

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-506751
(P2024-506751A)

(43)公表日 令和6年2月14日(2024.2.14)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55		Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全176頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-570335(P2023-570335)			(71)出願人	523292131
(86)(22)出願日	令和4年2月1日(2022.2.1)				イプシレン バイオ エス. アール. エル.
(85)翻訳文提出日	令和5年9月27日(2023.9.27)				イタリア国 2 0 1 2 3 ミラノ, 8, ヴ
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/052372				ィア ヴィンセンツォ ジョベルティ
(87)国際公開番号	WO2022/162247			(74)代理人	110002572
(87)国際公開日	令和4年8月4日(2022.8.4)				弁理士法人平木国際特許事務所
(31)優先権主張番号	21154639.5			(72)発明者	ロンバルド, アンジェロ レオーネ
(32)優先日	令和3年2月1日(2021.2.1)				イタリア国 2 0 1 2 3 ミラノ, 8, ヴ
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)				ィア ヴィンセンツォ ジョベルティ, イ
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く			(72)発明者	レシグナ, アリス
					イタリア国 2 0 1 2 3 ミラノ, 8, ヴ
					ィア ヴィンセンツォ ジョベルティ, イ
				(72)発明者	イプシレン バイオ エス. アール. エル.
					バッセガ, タニア 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子サイレンシング

(57)【要約】

(b)エンドヌクレアーゼに作動可能に連結された(a)少なくとも1つの後成的エフェクタードメインを含む操作された転写モジュレーター(ETM)。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内の1つ以上の遺伝子の転写、発現、及び/又は活性を改変するための組合せであって、

(A)触媒的に活性なCRISPR/Casエンドヌクレアーゼドメインをそれぞれ含む1つ以上の融合タンパク質であって、転写リプレッサードメイン及びDNMT3Lドメインを集合的に含む、融合タンパク質、又は1つ以上の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(B)細胞内の第1の遺伝子のエピジェネティックな編集を可能にし、遺伝子編集を可能にしない長さのスペーサー配列を有する1つ以上のガイドRNA(gRNA)であって、第1の遺伝子は、CpGアイランド(CGI)を含む、gRNA、又は1つ以上のgRNAをコードするポリヌクレオチド、及び

(C)細胞内の第2の遺伝子の遺伝子編集を可能にする長さのスペーサー配列を有する1つ以上のgRNA、又は1つ以上のgRNAをコードするポリヌクレオチドを含む組合せ。

【請求項 2】

(a)(B)における1つ以上のgRNAが11～17ヌクレオチドのスペーサー配列を有し、及び/又は

(b)(C)における1つ以上のgRNAが18～21ヌクレオチドのスペーサー配列を有する、請求項1に記載の組合せ。

【請求項 3】

1～3個の融合タンパク質を含む、請求項1又は2に記載の組合せ。

【請求項 4】

第2の遺伝子中の配列と相同である5'及び3'のアームを含むドナーDNAをさらに含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 5】

エンドヌクレアーゼドメインがCas9タンパク質、場合によりSpCas9に由来する、請求項1から4のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 6】

第1の遺伝子がB2M、TET2、TGFB2、A2AR、CISH、PTPN11、PTPN6、PTPA、PTPN2、JUNB、TOX、TOX2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、MAP4K1、REL、IRF4、DGKA、PIK3CD、HLA-A、USP16、DCK、及びFASから選択され、並びに/又は第2の遺伝子がTRAC、TRBC、PDCD1、TIM-3、TIGIT、LAG3、CTLA4、AAVS1、及びCCR5から選択される、請求項1から5のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 7】

第2の遺伝子がTRAC遺伝子であり、場合により、TRAC遺伝子を標的とする1つ以上のgRNAが配列番号562～611の1つの配列を有するスペーサーを含む、請求項6に記載の組合せ。

【請求項 8】

第1の遺伝子がB2M遺伝子であり、場合により、B2M遺伝子を標的とする1つ以上のgRNAがそれぞれ、配列番号28～33及び39～44の1つの配列、又は5'末端の3～9ヌクレオチドがランケットされた配列番号2778～2878の1つの配列を有するスペーサーを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 9】

第1の遺伝子がTGFB2遺伝子であり、場合により、TGFB2遺伝子を標的とする1つ以上のgRNAがそれぞれ、5'末端の3～9ヌクレオチドがランケットされた配列番号2929～2978及び4553～4559の1つの配列を有するスペーサーを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 10】

第1の遺伝子がTET2遺伝子であり、場合により、TET2遺伝子を標的とする1つ以上の

gRNAがそれぞれ、5'末端の3～9ヌクレオチドがランケットされた配列番号4429～4478及び4560～4565の1つの配列を有するスペーサーを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項11】

細胞が哺乳動物細胞、場合によりヒト細胞であり、さらに場合により細胞がヒト免疫細胞、又はヒト細胞である、請求項1から10のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項12】

ヒト細胞、場合により免疫細胞又はT細胞における1つ以上の遺伝子を制御するための組合せであって、

触媒的に不活性なCas9、場合によりSpCas9のエンドヌクレアーゼドメインをそれぞれ含む1～3個の融合タンパク質であって、転写リプレッサー及びDNMT3Lドメインを集合的に含む、融合タンパク質、又は1～3個の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、遺伝子がCpGアイランド(CGI)を含み、

(i)遺伝子がB2M遺伝子であって、組合せが、場合により5'末端の1～9ヌクレオチドがランケットされた配列番号2778～2878の1つの配列を有するスペーサーをそれぞれ含む2つ以上のgRNAをさらに含むか若しくはgRNAをコードするポリヌクレオチドを含むか、

(ii)遺伝子がTGFB2遺伝子であって、組合せが、場合により5'末端の1～9ヌクレオチドがランケットされた配列番号2929～2978及び4553～4559のいずれか1つの配列を有するスペーサーを含むgRNAをさらに含むか若しくはgRNAをコードするポリヌクレオチドを含むか、又は

(iii)遺伝子がTET2遺伝子であって、組合せが、場合により5'末端の1～9ヌクレオチドがランケットされた配列番号4429～4478及び4560～4565のいずれか1つの配列を有するスペーサーを含むgRNAをさらに含むか若しくはgRNAをコードするポリヌクレオチドを含む、組合せ。

【請求項13】

CGIを含む遺伝子がB2M遺伝子であり、これを標的とするgRNAが、場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケットされた、

C8(配列番号35)、

F4(配列番号24)、

H8(配列番号2780)、

H10(配列番号2863)、

H11(配列番号2778)、又は

H12(配列番号2801)

の配列を有するスペーサーをそれぞれ独立に含む2つ又は3つのgRNAである、請求項1から12のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項14】

B2Mを標的とするgRNAが、

(i)場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケットされたF4の配列を有するスペーサーを含むgRNA、

場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケットされたH8の配列を有するスペーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケットされたH10の配列を有するスペーサーを含むgRNA、

(ii)場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケットされたC8の配列を有するスペーサーを含むgRNA、

場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケットされたH8の配列を有するスペーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケットされたH10の配列を有するスペーサーを含むgRNA、

(iii) 場合により 5' 末端の 1～9 ヌクレオチド、場合により 3～9 ヌクレオチドがトランケートされた F4 の配列を有するスパーサーを含む gRNA、及び

場合により 5' 末端の 1～9 ヌクレオチド、場合により 3～9 ヌクレオチドがトランケートされた H8 の配列を有するスパーサーを含む gRNA、

(iv) 場合により 5' 末端の 1～9 ヌクレオチド、場合により 3～9 ヌクレオチドがトランケートされた F4 の配列を有するスパーサーを含む gRNA、及び

場合により 5' 末端の 1～9 ヌクレオチド、場合により 3～9 ヌクレオチドがトランケートされた H10 の配列を有するスパーサーを含む gRNA、又は

(v) 場合により 5' 末端の 1～9 ヌクレオチド、場合により 3～9 ヌクレオチドがトランケートされた H8 の配列を有するスパーサーを含む gRNA、及び

場合により 5' 末端の 1～9 ヌクレオチド、場合により 3～9 ヌクレオチドがトランケートされた H10 の配列を有するスパーサーを含む gRNA

を含む、請求項 13 に記載の組合せ。

【請求項 15】

CGI を含む遺伝子が TGFBR2 遺伝子であり、組合せが、これを標的とする 1 つ以上の gRNA 又は 1 つ以上の gRNA のコード配列を含み、1 つ以上の gRNA が、場合により 5' 末端の 1～9 ヌクレオチド、場合により 3～9 ヌクレオチドがトランケートされた、

TG1 (配列番号 4553)、

TG2 (配列番号 4554)、

TG3 (配列番号 4555)、

TG4 (配列番号 4556)、

TG5 (配列番号 4557)、

TG6 (配列番号 2940)、

TG7 (配列番号 2937)、

TG8 (配列番号 2930)、

TG9 (配列番号 2955)、

TG10 (配列番号 4558)、

TG11 (配列番号 2957)、

TG12 (配列番号 2929)、

TG13 (配列番号 4559)、

TG14 (配列番号 2945)、

TG15 (配列番号 2931)、

TG16 (配列番号 2942)、

TG17 (配列番号 2939)、

TG18 (配列番号 2935)、

TG19 (配列番号 2938)、又は

TG20 (配列番号 2932)

の配列を有するスパーサーをそれぞれ独立に含む、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 16】

TGFBR2 を標的とする gRNA が、

(i) 場合により 5' 末端の 1～9 ヌクレオチド、場合により 3～9 ヌクレオチドがトランケートされた TG7 の配列を有するスパーサーを含む gRNA、及び

場合により 5' 末端の 1～9 ヌクレオチド、場合により 3～9 ヌクレオチドがトランケートされた TG8 の配列を有するスパーサーを含む gRNA、又は

(ii) 場合により 5' 末端の 1～9 ヌクレオチド、場合により 3～9 ヌクレオチドがトランケートされた TG19 の配列を有するスパーサーを含む gRNA、及び

場合により 5' 末端の 1～9 ヌクレオチド、場合により 3～9 ヌクレオチドがトランケートされた TG20 の配列を有するスパーサーを含む gRNA

を含む、請求項 15 に記載の組合せ。

【請求項 17】

CGIを含む遺伝子がTET2遺伝子であり、組合せが、これを標的とする1つ以上のgRNA又は1つ以上のgRNAのコード配列を含み、1つ以上のgRNAが、場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケートされた、

TE1(配列番号4560)、
TE2(配列番号4561)、
TE3(配列番号4562)、
TE4(配列番号4563)、
TE5(配列番号4443)、
TE6(配列番号4434)、
TE7(配列番号4466)、
TE8(配列番号4438)、
TE9(配列番号4429)、
TE10(配列番号4469)、
TE11(配列番号4564)、
TE12(配列番号4449)、
TE13(配列番号4433)、
TE14(配列番号4442)、
TE15(配列番号4430)、
TE16(配列番号4431)、
TE17(配列番号4474)、
TE18(配列番号4432)、
TE19(配列番号4565)、又は
TE20(配列番号4478)

10

20

の配列を有するスペーサーをそれぞれ独立に含む、請求項1から12のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 18】

TET2を標的とするgRNAが、

(i)場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケートされたTE13の配列を有するスペーサーを含むgRNA、及び

30

場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケートされたTE14の配列を有するスペーサーを含むgRNA、又は

(ii)場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケートされたTE19の配列を有するスペーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドがランケートされたTE20の配列を有するスペーサーを含むgRNA

を含む、請求項17に記載の組合せ。

【請求項 19】

細胞内の1つ以上のさらなる遺伝子を標的とするためのgRNAをさらに含み、場合により以下の遺伝子:

40

(i)B2M及びTRAC、

(ii)B2M、TRAC、及びTGFB2、

(iii)B2M、TRAC、及びTET2、

(iv)B2M、TGFB2、及びTET2、又は

(v)B2M、TGFB2、TET2、及びTRAC

を標的とするgRNAを含むか、又はgRNAをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項1から18のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 20】

1つ以上の融合タンパク質が集合的に、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、又はSETDB1ドメイン、場合によりDNMT3Aをさらに含む、請求項1から19のいずれか一項に記載

