード（参考）
C12N 5/0781(2010.01)	C12N	5/0781		
C12N 5/0784(2010.01)	C12N	5/0784		
C12N 5/0786(2010.01)	C12N	5/0786		
C12N 5/0787(2010.01)	C12N	5/0787		
C12N 15/11 (2006.01)	C12N	15/11	Z	
C07K 16/28 (2006.01)	C07K	16/28		
C07K 14/705(2006.01)	C07K	14/705		
C12P 21/02 (2006.01)	C12P	21/02	C	
A61P 35/00 (2006.01)	C12P	21/02	A	
A61P 7/00 (2006.01)	A61P	35/00		
A61K 35/28 (2015.01)	A61P	7/00		
A61P 43/00 (2006.01)	A61K	35/28		
A61K 39/395(2006.01)	A61P	43/00	121	
A61K 35/17 (2025.01)	A61K	39/395	N	
A61P 35/02 (2006.01)	A61K	39/395	T	
A61K 35/14 (2015.01)	A61K	39/395	U	
A61K 35/51 (2015.01)	A61K	39/395	D	
	A61K	39/395	E	
	A61K	35/17		
	A61P	35/02		
	A61K	35/14		
	A61K	35/51		

,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,ME,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,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

弁理士　大森 規雄

(74)代理人　100103182

弁理士　日野 真美

(72)発明者　ジェノヴェーゼ，ピエトロ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２２１５， ボストン，ブルックライン アベニュー ４５０

(72)発明者　カシラティ，ガブリエレ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２２１５， ボストン，ブルックライン アベニュー ４５０

Ｆターム（参考）　4B064 AG20 CA01 CA19 CC24 DA01
4B065 AA93X AA93Y AA94X AB01 BA02 CA44
4C085 AA13 AA14 BB31 CC22 CC23 EE03
4C087 AA01 AA02 BB34 BB37 BB44 BB59 BB65 MA02 NA05 ZA51
ZB26 ZB27 ZC75
4H045 AA10 AA20 BA09 BA54 DA50 EA54 FA74