50

の組合せ。

【請求項 2 1】

(i) 転写リプレッサードメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第1の融合タンパク質、並びにDNMT3Lドメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第2の融合タンパク質、又は

(ii) 場合によりN末端からC末端へ、転写リプレッサードメイン、Casエンドヌクレアーゼドメイン、及びDNMT3Lドメインを含む融合タンパク質を含む、請求項1から20のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 2 2】

(i) 転写リプレッサードメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第1の融合タンパク質、DNMT3Lドメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第2の融合タンパク質、並びにDNMT3Aドメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第3の融合タンパク質、又は

(ii) 転写リプレッサードメイン、Casエンドヌクレアーゼドメイン、DNMT3Lドメイン、及びDNMT3Aドメインを含む融合タンパク質を含む、請求項1から20のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 2 3】

転写リプレッサードメインが、場合によりヒトKox1又はZIM3に由来するKruppel関連ボックス(KRAB)ドメインである、請求項1から22のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 2 4】

場合によりN末端からC末端へ、ZIM3に由来するKRABドメイン、dCas9ドメイン、及びDNMT3Lドメインを含む融合タンパク質を含み、場合により配列番号4481のアミノ酸配列を含む、請求項12から23のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 2 5】

場合によりN末端からC末端へ、ZIM3に由来するKRABドメイン、触媒的に活性なCas9ドメイン、及びDNMT3Lドメインを含む融合タンパク質を含み、場合により配列番号4482のアミノ酸配列を含む、請求項1から11及び13から23のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 2 6】

gRNAが化学的に改変され、場合により、化学的に改変されたgRNAが、5'末端及び/若しくは3'末端にホスホロチオエートのヌクレオシド間結合、並びに/又は2'-O-メチルヌクレオチドを含む、請求項1から25のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項 2 7】

請求項1から26のいずれか一項に記載の組合せを含む医薬組成物。

【請求項 2 8】

請求項1から26のいずれか一項に記載の組合せを含む細胞又は細胞の後代。

【請求項 2 9】

請求項1から26のいずれか一項に記載の組合せをインビトロ又はエクスピボで細胞内に導入するステップを含む、ヒトT細胞内の1つ以上の遺伝子の転写、発現、及び/又は活性を改変する方法。

【請求項 3 0】

請求項29に記載の方法によって得られる細胞又は細胞の後代。

【請求項 3 1】

場合により組換えT細胞受容体(TCR)又はキメラ抗原受容体(CAR)から選択される組換え抗原受容体を発現するように場合により操作されたヒトT細胞である、請求項28又は30に記載の細胞。

【請求項 3 2】

それを必要とするヒトの処置における使用のための、請求項28、30、又は31に記載の細胞。

【請求項 3 3】

10

20

30

40

50

それを必要とするヒトを処置するための医薬の製造における、請求項28、30、又は31に記載の細胞の使用。

【請求項34】

請求項28、30、又は31に記載の細胞をヒトに投与するステップを含む、それを必要とするヒトを処置する方法。

【請求項35】

ヒトに対して同種又は自己である、請求項32に記載の使用のための細胞、請求項33に記載の使用、又は請求項34に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、遺伝子編集及び後成的（エピジェネティック）改変のための操作された転写モジュレーター（ETM）、例えば操作された転写リプレッサー（ETR）に関する。より具体的には、本発明は、少なくとも2つの標的遺伝子の発現を改変するための、遺伝子療法を適用する間を含む多重化方法における使用のためのETM（例えばETR）に関し、第1の標的遺伝子の発現は遺伝子編集によって改変され、第2の標的遺伝子の発現は後成的改変によって改変される。

【背景技術】

【0002】

操作されたT細胞を用いる養子免疫療法は、がんを処置するための強力なアプローチとして台頭してきた。これらの細胞は、患者自身の血液から調製（自己）、又は異なるドナーから誘導（同種）することができ、腫瘍関連抗原を認識するトランスジェニックなT細胞受容体（TCR）又はキメラ抗原受容体（CAR）の異所性発現によってがん細胞に対して再指向される。TCR及びCARは、レンチウイルス及びレトロウイルスのベクターを含む様々な手段によって、エクスピボで増殖したT細胞に導入され得る。しかし、これらのベクターはT細胞のゲノムに半ばランダムに一体化されやすく、腫瘍促進遺伝子の転写制御の不良に関連する安全性の懸念を引き起こしている。このリスクを避けるため、内因性TCR遺伝子座へのCAR配列の挿入を駆動するCRISPR/Cas9等の人工のヌクレアーゼによるゲノム編集が用いられてきた（J. Eyquem et al., Nature 2017 Mar 2;543(7643):113-117）。これは、T細胞の能力をも増強するアプローチである。

20

30

【0003】

ゲノム編集は、さらなる重要な遺伝子のノックアウトを介してT細胞療法の効率を改善し毒性を低減させるためにさらに用いられてきた。これに関して最も一般的な標的は、TCR遺伝子（TRAC及びTRBCによってコードされ、後者は同じ染色体上にシスで2つのコピーで存在する）、 β -2ミクログロブリン（B2M）遺伝子、及びプログラムされた細胞死1（PDCD1、PD1とも称される）遺伝子である。TRAC及びB2Mの不活化はグラフト対宿主反応を低減すると考えられ、PDCD1の不活化は、がん細胞/微小環境に起因する免疫減衰シグナルに対する移植されたT細胞の感受性を低下させるために用いられる。

【0004】

これらの多重化遺伝子編集アプローチ（即ち、細胞あたり多数の遺伝子の破壊）は有望ではあるが、関連する2つの課題を伴う。

40

(i)細胞あたり多数のDNAの切断の誘起は細胞のDNA損傷応答を過剰に活性化し、究極的には移植された細胞のアポトーシス又は機能/適合性の不良をもたらすことがある。これに関して、三重の編集が多重化の上限として提示されており、これを超えると顕著な細胞毒性が観察されることがある。

(ii)多重のDNA切断の間又はその中で染色体の転座が起こる（ヌクレアーゼのオンターゲット及びオフターゲットの部位並びに自然発生の切断を含み、後者は培養T細胞では比較的高い割合で起こる）ことがあり、このアプローチの安全性をさらに損なっている。CAR-T細胞の産生物における多重化の臨床試験及び前臨床試験において、二重遺伝子編集アプローチを用いた場合でさえも、警告すべきレベルのゲノム転座（5%まで）が報告されて

50

いる(L. Poirot et al., Cancer Res. 2015 Sep 15;75(18):3853-64; W. Qasim et al., Sci Transl Med; 2017 Jan 25;9(374); E. Stadtauer et al., Science 2020 Feb 28;367(6481))。

【0005】

標的された後成的改変(例えばエピサイレンシング)は、T細胞における多重化のための遺伝子編集アプローチのより安全な選択肢を表し得る。エピサイレンシングは、その意図した標的遺伝子を不活化するために、DNA切断よりは、例えばCpG部位におけるDNAのメチル化等のエピジェネティクスを利用している(A. Amabile et al., Cell. 2016 Sep 22;167(1):219-232)。

【0006】

エピサイレンシングは、操作された転写リプレッサー(ETR)、即ち例えば天然に存在する後成的エフェクタータンパク質(例えばKRAB、DNMT3L、及びDNMT3A)由来の後成的ドメインに融合した触媒的に不能化されたCas9(dCas9)又は転写アクチベーター様エフェクター(TALE)又はジンクフィンガータンパク質(ZFP)を含むタンパク質の一過的な送達によって達成され得る。細胞系及び初代Tリンパ球における個別の及びマルチコピーの遺伝子のサイレンシングにおけるETRの応用が、A. Amabile(上掲)及びT. Mlambo et al., Nucleic Acids Res. 2018 May 18;46(9):4456-4468によって報告された。しかし、ETRの活性はCpGアイランド(CGI)を有する遺伝子において好ましく生じるようであり、したがって関連のありそうなくつかの標的(例えば、とりわけ、TCR遺伝子及びPD1)は排除される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、同一の細胞の中で多数の遺伝子を改変することができる技術の開発に対するニーズが残っている。細胞あたりの多重DNA切断の数を低減させる技術は、多重化遺伝子編集戦略と比較してより安全なアプローチであり、細胞のDNAの損傷応答及び望ましくない染色体の転座を避けることができる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、同一の細胞内で多数の遺伝子を改変するための、組み合わされた遺伝子編集及び後成的編集の戦略の開発に関する。特に本発明は、1つ以上の遺伝子の永久的な後成的編集(例えばサイレンシング)及び別の遺伝子の遺伝子編集(例えば不活化)を促進するための、エンドヌクレアーゼ(例えば触媒的に活性なCas9)に作動可能に連結された後成的エフェクタードメイン及び様々な長さのガイドリボ核酸(gRNA)を含む操作された転写モジュレーター(ETM)、例えば操作された転写リプレッサー(ETR)を利用している。

【0009】

この直交アプローチによって、細胞あたり多数の遺伝子を不活化するヌクレアーゼ媒介ゲノム編集技術の使用に伴う遺伝毒性のリスクが克服される。有利なことに、本発明により、標的後成的改変を達成することがより困難な遺伝子のターゲティングが可能になり、1つの多重化戦略でCpGアイランド(CGI)を有する遺伝子とCGIを有しない遺伝子の両方をターゲティングすることが可能になる。

【0010】

即ち本発明は、後成的改変、例えば後成的サイレンシングと共役した遺伝子編集の組合せ戦略を提供する。この組合せにより、

(i) 多重化遺伝子編集方法と比較してゲノム転座の負荷が低減される。遺伝子編集のために選択される標的は、典型的にはCGIを欠くことになる。この遺伝子は、例えば相同組換えによって導入された、腫瘍に限定されたTCR又はCARをコードする外因性発現カセットの挿入のための標的部位としても用いられる。

(ii) 1つ以上のCGI含有遺伝子を改変、例えばサイレンシングするためにエピジェネティクスが利用される。

10

20

30

40

50

(iii) 2つの異なる手段においてサイレンシングを達成するための同一の構築物(ETM)の使用が可能になり、それにより、適正なサイレンシングのために細胞に添加する必要がある遺伝子エディターコーディングRNAの量が低減される。本発明の利点は、多重改変のために必要な構築物の数が低減され、それにより効率が改善され、製造コストが低下することである。

【0011】

好適には、遺伝子編集は(CGIを欠く)1つの遺伝子に限定され、CGIを含む少なくとも1つの遺伝子(例えば少なくとも2つ、又は少なくとも3つ、又はそれより多い遺伝子)が後成的に改変され得る。

【0012】

全体として、そのような組合せ戦略の開発により、がんの養子免疫療法のためのより安全で効率が良いT細胞産生物がもたらされることになる。

【0013】

一態様では、本発明は、b)エンドヌクレアーゼに作動可能に連結されたa)少なくとも1つの後成的エフェクタードメインを含む操作された転写モジュレーター(ETM)を提供する。

【0014】

ある特定の実施形態では、ETMは操作された転写リプレッサー(ETR)である。一部の実施形態では、ETMは操作された転写アクチベーター(ETA)である。

【0015】

一部の実施形態では、ETM(例えばETR)は、1つ、2つ、又は3つの後成的エフェクタードメインを含む。一部の実施形態では、ETM(例えばETR)は、1つの後成的エフェクタードメインを含む。一部の実施形態では、ETM(例えばETR)は、2つの後成的エフェクタードメインを含む。一部の実施形態では、ETM(例えばETR)は、3つの後成的エフェクタードメインを含む。

【0016】

一部の実施形態では、少なくとも1つの後成的エフェクタードメインは、Kruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)ドメイン、DNMT様ドメイン、及び/又はヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)ドメインを含む。一部の実施形態では、後成的エフェクタードメインは、転写リプレッサードメイン(例えばKruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン)である。

【0017】

一部の実施形態では、少なくとも1つの後成的エフェクタードメインは、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L、及びSETDB1からなる群から選択される。

【0018】

一部の実施形態では、ETM(例えばETR)は、KRABドメインを含む第1の後成的エフェクタードメイン及びDNMTドメインを含む第2の後成的エフェクタードメインを含む。一部の実施形態では、ETM(例えばETR)は、KRABドメインを含む第1の後成的エフェクタードメイン及びDNMT様ドメインを含む第2の後成的エフェクタードメインを含む。一部の実施形態では、ETM(例えばETR)は、KRABドメインを含む第1の後成的エフェクタードメイン、DNMTドメインを含む第2の後成的エフェクタードメイン、及びDNMT様ドメインを含む第3の後成的エフェクタードメインを含む。ある特定の実施形態では、ETMは、後成的エフェクタードメインとしてKRAB及びDNMT3A; KRAB及びDNMT3L;又はKRAB、DNMT3A、及びDNMT3Lを含んでよい。一部の実施形態では、ETM(例えばETR)は、転写リプレッサードメイン(例えばKruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン)及びDNMT3Lドメインを含む。一部の実施形態では、ETM(例えばETR)は、転写リプレッサードメイン(例えばKruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン)、DNMT3Aドメイン、及びDNMT3Lドメインを含む。

【0019】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼはRNA結合ドメインを含む。

10

20

30

40

50

【0020】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼはクラスター化され規則的な間隔で配置された短い回文反復(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR))/Casシステムである。

【0021】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼはCasエンドヌクレアーゼである。

【0022】

ある特定の実施形態では、エンドヌクレアーゼはCas9エンドヌクレアーゼである。ある特定の実施形態では、エンドヌクレアーゼはSpCas9エンドヌクレアーゼである。

【0023】

一部の実施形態では、ETM(例えばETR)は、Cas9-KRAB、Cas9-DNMT3A、又はCas9-DNMT3Lの融合タンパク質を含むか、これらからなり、これらは一緒に用いることができる。

【0024】

一部の実施形態では、ETM(例えばETR)は、二分割又は三分割の融合タンパク質である。

【0025】

別の態様では、本発明は、配列番号23~46、562~1076、2778~4478、若しくは4553~4565のいずれか1つの配列、又はそれらのホモログ若しくは断片を含むか、これらからなるスペーサー配列を含むgRNAを提供する。別の態様では、本発明は、配列番号23~46、562~1076、2778~4478、及び4553~4565のいずれか1つの配列、又はそれらのホモログ若しくは断片を含むか、これらからなるスペーサー配列を含むgRNAを提供する。

【0026】

別の態様では、スペーサー配列は、配列番号23~46、562~1076、若しくは2778~4478のいずれか1つの断片、例えば配列番号23~46、562~1076、2778~4478、若しくは4553~4565のいずれか1つの10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20ヌクレオチド断片からなる。別の態様では、スペーサー配列は、配列番号23~46、562~1076、2778~4478、及び4553~4565のいずれか1つの断片、例えば配列番号23~46、562~1076、2778~4478、及び4553~4565のいずれか1つの10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20ヌクレオチド断片からなる。断片は、5'末端からの配列の短縮化(トランケート)であってよい。

【0027】

別の態様では、スペーサー配列は、配列番号23~46、562~1076、若しくは2778~4478のいずれか1つの断片、例えば配列番号23~46、562~1076、若しくは2778~4478のいずれか1つの少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、又は少なくとも20の連続ヌクレオチドからなる。別の態様では、スペーサー配列は、配列番号23~46、562~1076、2778~4478、及び4553~4565のいずれか1つの断片、例えば配列番号23~46、562~1076、2778~4478、及び4553~4565のいずれか1つの少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、又は少なくとも20の連続ヌクレオチドからなる。

【0028】

別の態様では、本発明は、本発明によるETM(例えばETR)と少なくとも1つのgRNAを含む組合せ(例えばシステム)を提供する。gRNAは、ETM(例えばETR)に1つ以上の標的遺伝子を標的とさせることができる。別の態様では、本発明は、本発明によるETM(例えばETR)又はこれをコードするポリヌクレオチド及び少なくとも1つのgRNA又はこれをコードするポリヌクレオチドを含む組合せ(例えばシステム)を提供する。組合せは、本発明による1つ以上のETM(例えばETR)、例えば1つ、2つ、又は3つのETM(例えばETR)

、又はこれをコードするポリヌクレオチドを含んでよい。

【0029】

一部の実施形態では、それぞれのETMは、触媒的に活性なCRISPR/Casエンドヌクレアーゼドメインを含む融合タンパク質である。

【0030】

別の態様では、本発明は、細胞内の1つ以上の(例えば2つ以上の)遺伝子の転写、発現、及び/又は活性を改変するための組合せを提供し、組合せは、(A)触媒的に活性なCRISPR/Casエンドヌクレアーゼドメインをそれぞれ含む1つ以上の融合タンパク質であって、転写リプレッサードメイン及びDNMT3Lドメインを集合的に含む、融合タンパク質、又は1つ以上の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、(B)第1の遺伝子の後成的編集を可能にし、遺伝子編集を可能にしない長さを有するスペーサー配列を有する1つ以上のガイドRNA(gRNA)であって、第1の遺伝子は、細胞内のCpGアイランド(CGI)を含む、gRNA、又は1つ以上のgRNAをコードするポリヌクレオチド、及び(C)細胞内の第2の遺伝子の遺伝子編集を可能にする長さを有するスペーサー配列を有する1つ以上のgRNA、又は1つ以上のgRNAをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0031】

一部の実施形態では、少なくとも1つの後成的エフェクタードメインは転写リプレッサードメイン(例えばKruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン)であり、及び/又は少なくとも1つの後成的エフェクタードメインはDNMT3Lドメインである。一部の実施形態では、少なくとも1つの後成的エフェクタードメインは転写リプレッサードメイン(例えばKruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン)であり、少なくとも1つの後成的エフェクタードメインはDNMT3Aドメインであり、及び/又は少なくとも1つの後成的エフェクタードメインはDNMT3Lドメインである。

【0032】

一部の実施形態では、1つ以上のETMは集合的に(全体として)転写リプレッサードメイン(例えばKruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン)及びDNMT3Lドメインを含む。一部の実施形態では、1つ以上のETMは集合的に転写リプレッサードメイン(例えばKruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン、DNMT3Aドメイン、及びDNMT3Lドメインを含む。

【0033】

一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ16ヌクレオチド以下である。一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ11~16ヌクレオチド、例えば長さ12~16、13~16、14~16、又は15~16ヌクレオチドである。

【0034】

一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ17ヌクレオチド以上、例えば18以上、19以上、又は20以上のヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ17~30ヌクレオチド、例えば長さ18~30、19~30、又は20~30ヌクレオチドである。一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ17~25ヌクレオチド、例えば長さ18~25、19~25、又は20~25ヌクレオチドである。一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ17~20ヌクレオチド、例えば18~20又は19~20ヌクレオチドである。

【0035】

一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ17ヌクレオチド以下である。一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ11~17ヌクレオチド、例えば長さ12~17、13~17、14~17、15~17、16~17、12~16、13~16、14~16、又は15ヌクレオチドである。一部の実施形態では、(B)における1つ以上のgRNAは、17ヌクレオチド以下のスペーサー配列を有する。一部の実施形態では、(B)における1つ以上のgRNAは、11~17ヌクレオチド、例えば12~17、13~17、14~17、15~17、16~17、12~16、13~16、14~16、又は15ヌクレオチドのスペーサー配列を有する。

【0036】

一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ18ヌクレオチド以上、例えば長さ19以上

又は20以上のヌクレオチドである。一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ18〜30ヌクレオチド、例えば19〜30又は20〜30ヌクレオチドである。一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ18〜25ヌクレオチド、例えば長さ19〜25又は20〜25ヌクレオチドである。一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ18〜21ヌクレオチド、例えば長さ19〜21又は20〜21ヌクレオチドである。一部の実施形態では、スペーサー配列は長さ18〜20ヌクレオチド、例えば長さ19〜20ヌクレオチドである。一部の実施形態では、(C)における1つ以上のgRNAは18ヌクレオチド以上、例えば19以上、又は20以上のヌクレオチドのスペーサー配列を有する。一部の実施形態では、(C)における1つ以上のgRNAは18〜30ヌクレオチド、例えば19〜30又は20〜30ヌクレオチドのスペーサー配列を有する。一部の実施形態では、(C)における1つ以上のgRNAは18〜25ヌクレオチド、例えば19〜25又は20〜25ヌクレオチドのスペーサー配列を有する。一部の実施形態では、(C)における1つ以上のgRNAは18〜21ヌクレオチド、例えば19〜21又は20〜21ヌクレオチドのスペーサー配列を有する。一部の実施形態では、(C)における1つ以上のgRNAは18〜20ヌクレオチド、例えば19〜20ヌクレオチドのスペーサー配列を有する。

10

【0037】

ある特定の実施形態では、組合せは少なくとも2つのgRNAを含む。好適には、組合せは2つのgRNAを含んでよい。好適には、組合せは3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、又は8つのgRNAを含んでよい。

【0038】

少なくとも2つのgRNAは、ETM(例えばETR)に異なる標的遺伝子を標的とさせることができる。例えば、第1のgRNAはETM(例えばETR)に第1の標的遺伝子を標的とさせることができ、第2のgRNAはETM(例えばETR)に第2の標的遺伝子を標的とさせることができる。第3のgRNAは、例えばETM(例えばETR)に第3の標的遺伝子を標的とさせることができる。さらなるgRNAは、ETM(例えばETR)にさらなる標的遺伝子を標的とさせることができる。

20

【0039】

一部の実施形態では、1つの標的遺伝子が2つ以上のgRNAによって標的とされてよい。例えば、最適の後成的改変、例えば後成的サイレンシングのために、同一の遺伝子をいくつかのgRNAの標的とすることが有益な場合がある。第2の標的遺伝子が別のgRNAによって標的とされてもよい。

30

【0040】

特定の実施形態では、少なくとも2つのgRNAは異なる長さのスペーサー配列を含む。

【0041】

一部の実施形態では、少なくとも1つのgRNA(例えば1つ、2つ、3つ、又はそれ以上のgRNA)は、ETMによる標的遺伝子の後成的編集を可能にする長さを有するスペーサー配列を有してよく、及び/又は少なくとも1つのgRNAは、ETMによる標的遺伝子の遺伝子編集を可能にする長さを有するスペーサー配列を有してよい。

【0042】

一部の実施形態では、第1のgRNAは、ETMによる第1の標的遺伝子の後成的編集を可能にする長さを有するスペーサー配列を有してよく、第2のgRNAは、ETMによる第2の標的遺伝子の遺伝子編集を可能にする長さを有するスペーサー配列を有してよい。

40

【0043】

一部の実施形態では、少なくとも1つのgRNA(例えば1つ、2つ、3つ、又はそれ以上のgRNA)は、ETMによる標的遺伝子の後成的編集を可能にし、遺伝子編集を可能にしない長さを有するスペーサー配列を有してよく、及び/又は少なくとも1つのgRNAは、ETMによる別の標的遺伝子の遺伝子編集を可能にする長さを有するスペーサー配列を有してよい。

【0044】

一部の実施形態では、第1のgRNAは、ETMによる第1の標的遺伝子の後成的編集を可

50

能にし、遺伝子編集を可能にしない長さを有するスペーサー配列を有してよく、第2のgRNAは、ETMによる第2の標的遺伝子の遺伝子編集を可能にする長さを有するスペーサー配列を有してよい。

【0045】

好適には、少なくとも1つのgRNAは、長さ15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドのスペーサー配列を含んでよい。

【0046】

好適には、少なくとも2つのgRNAの1つは、長さ17ヌクレオチド以下(例えば16以下)のスペーサー配列を含んでよい。

【0047】

一部の実施形態では、組合せは、

(a)長さ16ヌクレオチド以下、例えば長さ15ヌクレオチド以下、14ヌクレオチド以下、13ヌクレオチド以下、又は12ヌクレオチド以下のスペーサー配列を含む第1のgRNA、及び/又は

(b)長さ17ヌクレオチド以上、例えば長さ18ヌクレオチド以上、19ヌクレオチド以上、又は20ヌクレオチド以上のスペーサー配列を含む第2のgRNAを含む。

【0048】

一部の実施形態では、組合せは、

(a)長さ11~16ヌクレオチド、例えば長さ12~16、13~16、14~16、又は15~16ヌクレオチドのスペーサー配列を含む第1のgRNA、及び/又は

(b)長さ17~30ヌクレオチド、例えば長さ18~30、19~30、20~30、17~25、18~25、19~25、20~25、17~20、18~20、又は19~20ヌクレオチドのスペーサー配列を含む第2のgRNAを含む。

【0049】

一部の実施形態では、組合せは、

(a)長さ17ヌクレオチド以下、例えば長さ16ヌクレオチド以下、15ヌクレオチド以下、14ヌクレオチド以下、13ヌクレオチド以下、12ヌクレオチド以下、又は11ヌクレオチドのスペーサー配列を含む第1のgRNA、及び/又は

(b)長さ18ヌクレオチド以上、例えば長さ19ヌクレオチド以上、又は20ヌクレオチド以上のスペーサー配列を含む第2のgRNAを含む。

【0050】

一部の実施形態では、組合せは、

(a)長さ11~17ヌクレオチド、例えば長さ12~17(例えば12~16)、13~17(例えば13~16)、14~17(例えば14~16)、15~17(例えば16)、又は17ヌクレオチドのスペーサー配列を含む第1のgRNA、及び/又は

(b)長さ18~30ヌクレオチド、例えば19~30、20~30、18~25、19~25、20~25、18~20、又は19~20ヌクレオチドのスペーサー配列を含む第2のgRNAを含む。

【0051】

一部の実施形態では、細胞内の第1の遺伝子の後成的編集を可能にし、遺伝子編集を可能にしない長さを有するスペーサー配列を有する1つ以上のガイドRNA(gRNA)は、

(a)17ヌクレオチド以下(例えば16ヌクレオチド以下)、例えば15ヌクレオチド以下、14ヌクレオチド以下、13ヌクレオチド以下、12ヌクレオチド以下、若しくは11ヌクレオチド以下、又は

(b)11~17ヌクレオチド(例えば11~16ヌクレオチド)、例えば12~17(例えば12~16)、13~17(例えば13~16)、14~17(例えば14~16)、15~17(例えば16)、若しくは17ヌクレオチド

10

20

30

40

50

のスペーサー配列を有する。

【0052】

一部の実施形態では、細胞内の第2の遺伝子の遺伝子編集を可能にする長さを有するスペーサー配列を有する1つ以上のgRNAは、

(a)17以上のヌクレオチド(例えば18以上のヌクレオチド)、例えば19以上、若しくは20以上のヌクレオチド、又は

(b)17～30のヌクレオチド、例えば18～30、19～30、20～30、18～25、19～25、20～25、18～20、若しくは19～20のヌクレオチド、場合により18～25ヌクレオチド(例えば18～21ヌクレオチド)

のスペーサー配列を有する。

10

【0053】

一部の実施形態では、少なくとも1つの標的遺伝子は、CpGアイランド(CGI)を有しない遺伝子、例えばTRAC、TRBC、PDCD1、TIM-3、TIGIT、LAG3、CTLA4、AAVS1、及びCCR5、並びに/又はCGIを有する遺伝子、例えばB2M、TET2、TGFB2、A2AR、CISH、PTPN11、PTPN6、PTPA、PTPN2、JUNB、TOX、TOX2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、MAP4K1、REL、IRF4、DGKA、PIK3CD、HLA-A、USP16、DCK、及びFASから選択される。例えば、標的遺伝子は、B2M、TRAC、TET2、及びTGFB2の1つ以上を含んでよい。一部の実施形態では、標的遺伝子は、例えばB2M及びTRACを含んでよい。一部の実施形態では、標的遺伝子は、例えばB2M、TRAC、TET2、及びTGFB2を含んでよい。一部の実施形態では、標的遺伝子は、B2M、TET2、及びTRACの組合せ; B2M、TET2、及びTGFB2の組合せ; B2M、TGFB2、及びTRACの組合せ;又はTET2、TGFB2、及びTRACの組合せを含んでよい。

20

【0054】

一部の実施形態では、第1の遺伝子はB2M、TET2、TGFB2、A2AR、CISH、PTPN11、PTPN6、PTPA、PTPN2、JUNB、TOX、TOX2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、MAP4K1、REL、IRF4、DGKA、PIK3CD、HLA-A、USP16、DCK、及びFASから選択され、並びに/又は第2の遺伝子はTRAC、TRBC、PDCD1、TIM-3、TIGIT、LAG3、CTLA4、AAVS1、及びCCR5から選択される。

【0055】

一部の実施形態では、第2の遺伝子はTRAC遺伝子であり、場合により、TRAC遺伝子を標的とする前記1つ以上のgRNAは、配列番号562～611の1つ、場合により配列番号604の配列を有するスペーサーを含む。

30

【0056】

一部の実施形態では、第1の遺伝子はB2M遺伝子であり、場合により、B2M遺伝子を標的とする1つ以上のgRNAはそれぞれ、配列番号28～33及び39～44の1つの配列、又は5'末端の3～9ヌクレオチドが短縮化された配列番号2778～2878の1つの配列、場合により5'末端の3～9ヌクレオチドが短縮化された配列番号2778、2780、2801、及び2863の1つの配列を有し、配列番号4486～4492、4497～4503、4508～4514、及び4519～4525から選択されるスペーサーを含む。

【0057】

一部の実施形態では、第1の遺伝子はTGFB2遺伝子であり、場合により、TGFB2遺伝子を標的とする1つ以上のgRNAはそれぞれ、5'末端の3～9ヌクレオチドが短縮化された配列番号2929～2978及び4553～4559の1つの配列を有するスペーサーを含む。

40

【0058】

一部の実施形態では、第1の遺伝子はTET2遺伝子であり、場合により、TET2遺伝子を標的とする1つ以上のgRNAはそれぞれ、5'末端の3～9ヌクレオチドが短縮化された配列番号4429～4478及び4560～4565の1つの配列を有するスペーサーを含む。

【0059】

一部の実施形態では、組合せは、細胞内の1つ以上(例えば2つ以上)の遺伝子の転写、発現、及び/又は活性を改変するためのものであり、細胞は哺乳動物細胞、場合によりヒ

50

ト細胞であり、場合により細胞はヒト免疫細胞又はヒトT細胞である。

【0060】

一部の実施形態では、組合せは、第2の遺伝子中の配列と相同である5'及び3'のアームを含むドナーDNAをさらに含む。

【0061】

一部の実施形態では、組合せは、

- i)細胞、例えば組合せを含む細胞若しくは組合せを含まない細胞の生存、増殖、及び/若しくは活性を促進する薬剤、並びに/又は
- ii)細胞、例えば組合せを含む細胞若しくは組合せを含まない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害である薬剤、並びに/又は
- iii)細胞、例えば組合せを含む細胞若しくは組合せを含まない細胞の選択を可能にする薬剤

をさらに含む。一部の実施形態では、薬剤はCAR又はトランスジェニックTCRである。

一部の実施形態では、薬剤はFIXである。

【0062】

別の態様では、本発明は、ヒト細胞、場合により免疫細胞又はT細胞における1つ以上の遺伝子を制御するための組合せを提供し、組合せは、

触媒的に不活性なCas9、場合によりSpCas9のエンドヌクレアーゼドメインをそれぞれ含む1つ以上(例えば1~3)の融合タンパク質であって、転写リプレッサー及びDNMT3Lドメインを集散的に含む、融合タンパク質、又は1つ以上(例えば1~3)の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、遺伝子がCpGアイランド(CGI)を含み、

(i)遺伝子がB2M遺伝子であって、組合せは、場合により5'末端の1~9ヌクレオチドが短縮化された配列番号2778~2878の1つの配列を有するスペーサーをそれぞれ含む2つ以上のgRNAをさらに含むか若しくはgRNAをコードするポリヌクレオチドを含むか、

(ii)遺伝子がTGFB2遺伝子であって、組合せは、場合により5'末端の1~9ヌクレオチドが短縮化された配列番号2929~2978及び4553~4559のいずれか1つの配列を有するスペーサーを含むgRNAをさらに含むか若しくはgRNAをコードするポリヌクレオチドを含むか、又は

(iii)遺伝子がTET2遺伝子であって、組合せは、場合により5'末端の1~9ヌクレオチドが短縮化された配列番号4429~4478及び4560~4565のいずれか1つの配列を有するスペーサーを含むgRNAをさらに含むか若しくはgRNAをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0063】

一部の実施形態では、組合せは、本発明による少なくとも1つのgRNAを含む。一部の実施形態では、組合せは、表8に示す1つ以上のgRNA配列を含む1つ以上のgRNAを含む。一部の実施形態では、本開示は、表8に示す1つ以上のgRNA配列を含む1つ以上のgRNAを含む遺伝子を制御するための組合せを提供する。

【0064】

一部の実施形態では、CGIを含む遺伝子はB2M遺伝子であり、これを標的とするgRNAは、場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化された、C8(配列番号35)、F4(配列番号24)、H8(配列番号2780)、H10(配列番号2863)、H11(配列番号2778)、又はH12(配列番号2801)の配列を有するスペーサーをそれぞれ独立に含む2つ又は3つのgRNAである。

【0065】

一部の実施形態では、B2Mを標的とするgRNAは、場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたF4の配列を有するスペーサーを含むgRNA、場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたH8の配列を有するスペーサーを含むgRNA、及び場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたH10の配列を有するスペーサーを含むgRNAを含む。

【0066】

一部の実施形態では、B2Mを標的とするgRNAは、場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたC8の配列を有するスパーサーを含むgRNA、場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたH8の配列を有するスパーサーを含むgRNA、及び場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたH10の配列を有するスパーサーを含むgRNAを含む。

【0067】

一部の実施形態では、B2Mを標的とするgRNAは、場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたF4の配列を有するスパーサーを含むgRNA、及び場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたH8の配列を有するスパーサーを含むgRNAを含む。

10

【0068】

一部の実施形態では、B2Mを標的とするgRNAは、場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたF4の配列を有するスパーサーを含むgRNA、及び場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたH10の配列を有するスパーサーを含むgRNAを含む。

【0069】

一部の実施形態では、B2Mを標的とするgRNAは、場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたH8の配列を有するスパーサーを含むgRNA、及び場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたH10の配列を有するスパーサーを含むgRNAを含む。

20

【0070】

一部の実施形態では、CGIを含む遺伝子はTGFB2遺伝子であり、組合せはこれを標的とする1つ以上のgRNA又は1つ以上のgRNAのコード配列を含み、前記1つ以上のgRNAは、場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化された、

TG1(配列番号4553)、
TG2(配列番号4554)、
TG3(配列番号4555)、
TG4(配列番号4556)、
TG5(配列番号4557)、
TG6(配列番号2940)、
TG7(配列番号2937)、
TG8(配列番号2930)、
TG9(配列番号2955)、
TG10(配列番号4558)、
TG11(配列番号2957)、
TG12(配列番号2929)、
TG13(配列番号4559)、
TG14(配列番号2945)、
TG15(配列番号2931)、
TG16(配列番号2942)、
TG17(配列番号2939)、
TG18(配列番号2935)、
TG19(配列番号2938)、又は
TG20(配列番号2932)

30

40

の配列を有するスパーサーをそれぞれ独立に含む。

【0071】

一部の実施形態では、TGFB2を標的とするgRNAは、

50

(i) 場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたTG7の配列を有するスパーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたTG8の配列を有するスパーサーを含むgRNA、又は

(ii) 場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたTG19の配列を有するスパーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたTG20の配列を有するスパーサーを含むgRNAを含む。

【0072】

一部の実施形態では、CGIを含む遺伝子はTET2遺伝子であり、組合せはこれを標的とする1つ以上のgRNA又は1つ以上のgRNAのコード配列を含み、1つ以上のgRNAは、場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化された、

TE1(配列番号4560)、

TE2(配列番号4561)、

TE3(配列番号4562)、

TE4(配列番号4563)、

TE5(配列番号4443)、

TE6(配列番号4434)、

TE7(配列番号4466)、

TE8(配列番号4438)、

TE9(配列番号4429)、

TE10(配列番号4469)、

TE11(配列番号4564)、

TE12(配列番号4449)、

TE13(配列番号4433)、

TE14(配列番号4442)、

TE15(配列番号4430)、

TE16(配列番号4431)、

TE17(配列番号4474)、

TE18(配列番号4432)、

TE19(配列番号4565)、又は

TE20(配列番号4478)

の配列を有するスパーサーをそれぞれ独立に含む。

【0073】

一部の実施形態では、TET2を標的とするgRNAは、

(i) 場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたTE13の配列を有するスパーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたTE14の配列を有するスパーサーを含むgRNA、又は

(ii) 場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたTE19の配列を有するスパーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1～9ヌクレオチド、場合により3～9ヌクレオチドが短縮化されたTE20の配列を有するスパーサーを含むgRNAを含む。

【0074】

一部の実施形態では、ETM(例えば1つ以上の融合タンパク質)は、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、又はSETDB1ドメイン、場合によりDNMT3Aを集合的にさらに含む。

【0075】

一部の実施形態では、組合せは、(i)転写リプレッサードメイン及びCasエンドヌクレ

10

20

30

40

50

アーゼドメインを含む第1の融合タンパク質、並びにDNMT3Lドメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第2の融合タンパク質、又は(ii)場合によりN末端からC末端へ、転写リプレッサードメイン、Casエンドヌクレアーゼドメイン、及びDNMT3Lドメインを含む融合タンパク質を含む。

【0076】

一部の実施形態では、組合せは、(i)転写リプレッサードメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第1の融合タンパク質、DNMT3Lドメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第2の融合タンパク質、並びにDNMT3Aドメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第3の融合タンパク質、又は(ii)転写リプレッサードメイン、Casエンドヌクレアーゼドメイン、DNMT3Lドメイン、及びDNMT3Aドメインを含む融合タンパク質を含む。

10

【0077】

一部の実施形態では、後成的エフェクタードメイン(例えば転写リプレッサードメイン)は、場合によりヒトKox1又はZIM3に由来するKruppel関連ボックス(KRAB)ドメインである。

【0078】

一部の実施形態では、組合せは、場合によりN末端からC末端へ、ZIM3に由来するKRABドメイン、触媒的に活性なCas9ドメイン、及びDNMT3Lドメインを含む融合タンパク質を含み、場合により配列番号4482のアミノ酸配列を含む。

【0079】

一部の実施形態では、組合せは、細胞内の1つ以上のさらなる遺伝子を標的とするためのgRNAをさらに含み、場合により以下の遺伝子: (i)B2M及びTRAC、(ii)B2M、TRAC、及びTGFB2、(iii)B2M、TRAC、及びTET2、(iv)B2M、TGFB2、及びTET2、又は(v)B2M、TGFB2、TET2、及びTRACを標的とするgRNAを含むか、又はgRNAをコードするポリヌクレオチドを含む。

20

【0080】

一部の実施形態では、gRNAは化学的に改変され、場合により、化学的に改変されたgRNAは、5'末端及び/若しくは3'末端にホスホロチオエートのヌクレオシド間リンケージ、並びに/又は2'-O-メチルヌクレオチドを含む。

【0081】

さらなる態様では、本発明は、本発明による少なくとも1つのETM(例えばETR)をコードするポリヌクレオチドを提供する。

30

【0082】

別の態様では、本発明は、本発明による少なくとも1つのETM(例えばETR)をコードする核酸配列を含む核酸構築物を提供する。

【0083】

一部の実施形態では、核酸構築物は、
i)細胞、例えば前記核酸構築物を発現する細胞又は前記核酸構築物を発現しない細胞の生存、増殖、及び/若しくは活性を促進する核酸配列、並びに/又は
ii)細胞、例えば前記核酸構築物を発現する細胞又は前記核酸構築物を発現しない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害な核酸配列、並びに/又は
iii)細胞、例えば核酸構築物を含む細胞若しくは構築物を含まない細胞の選択を可能にする核酸配列をさらに含む。

40

【0084】

一態様では、本発明は、本発明によるポリヌクレオチド又は本発明による核酸構築物を含むベクターを提供する。

【0085】

別の態様では、本発明は、
a)本発明による少なくとも1つのETM(例えばETR)をコードする少なくとも1つのポリヌ

50

クレオチド、及び

b) 本明細書で開示する少なくとも1つのgRNAを提供するポリヌクレオチド、及び場合により、

c) i) 細胞、例えばポリヌクレオチドを含む細胞又はポリヌクレオチドを含まない細胞の生存、増殖、及び/若しくは活性を促進する薬剤、並びに/又は

ii) 細胞、例えば前記ポリヌクレオチドを含む細胞又は前記ポリヌクレオチドを含まない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害な薬剤、並びに/又は

iii) 細胞、例えばポリヌクレオチドを含む細胞又はポリヌクレオチドを含まない細胞の選択を可能にする薬剤

をコードする核酸配列を含むさらなるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのキットを提供する。

【0086】

別の態様では、本発明は、本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、又は本発明によるポリヌクレオチドのキットを含む細胞(例えば操作された細胞)を提供する。別の態様では、本発明は細胞の子孫(後代)を提供する。

【0087】

別の態様では、本発明は、本発明の使用若しくは方法によって得られる細胞、又はその子孫を提供する。

【0088】

一部の実施形態では、細胞は、場合により組換えT細胞受容体(TCR)又はキメラ抗原受容体(CAR)から選択される組換え抗原受容体を発現するように場合により操作されたヒトT細胞である。

【0089】

さらなる態様では、本発明は、本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、本発明によるポリヌクレオチドのキット、又は本発明による細胞を含む組成物を提供する。

【0090】

別の態様では、本発明は、本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、本発明によるポリヌクレオチドのキット、又は本発明による細胞を含む医薬組成物を提供する。

【0091】

さらなる態様では、本発明は、少なくとも1つの標的遺伝子の転写、発現、及び/又は活性を改変するための、本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、本発明によるポリヌクレオチドのキット、又は本発明による細胞の使用を提供する。使用は、例えばインビトロ又はエキスピボの使用であってよい。

【0092】

別の態様では、本発明は、本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、又は本発明によるポリヌクレオチドのキットを細胞に投与するステップを含む、細胞内の少なくとも1つの標的遺伝子の転写、発現、及び/又は活性を改変する方法を提供する。細胞は、例えばT細胞であってよい。

【0093】

一部の実施形態では、転写、発現、及び/又は活性を改変するステップは、転写、発現、及び/又は活性を抑制するステップ、例えばサイレンシングするステップである。

10

20

30

40

50

【0094】

一部の実施形態では、方法は、細胞内の少なくとも2つの異なる標的遺伝子の転写及び/又は発現を抑制するステップを含む。

【0095】

一部の実施形態では、方法は、細胞内の少なくとも2つの異なる標的遺伝子をサイレンシングするステップを含む。

【0096】

好適には、少なくとも2つの標的遺伝子の少なくとも1つの転写及び/又は発現は後成的に抑制(例えばサイレンシング)され、少なくとも2つの標的遺伝子の少なくとも1つは遺伝子編集によって抑制(例えばサイレンシング)され、少なくとも1つのETM(例えばETR)及び少なくとも2つのgRNAは、同時、逐次、又は個別に前記細胞に投与される。

10

【0097】

一態様では、本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、本発明によるポリヌクレオチドのキット、本発明による細胞、又は本発明による医薬組成物は、治療における使用のためであってよい。

【0098】

別の態様では、本発明は、それを必要とするヒトを処置するための医薬の製造における、本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、本発明によるポリヌクレオチドのキット、本発明による細胞、又は本発明による医薬組成物の使用を提供する。

20

【0099】

好適には、少なくとも1つのETM(例えばETR)及び少なくとも2つのgRNAは、同時、逐次、又は個別に対象に投与してよい。

【0100】

別の態様では、本発明は、本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、本発明によるポリヌクレオチドのキット、本発明による細胞、又は本発明による医薬組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む、疾患を処置(治療)及び/又は防止(予防)する方法を提供する。

30

【0101】

好適には、少なくとも1つのETM(例えばETR)及び少なくとも2つのgRNAは、同時、逐次、又は個別に対象に投与してよい。

【0102】

一態様では、本発明は、

(i)細胞を含む試料の単離、

(ii)本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、又は本発明によるポリヌクレオチドのキットの細胞への導入、及び

40

(iii)ステップ(ii)からの細胞の対象への投与のステップを含む、遺伝子治療の方法を提供する。

【0103】

ポリヌクレオチド、核酸構築物、又はベクターは、例えば形質導入又はトランスフェクションによって導入してよい。

【0104】

一部の実施形態では、細胞は自己である。一部の実施形態では、細胞は同種である。

【0105】

本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクタ

50

一、本発明によるポリヌクレオチドのキット、本発明による細胞、又は本発明による医薬組成物は、本明細書に記載した処置の方法において用いてよく、本明細書に記載した処置における使用のためであってよく、又は本明細書に記載した処置のための医薬の製造において用いてよいことが理解される。

【0106】

本発明のその他の特徴、目的、及び利点は、以下の詳細な説明において明らかになる。しかし、詳細な説明は本発明の実施形態及び態様を示すが、説明のためのみに与えられ、限定ではないことを理解されたい。本発明の範囲内の種々の変更及び改変は、詳細な説明から当業者には明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0107】

【図1】(A) Cas9又はdCas9-ETRが標的とし、本明細書の実施例で標的とされるB2M遺伝子内の配列(それぞれセンス及びアンチセンス鎖の配列番号21及び22)(プロトSpacer隣接モチーフ(PAM)配列に下線を付す)、並びに(B) B2Mを標的とするgRNAにおいて用いられ、本明細書の実施例で用いられるSpacerの配列(出現の順に配列番号23~34)を示す。

【図2】 Cas9及び指示したgRNAをトランスフェクトした細胞内の変異したB2Mアレルのパーセンテージを説明するヒストグラムを示す。データはB2Mにおける非相同末端結合(NHEJ)の%として表す($n=3$; 平均 $\pm$ s.d.)。UT:未処理。

【図3】 dCas9系ETRの三重組合せ及び指示したgRNAによるトランスフェクションの44日のtdTomato陰性細胞のパーセンテージを説明するヒストグラムを示す($n=3$; 平均 $\pm$ s.d.)。

【図4】 dCas9系ETRの三重組合せ(左パネル)又はCas9(右パネル)及び指示したgRNA、即ち完全長又は指示のように短縮化されたH8、C8、及びH10によるトランスフェクションの20日のtdTomato陰性細胞のパーセンテージを説明するヒストグラムを示す。H8、C8、及びH10の完全長配列は、それぞれ配列番号2780、35、及び2863である。切り取られたバージョン(19、18、17、16、15、14、13、12、11、又は10ヌクレオチドのバージョン)は、完全長の配列の5'末端でそれぞれ1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10ヌクレオチドだけ切り取られている。

【図5】 Cas9及びTRAC gRNAをトランスフェクトした細胞における変異したTRACアレルのパーセンテージを説明するヒストグラムを示す。データはTRACにおけるNHEJの%として表す($n=3$; 平均 $\pm$ s.d.)。

【図6】 指示したCas9構築物(即ちCas9、dCas9-ETR、Cas9-ETR(即ちETM))とgRNAの組合せによるトランスフェクションの25日後のB2M陰性細胞(B2M⁻細胞)のパーセンテージを説明するヒストグラムを示す($n=3$; 平均 $\pm$ s.d.)。

【図7】 16ntのB2M gRNA及びCas9-ETR(即ちETM)又はdCas9-ETRによって処理した細胞の代表的なフローサイトメトリードットプロット解析を示す。解析は処理後25日目に実施した。

【図8】 指示したように処理した細胞の時間経過フローサイトメトリー解析を示す。データは未処理(UT)細胞に正規化したB2M陰性細胞の%として示す。解析は処理後25日目に実施した($n=3$; 平均 $\pm$ s.d.)。

【図9】 指示した処理条件についてのB2M又はTRAC遺伝子における遺伝子編集のパーセンテージを説明するヒストグラムを示す($n=3$; 平均 $\pm$ s.d.)。

【図10】 B2M及びTRAC遺伝子座の間の相互染色体転座についての指示された処理条件のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)解析を示す。上:解析に用いたプライマー(矢印)を示すPCR戦略の概念図を示す。下:指示された処理条件からのPCR産物を負荷したアガロース染色ゲルの写真を示す(それぞれ三重測定)。転座は、20ntのB2M gRNAと組み合わせたCas9又はCas9-ETR(即ちETM)で処理した試料においてのみ検出された。MW:分子量。

【図11】 CpGアイランド(CGI)及びgRNA、即ちH8(配列番号2780)、C8(配列番号3

10

20

30

40

50

5)、F4(配列番号2878)、H10(配列番号2863)、H11(配列番号2778)、及びH12(配列番号2801)の分布を示すB2M遺伝子の概略図である。

【図12】単独(各表の第1列)又は組合せ(各表の第2列及び第3列)での、指示されたgRNAによる処理後12日目及び25日目の、dCas9系ETRの三重組合せによるB2Mのサイレンシングのパーセンテージを示す。データはヒートマップとして示す。

【図13】指示されたgRNAの組合せ(即ちC8+F4、C8+H8、又はH8+F4)及びdCas9系ETRの三重組合せによって処理したT細胞の処理後12日目及び25日目における代表的なフローサイトメトリー解析を示す。C8+F4及びH8+F4の条件の間のB2Mのエピサイレンシングの効率に関する倍数増加を示す。

【図14】dCas9系ETRの三重組合せ及び指示されたgRNAの組合せによって処理したT細胞の時間経過フローサイトメトリー解析を示す。データはB2M陰性細胞の%として示す。UT:未処理T細胞。縦の赤い点線はT細胞を再刺激した日を示す。

【図15】図14に示したデータに基づいて計算した、処理後25日と12日の間のB2M陰性T細胞のパーセンテージにおける倍数変化を説明するヒストグラムを示す。データはB2M陰性細胞の倍数減少として表す。

【図16】dCas9系ETRの三重組合せ及び指示されたgRNAの組合せによって処理したT細胞の時間経過フローサイトメトリー解析を示す。データはB2M陰性細胞の%として示す。UT:未処理T細胞。縦の赤い点線はT細胞を再刺激した日を示す。

【図17】図16に示したデータに基づいて計算した、処理後25日と12日の間のB2M陰性T細胞のパーセンテージにおける倍数変化を説明するヒストグラムを示す。データはB2M陰性細胞の倍数減少として表す。

【図18A】指示されたETRの組合せ及びgRNAの組合せC8+F4によって処理したT細胞の時間経過フローサイトメトリー解析を示す。データはB2M陰性細胞の%として示す。UT:未処理T細胞。K+3A+3L:標準の三重ETR組合せ; K: KRAB系ETR単独; 3A+3L: DNMT3A及びDNMT3Lを含む二重ETR組合せ; K+3A: KRAB及びDNMT3Aを含む二重ETR組合せ; K+3L: KRAB及びDNMT3Lを含む二重ETR組合せ; 縦の赤い点線はT細胞を再刺激した日を示す。

【図18B】指示されたETRの組合せ及びgRNAの組合せC8+F4によって処理した図18AのT細胞の代表的なフローサイトメトリー解析を示す。K+3A+3L:標準的な三重ETR組合せ; K: KRAB系ETR単独; 3A+3L: DNMT3A及びDNMT3Lを含む二重ETR組合せ; K+3A: KRAB及びDNMT3Aを含む二重ETR組合せ; K+3L: KRAB及びDNMT3Lを含む二重ETR組合せ。

【図19】KRAB及びDNMT3Lを含む二重ETR組合せ及び指示されたgRNAの組合せによって処理したT細胞の時間経過フローサイトメトリー解析を示す。データはB2M陰性細胞の%として示す。UT:未処理T細胞。縦の赤い点線はT細胞を再刺激した日を示す。

【図20A】ZIM3:dCas9:3L融合ETRの概念図を左に示し、DNMT3A及びDNMT3Lを含む二重ETR組合せ又はZIM3:dCas9:3L、及び指示されたgRNAの組合せのいずれかによって共処理されたT細胞の時間経過フローサイトメトリー解析を右に示す。データはB2M陰性細胞の%として示す。UT:未処理T細胞。縦の赤い点線はT細胞を再刺激した日を示す。

【図20B】指示されたETR及びgRNAの組合せによって処理した図20AのT細胞の代表的なフローサイトメトリー解析を示す。二重ETR組合せ及びETR融合体によって処理した試料の間のエピサイレンシングの効率における倍数変化増加も示す。

【図21】ZIM3:dCas9:3L融合ETRをコードする減少する用量(マイクログラム)のmRNA及び指示されたgRNAの組合せによって処理したT細胞の代表的なフローサイトメトリー解析を示す。

【図22】Cas9、TRACに対するgRNAで処理し、又は処理せず(図5参照)、NY-ESO操作されたTCRのTRACへの標的された一体化のためにAAV6を形質導入したT細胞の代表的なフローサイトメトリー解析を示す。上左の四半部は野生型の未編集細胞を示す。下左の四半部は遺伝子的に破壊されたTCRを含む細胞を示す。上右の四半部はNY-ESO TCR

10

20

30

40

50

の標的された一体化を有するT細胞を示す。

【図23】触媒的に活性なCas9並びにKRAB及びDNMT3Lエフェクターを含む二重ETM組合せの概略図を左に示し、これらのETM及びB2Mに対する指示された切断gRNA並びにTRACに対する完全長のgRNA及びNY-ESO TCRのTRACへの標的一体化のためにAAV6で処理したT細胞の代表的なフローサイトメトリー解析を右に示す。左側のフローサイトメトリードットプロットはB2Mの発現レベルを示している。中間のフローサイトメトリードットプロットは内因性TCR及び標的NY-ESOの発現レベルを示している。右側のフローサイトメトリードットプロットはNY-ESO及びB2Mの発現レベルを示している。SSCH:側方散乱高さ。

【図24-1】触媒的に活性なCas9並びにZIM3及びDNMT3Lエフェクターを含むETM(即ちZIM3:Cas9:3L)の概略図を左に示し、このETM及びB2Mに対する指示された切り取られたgRNA並びにTRACに対する完全長のgRNA及びNY-ESO TCRのTRACへの標的一体化のためにAAV6で処理したT細胞の代表的なフローサイトメトリー解析を右に示す。左上のフローサイトメトリードットプロットはB2Mの発現レベルを示している。上中のフローサイトメトリードットプロットは内因性TCR及び標的NY-ESOの発現レベルを示している。下のフローサイトメトリードットプロットはNY-ESO及びB2Mの発現レベルを示している。右上のフローサイトメトリードットプロットはNY-ESO陽性細胞の中でのB2Mの発現レベルを示している。右下のフローサイトメトリードットプロットは内因性TCR陰性細胞の中でのB2Mの発現レベルを示している。

【図24-2】図24-1の続きである。

【図25】B2M及びTRACの間の相互染色体転座についての指示された処理条件のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)解析を示す。上:解析に用いたプライマー(矢印)を示すPCR戦略の概念図を示す。下:指示された処理条件からのPCR産物を負荷したアガロース染色ゲルの写真を示す。B2M-TRAC転座バンドの予想される位置をアステリスクで示す。MW:分子量。転座は、B2M及びTRACについて20ntのgRNAと組み合わせたETMで処理した試料においてのみ検出された。

【図26】TGFB2(上)及びTET2(下)遺伝子の概略図を示し、この中で、それぞれのgRNA及びそれらのペアリング(P)の相対的な位置を示している。それぞれの遺伝子のCpGアイランド(CGI)も示している。

【図27】gRNAペアの指示された組合せについてのTGFB2エピサイレンシングのパーセンテージを示す。パーセンテージは枠の中に示している。ラベルのない枠はマトリックス中に既に存在していた組合せを示す。np:実施せず。

【図28】gRNAペアの指示された組合せについてのTET2エピサイレンシングのパーセンテージを示す。パーセンテージは枠の中に示している。ラベルのない枠はマトリックス中に既に存在していた組合せを示す。陰性データはTET2の上方制御を示す。np:実施せず。

【図29】単独又は組合せで、三重ETR組合せ及びgRNAの指示されたペア(P)で処理したT細胞内のTGFB2(左)及びTET2(右)のエピサイレンシングのパーセンテージを説明するヒストグラムを示す。これらの研究で用いたペアは、図27及び28に記載したペアに対応する。

【図30】ddPCRによって測定した指示された遺伝子の後成的サイレンシングのパーセンテージを説明するヒストグラムを示す。

【図31】指示されたように処理したT細胞によるB2M(左のプロット)及びTRAC(右のプロット)の発現についての代表的なフローサイトメトリー解析を左に、TGFB2の後成的サイレンシングのパーセンテージを説明するヒストグラムを右に示す。

【図32】指示されたように処理したT細胞によるB2M(左のプロット)及びTRAC(右のプロット)の発現についての代表的なフローサイトメトリー解析を左に、TGFB2の後成的サイレンシングのパーセンテージを説明するヒストグラムを右に示す。

【図33】B2M、TGFB2、及びTRACの間の相互染色体転座についての指示された処理条件のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)解析を示す。上:2つの仮説的遺伝子(X及びY)につ

10

20

30

40

50

いてのPCR戦略の概念図。ここで矢印は解析に用いたプライマーを示す。下:指示された処理条件からのPCR産物を負荷したアガロース染色ゲルの写真。転座バンドの予想される位置をアスタリスクで示す。MW:分子量。転座は、B2M、TGFB2、及びTRACについて20ntのgRNAと組み合わせたETMで処理した試料においてのみ検出された。

【図34】指示されたように処理したT細胞によるB2M(左のプロット)及びTRAC(右のプロット)の発現についての代表的なフローサイトメトリー解析を左に、TET2の後成的サイレンシングのパーセンテージを説明するヒストグラムを右に示す。

【図35】指示されたように処理したT細胞によるB2M(左のプロット)及びTRAC(右のプロット)の発現についての代表的なフローサイトメトリー解析を左に、TET2の後成的サイレンシングのパーセンテージを説明するヒストグラムを右に示す。

【図36】B2M、TET2、及びTRACの間の相互染色体転座についての指示された処理条件のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)解析を示す。上:2つの仮説的遺伝子(X及びY)についてのPCR戦略の概念図。ここで矢印は解析に用いたプライマーを示す。下:指示された処理条件からのPCR産物を負荷したアガロース染色ゲルの写真。転座バンドの予想される位置をアスタリスクで示す。MW:分子量。転座は、B2M、TET2、及びTRACについて20ntのgRNAと組み合わせたETMで処理した試料においてのみ検出された。

【図37】指示されたように処理したT細胞によるB2M(左のプロット)及びTRAC(右のプロット)の発現についての代表的なフローサイトメトリー解析を左に、TGFB2及びTET2の後成的サイレンシングのパーセンテージを説明するヒストグラムを右に示す。

【図38】指示されたように処理したT細胞によるB2M(左のプロット)及びTRAC(右のプロット)の発現についての代表的なフローサイトメトリー解析を左に、TGFB2及びTET2の後成的サイレンシングのパーセンテージを説明するヒストグラムを右に示す。

【図39】B2M、TGFB2、TET2、及びTRACの間の相互染色体転座についての指示された処理条件のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)解析を示す。上:2つの仮説的遺伝子(X及びY)についてのPCR戦略の概念図。ここで矢印は解析に用いたプライマーを示す。下:指示された処理条件からのPCR産物を負荷したアガロース染色ゲルの写真。転座バンドの予想される位置をアスタリスクで示す。MW:分子量。転座は、B2M、TGFB2、TET2、及びTRACについて20ntのgRNAと組み合わせたETMで処理した試料においてのみ検出された。

【発明を実施するための形態】

【0108】

操作された転写モジュレーター(ETM)

一態様では、本発明は操作された転写モジュレーター(ETM)、例えば、b)エンドヌクレアーゼに作動可能に連結されたa)少なくとも1つの後成的エフェクタードメインを含む操作された転写リプレッサー(ETR)を提供する。

【0109】

本発明のETMはETRであってよい。ETRは標的遺伝子の転写及び/又は発現を抑制し得る。

【0110】

本発明のETM(例えばETR)は、異なる標的遺伝子の遺伝子編集及び後成的編集の多重化を可能にし得る薬剤である。例えば、本発明によるETM(例えば、ETR)は、多数の異なる標的遺伝子の転写及び/又は発現の抑制(例えばサイレンシング)を可能にし、1つの遺伝子が遺伝子編集によって抑制(例えばサイレンシング)され、少なくとも1つの遺伝子が後成的抑制(例えばサイレンシング)によって抑制される(例えばサイレンシングされる)。この多機能編集システムの利点は、同時に編集される遺伝子の間に相互転座がなく、したがって多重遺伝子編集の安全性が大きく改善されることである。さらに、そのような多機能編集アプローチの適用によって、逐次操作手順を必要とせずに直交編集を1つのステップで実施することが可能になり、それにより、製品の製造が大幅に容易になり、付随するコスト及び細胞毒性が低減される。遺伝子編集のために選択される標的遺伝子は、外因性発現カセットの挿入のための標的部位としても用いられる。

【0111】

ETMは、プログラム可能なマルチエディター(ProME)とも称される。例えば、gRNAの設計により、同一細胞内の多数の標的の転写、発現、及び/又は活性を改変するようにETMをプログラムすることが可能になる。ETM(例えばETR)は、少なくとも1つのエフェクタードメイン(例えばKRABドメイン、SETDB1ドメイン、DNMT3Aドメイン、DNMT3B若しくはDNMT1ドメイン、又はDNMT3Lドメイン、又はそれらのホモログ。なおドメインは完全長のタンパク質又はそれらの機能性断片であってよく、本明細書でそれぞれ「KRAB」、「SETDB1」、「DNMT3A」、「DNMT3B」、「DNMT1」、又は「DNMT3L」と称される)に作動可能に連結された少なくとも1つ(例えば1つ)のエンドヌクレアーゼからなるキメラタンパク質又は融合タンパク質であってよい。エンドヌクレアーゼは特定のDNA配列の切断を可能にし、選択した核酸配列に結合するように選択又は操作してよい。後成的エフェクタードメインは、標的遺伝子の転写の改変(例えば抑制)を可能にする触媒活性を有してよい。或いは又はさらに、エフェクタードメインは、標的遺伝子の転写の改変(例えば抑制)をもたらす細胞内のさらなる薬剤を標的遺伝子に動員してもよい。本発明は、操作された転写アクチベーター(ETA)であるETMも予想している。ETAは標的遺伝子の転写及び/又は発現を増大させ得る。

10

【0112】

「作動可能に連結された」は、個別の成分が、それらの機能(例えばDNAの切断、DNAへの結合、反応の触媒、又は細胞内部からのさらなる薬剤の動員)を実質的に妨害されずに発揮することを可能にするように相互に連結されることであると理解されたい。例えば、エンドヌクレアーゼを後成的エフェクタードメインとコンジュゲートさせて、例えば融合タンパク質を形成させることができる。ポリペプチドをコンジュゲートする方法は当技術で既知であり、例えばポリペプチドを連結するリンカーアミノ酸配列(例えばグリシン及び/又はセリン残基を含むリンカー)の提供によってよい。ポリペプチドをコンジュゲートする当技術で既知の代替の方法には、化学又は光で誘起されるコンジュゲーション法(例えば化学的架橋剤を用いる)が含まれる。例として、エンドヌクレアーゼと、ETMの後成的エフェクタードメイン(例えばKRABドメイン、DNMT3A、DNMT3B、若しくはDNMT1ドメイン、又はDNMT3Lドメイン、又はそれらのホモログ)は、融合タンパク質を形成する。

20

【0113】

一態様では、ETM(例えばETR)はRNA結合ドメインを含む。RNA結合ドメインは、ゲノム標的部位に相補的なgRNAに結合してよい。即ち、RNA結合ドメインは、ETM(例えばETR)に標的遺伝子を標的とさせてよい。

30

【0114】

一態様では、ETM(例えばETR)は、a)少なくとも1つの後成的エフェクタードメイン、及びb)エンドヌクレアーゼを含む融合タンパク質である。

【0115】

一部の態様では、ETM(例えばETR)は二分割の融合タンパク質である。例えば、ETM(例えばETR)は、同一のエンドヌクレアーゼと融合した2つのエフェクタードメインを含んでよい。

40

【0116】

一部の態様では、ETM(例えばETR)は三分割融合体である。例えば、ETM(例えばETR)は、同一のエンドヌクレアーゼと融合した3つのエフェクタードメインを含んでよい。

【0117】

一部の態様では、ETM(例えばETR)は、同一のエンドヌクレアーゼと融合した4つ又は5つ又は6つ又はそれ以上のエフェクタードメインを含んでよい。

【0118】

好適には、ETM(例えばETR)が多数のエフェクタードメインを含む場合には、エフェクタードメインは異なってよい。好適には、ETM(例えばETR)が多数のエフェクタードメインを含む場合には、エフェクタードメインは同一でよい。

50

【0119】

一態様では、本発明によるETM(例えばETR)は、Cas9-KRAB、Cas9-DNMT3A、又はCas9-DNMT3L融合タンパク質を含むか、それらからなる。

【0120】

好適には、本発明によるETM(例えばETR)は、エンドヌクレアーゼ、KRAB、及びDNMT3Aドメインを含むか、それらからなる融合タンパク質であってよい。好適には、本発明によるETM(例えばETR)は、エンドヌクレアーゼ、DNMT3L、及びDNMT3Aドメインを含むか、それらからなる融合タンパク質であってよい。好適には、本発明によるETM(例えばETR)は、エンドヌクレアーゼ、DNMT3L、及びKRABドメインを含むか、それらからなる融合タンパク質であってよい。好適には、本発明によるETM(例えばETR)は、エンドヌクレアーゼ、DNMT3L、KRAB、及びDNMT3Aドメインを含むか、それらからなる融合タンパク質であってよい。

10

【0121】

好適には、本発明によるETM(例えばETR)は、Cas(例えばCas9)、KRAB、及びDNMT3Aドメインを含むか、それらからなる融合タンパク質であってよい。好適には、本発明によるETM(例えばETR)は、Cas(例えばCas9)、DNMT3L、及びDNMT3Aドメインを含むか、それらからなる融合タンパク質であってよい。好適には、本発明によるETM(例えばETR)は、Cas(例えばCas9)、DNMT3L、及びKRABドメインを含むか、それらからなる融合タンパク質であってよい。好適には、本発明によるETM(例えばETR)は、Cas(例えばCas9)、DNMT3L、KRAB、及びDNMT3Aドメインを含むか、それらからなる融合タンパク質であってよい。

20

【0122】

一態様では、ETM(例えばETR)は、エンドヌクレアーゼ-KRAB融合タンパク質、例えばCas-KRAB、例えばCas9-KRABドメイン融合タンパク質を含むか、それらからなる。

【0123】

KRABドメインを含む本発明によるETM(ETM-KRAB)の例示的な配列を、以下の配列番号18で説明する。

30

40

50

【化 1】

MYPYDVPDYASPKKKRKVEASDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSPKKFKVLGNTDRHS
IKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEES
FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRG
HFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLF
LAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPKEYKEIFF
DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPA
FLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKI
IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRL
SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI
ANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEE
GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLK
DDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSE
LDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF
YKVBREINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATA
KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIIVK
KTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLK
SVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGEL
QKGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVIL
ADANLDKVLSAYNKHDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLD
ATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGDSRADPKKKRKVGSGGGALSPQHSQSAVTQGSIIKNKEGMD
AKSLTAWSRTLVTFKDVFDFTREEWKLLDQAQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVIL
RLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV (配列番号 18)

10

20

30

【0124】

上記の配列において、Cas9ドメインをイタリックで示し、ヘマグルチニン(HA)タグを太字で示し、リンカードメインを太字及び二重下線で示し、KRABドメインをイタリック及び下線で示す。核局在化シグナル(NLS)配列を枠で囲んでいる。

40

【0125】

本発明によるETMにおいて、これらの例示的なETMで示されたHAタグ及びグリシン-セリンリンカーの代替が使用できるか、これらはなくてもよいことが認識されよう。

【0126】

一態様では、ETM(例えばETR)は、エンドヌクレアーゼ-DNMT3A融合タンパク質、例えばCas-DNMT3A、例えばCas9-DNMT3Aドメイン融合タンパク質を含むか、それらからなる。

【0127】

50

DNMT3Aドメインを含む本発明によるETM(ETM-D3A)の例示的な配列を、下の配列番号19で説明する。

【化2-1】

MYPYDVPDYASPKKKRKVEASDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHS
IKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEES
FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRG
HFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLF
LAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFF
DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEENVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPA
FLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKI
IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRL
SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI
ANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEE
GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLK
DDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSE
LDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDKVYDVRKMIKSEQEIGKATA
KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIIVK
KTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLK
SVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGEL
QKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVIL
ADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLD
ATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGDSRADPKKKRKVGSGGGTYGLLRREDWPSRLQMFFANN

10

20

30

【化2-2】

HDQEFDPKVPYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVKDLGIQVDRIYASEVCEDSITVGM
VRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYR
LLHDARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLSNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNL
PGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFPVFMNEKEDILW
CTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACV

(配列番号

19)

40

【0128】

上記の配列において、Cas9ドメインをイタリックで示し、HAタグを太字で示し、リ

50

ンカードメインを太字及び二重下線で示し、DNMT3Aドメインをイタリック及び下線で示す。NLS配列を枠で囲んでいる。

【0129】

一態様では、ETM(例えばETR)は、エンドヌクレアーゼ-DNMT3L融合タンパク質、例えばCas-DNMT3L、例えばCas9-DNMT3Lドメイン融合タンパク質を含むか、それらからなる。

【0130】

DNMT3Lドメインを含む本発明によるETM(ETM-D3L)の例示的な配列を、下の配列番号20で説明する。

【化3-1】

MYPYDVDPDYASPKKKRKVEASDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHS
IKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRKKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEES
FLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRG
HFLIEGDLNPDNSDVKLF IQLVQTYNQ LFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLI ALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLF
LAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFF
DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPA
FLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKI
IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRL
SRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI
ANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEE
GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLK
DDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSE
LDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQF
YKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATA
KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVK
KTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLK

10

20

30

40

50

【化 3 - 2】

SVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFLENGRKRMLASAGEL
 QKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRUIL
 ADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLD
 ATLIHQSI TGLYETRIDL SQLGGDSRAD PKKKRKV GSGGGMAAIPALDPEAEPSMDVILVGS
 SELSSSVSPGTGRDLIAYEVKANQRNIEDICICCGSLQVHTQHPLFEGGICAPCKDKFLDAL
 FLYDDDDGYQSYCSICCSGETLLICGNPDCTRCYCFECVDSL VGPGTSGKVVHAMSNNWVCYLCL
 PSSRSGLLQRRRKWRSQ LKAFYDRESENPLEMFETVPVWRRQPVRVLSL FEDIKKELTSLGF
 LESGSDPGQLKHVVVDVTD TVRKDV EEWGPF DLVYGATPPLGHTCDRPPSWYLFQ FHRLLQYA
 RPKPGSPRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFLEMEPVTIPDVHGGSLQNAV RVWSNIPAIRS
 RHWALVSEEELSLLAQNKQSSKLA AKWPTKLVKNCFLPLREYFKYFSTELTSSL (配列番号

10

20)

【0131】

Cas9ドメインをイタリックで示し、HAタグを太字で示し、リンカードメインを太字及び二重下線で示し、DNMT3Lドメインをイタリック及び下線で示す。NLS配列を枠で囲んでいる。

20

【0132】

融合タンパク質は、例えば配列番号18、19、20、4481、又は4482と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでよく、例えばアミノ酸配列は、配列番号18、19、20、4481、又は4482によって表されるタンパク質の天然の機能を実質的に保持している。

【0133】

融合タンパク質は、例えば配列番号18、19、20、4481、若しくは4482のタンパク質又は配列番号18、19、20、4481、若しくは4482と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくは100%のアミノ酸同一性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされ、例えばアミノ酸配列は、それぞれ配列番号18、19、20、4481、又は4482によって表されるタンパク質の天然の機能を実質的に保持している。コード配列は、ヒト細胞内での最適の発現のためにコドン最適化され得る。

30

【0134】

後成的エフェクタードメイン

用語「後成的（エピジェネティック）エフェクタードメイン」は、例えばDNA又はクロマチンにおける反応（例えばDNAのメチル化）を触媒することによって、又は細胞内からさらなる薬剤を動員することによって、標的遺伝子に後成的効果を提供し、例えば遺伝子の転写の抑制をもたらすETMの一部を意味すると理解されたい。

40

【0135】

「ドメイン」は本文脈において、ある種の機能を有するETMの一部を意味すると理解されたい。ドメインは天然のタンパク質から単離された個別のドメイン（例えば触媒ドメイン）であってよく、又は完全長の天然のタンパク質全体であってよい。換言すれば、完全長のタンパク質又はその機能性断片を、エフェクタードメインとして用いることができる。したがって、例えば「Kruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン」又は「KRABドメイン」は、KRABドメインの機能を有するアミノ酸配列を含むETMの一部を意味する。

【0136】

内因性レトロウイルス(ERV; Feschotte, C. et al. (2012) Nat. Rev. Genet. 1

50

3: 283-96; Leung, D.C. et al. (2012) Trends Biochem. Sci. 37: 127-33)の永久的な後成的サイレンシングに關与していることが知られているクロマチンリモデリング酵素は、本發明における利用のための好適なエフェクタードメインを提供し得る。

【0137】

一態様では、後成的エフェクタードメインは、少なくとも1つの標的遺伝子の転写及び/又は発現を抑制することができる。遺伝子の転写を抑制することができる因子は、転写リプレッサーとも称される。一態様では、後成的エフェクタードメインはリプレッサードメイン、例えば転写リプレッサードメインである。

【0138】

一態様では、後成的エフェクタードメインは、クロマチンの化学的改変及び/又はクロマチンのリモデリングを開始する。

【0139】

一態様では、後成的エフェクタードメインは、DNAの改変、例えばDNAのメチル化を開始する。一態様では、後成的エフェクタードメインはDNAメチルトランスフェラーゼであり、及び/又はDNAメチルトランスフェラーゼを動員することができる。

【0140】

一態様では、後成的エフェクタードメインはヒストンの改変、例えばヒストンのメチル化又はヒストンのアセチル化を開始する。一態様では、後成的エフェクタードメインはヒストンメチルトランスフェラーゼ又はヒストンアセチルトランスフェラーゼである。

【0141】

一態様では、少なくとも1つの後成的エフェクタードメインは、Kruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)ドメイン、DNMT様ドメイン、又はヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)ドメインを含む。

【0142】

一態様では、少なくとも1つの後成的エフェクタードメインは、抗体又はその誘導体、例えばナノボディであり、これは後成的レギュレーター、例えばクロマチンを化学的に改変し及び/又はクロマチンをリモデリングし得るクロマチンレギュレーターに結合する。

【0143】

例えばVan et al., Nat Commun. 2021 Jan 22;12(1)537を参照されたい。これは遺伝子発現及び後成的記憶のナノボディ媒介制御を記載している。

【0144】

KRAB

一部の態様では、少なくとも1つの後成的エフェクタードメインはKRABドメインを含む。Kruppel関連ボックスを含むジンクフィンガータンパク質(KRAB-ZFP; Huntley, S. et al. (2006) Genome Res. 16: 669-77)のファミリーは、内因性レトロウイルスのサイレンシングにおいて重要な役割を果たしている。これらの転写因子はそのZFP DNA結合ドメインを通して特定のERV配列に結合し、これらはその保存されたKRABドメインを有するKRAB関連タンパク質1(KAP1)を動員する。KAP1は次に、抑制的クロマチンの局所形成を促進する多数のエフェクターに結合する(Iyengar, S. et al. (2011) J. Biol. Chem. 286: 26267-76)。

【0145】

本發明のETMは、例えばKRABドメインを含む。KRAB-ZFPタンパク質のファミリーの中で種々のKRABドメインが知られている。例えば、本發明のETMは、ヒトジンクフィンガータンパク質10 (ZNF10; Szulc, J. et al. (2006) Nat. Methods 3: 109-16)のKRABドメインを含む：

【化4】

ALSPQHSAVTQGSIIKNKEGMDAKSLTAWSRITLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQI
VYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIK
SSV (配列番号1)

10

20

30

40

50

【0146】

本発明における使用に適したKRABドメインのさらなる例には、

【化5】

MNNSQGRVTFEDVTVNFTQGEWQRLNPEQRNLYRDVMLENYSNLVSVGQGETTKPDV
ILRLEQGKEPWLEEEVVLGSGRAEKNGDIGGQIWKPKDVKESL

(ヒトZIM3タンパク質のKRABドメイン;配列番号2)

【化6】

ITLEDVAVDFTWEEWQLLGAAQKDLYRDVMLENYSNLVAVGYQASKPDALFKLEQGE
QLWTIEDGIIHSGACS

10

(ZNF350タンパク質のKRABドメイン;配列番号3)

【化7】

VMFEEVSVCFITSEEWACLGPIQRALYWDVMLENYGNVTSLEWETMTENEEVTSKPSS
SQRADSHKGTSKRLQG

(ZNF197タンパク質のKRABドメイン;配列番号4)

【化8】

VSFKDVAVDFTQEEWQQLDPDEKITRVDVMLENYSNLSVSGYDTTKPNVLIKLEQGE
EPWIMGGFPCQHSP

20

(RBAKタンパク質のKRABドメイン;配列番号5)

【化9】

VKIEDMAVSLILEEWGCQNLARRNLSRDNRQENYGSAFPQGGENRNENEESTSKAET
SEDSASRGETTGRSQKE

30

(ZKSCAN1タンパク質のKRABドメイン;配列番号6)

【化10】

LTFKDVFDFTLEEWQQLDSAQKNLYRDVMLENYSNLSVSGYLVAKPDVIFRLGPGE
ESWMADGGTPVRTCA

(KRBOX4タンパク質のKRABドメイン;配列番号7)

【化11】

VTFEDVTLGFTPEEWGLLDLKQKSLYREVMLENYRNLSVVEHQLSKPDVVSQLEAE
DFWPVERGIPQDTIP

40

(ZNF274タンパク質のKRABドメイン;配列番号8)

が含まれる。

【0147】

上記のKRABドメインは一例に過ぎない。その機能性バリエーションも本明細書で意図されている。例えば、配列番号4481及び4482(以下の実施例3及び4を参照)で示されるZIM3 KRABドメインも使用できる。そのZIM3 KRABドメインは以下の配列を有する。

50

【化 1 2】

MGRVTFEDVTVNFTQGEWQRLNPEQRNLYRDVMLENYSNLVSVGQGETTKPDVILRL
EQGKEPWLEEEVLGSGRAEKNGDIGGQIWPKDVKESL (配列番号 4637)

【0 1 4 8】

DNMT

一部の態様では、後成的エフェクタードメインはDNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)ドメインを含む。DNMTはDNAへのメチル基の転移を触媒する。DNMTの例には、DNMT1、DNMT3A、及びDNMT3Bがある。

10

【0 1 4 9】

本発明のETMは、例えばヒトDNAメチルトランスフェラーゼ3A(DNMT3A; Law, J. A. et al. (2010) Nat. Rev. Genet. 11: 204-20)のドメイン、例えば触媒ドメインを含み得る。例えば、本発明のETMは、配列:

【化 1 3】

TYGLRRREDWPSRLQMFFANNHDQEFDPKVPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGL
LVLKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLV
IGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLDHARPKEGDDRPFFWL FENVVAM
GVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQEC
LEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYT
DVSNM SRLARQRL LGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACV

20

(ヒトDNMT3Aの触媒ドメイン;配列番号9)を含み得る。

【0 1 5 0】

DNAメチルトランスフェラーゼ3B及び1(DNMT3B及びDNMT1)は、DNMT3Aと同様に、DNAメチル化の堆積及び維持にも関与しており、本発明のETMにおいても用いられる。例えば、本発明のETMは、配列:

【化 1 4】

CHGVLRRRKDWNVRLQAFFTSDTGLEYEAPKLYPAIPAARRRPIRVLSLFDGIATGY
LVLKELGIKVGKYVASEVCEESIAGTVKHGNIKYVNDVRNITKKNIEEWGPFDLV
IGGSPCNDLSNVNPARKGLYEGTGRLFFEFYHLLNYSRPKEGDDRPFFWMFENVVAM
KVGDKRDISRFLECNPVMIDAIKVSAHRARYFWGNLPGMNRPVIA SKNDKLELQDC
LEYNRIAKLKKVQTITTKSNSIKQGNQLFPVVMNGKEDVLWCTELERIFGFPVHYT
DVSNMGRGARQKLLGRSWSVPVIRHLFAPLKDYFACE

30

(ヒトDNMT3Bの触媒ドメイン;配列番号10)

40

50

【化 1 5】

MVAELISEEDLEFMKGDTRHLNGEEDAGGREDASILVNGACSDQSSDSPPILEAIRTP
EIRGRSSSSRLSKREVSSLLSYTQDLTGDDGEDGDGSDTPVMPKLFRETRTRSESP
AVRTRNNNSVSSRERHRPSRSTRGRQGRNHVDESPVEFPATRSLRRRATASAGTPW
PSPSSSYLTIDLTDDTEDTHGTPQSSSTPYARLAQDSQQGGMESPQVEADSGDGDSS
EYQDGKEFGIGDLVWGKIKGFSWWPAMVVSWKATSKRQAMSGMRWVQWFGDGKFSEV
SADKLVALGLFSQHFNLATFNKLVSIRKAMYHALEKARVRAGKTFPSSPGDSLEDQL
KPMLEWAHGGFKPTGIEGLKPNNTQOPENKTRRRRTADDSATSDYCPAPKRLKTNCYNN
GKDRGDEDQSREQMASDVANNKSSLEDGCLSCGRKNPVSFHPLFEGGLCQTCRDRFL
ELFYMYDDDGYQSYCTVCCEGRELLCSNTSCCRFCFVECLEVLVGTGTAAEAKLQE
PWSCYMCLPQRCHGVLRRRKDWNVRLQAFFTSDTGLEYEAPKLYPAIPAARRRPIRV
LSLFDGIATGYLVKLKELGIKVGKYVASEVCEESIAGVTVKHEGNIKYVNDVRNITKK
NIEEWGPFDLVIGGSPCNDLSNVNPARKGLYEGTGRLFFEFYHLLNYSRPKEGDDRP
FFWMFENVVAMKVGDKRDISRFLECNPMIDAIVSAAHRARYFWGNLPGMNRPVIA
SKNDKLELQDCLEYNRIAKLKKVQTITTKSNSIKQGKNQLFPVVMNGKEDVLWCTEL
ERIFGFPVHYTDVSNMGRGARQKLLGRSWSVPVIRHLFAPLKDYFACE

10

(ヒトDNMT3B:配列番号11)

【化 1 6】

LRTLDVFSGCGGLSEGFHQAGISDTLWAIEMWDPAAQAFRLNNPGSTVFTEDCNILL
KLVMAGETTNSRGQRLPQKGDVEMLCGGPPCQGFGSMNRFNSRTYSKFKNSLVVSFL
SYCDYYRPRFFLLENVRNFVSFKRSMVLKLTLRCLVRMGYQCTFGVLQAGQYGVAQT
RRRAIILAAAPGEKLPLFPEPLHVFAPRACQLSVVDDKKFVSNITRLSSGPFRTIT
VRDTMSDLPEVRNGASALEISYNGEPQSWFQRQLRGAQYQPILRDHICKDMSALVAA
RMRHIPLAPGSDWRDLNIEVRLSDGTMARKLRYTHHDRKNRSGSSGALRGVCSCVE
AGKACDPAARQFNTLIPWCLPHTGNRHNHWAGLYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQG
RVLHPEQHRVSVRECARSQGFDPDYLFGNILDKHRQVGNAVPPPLAKAIGLEIKL
CMLAKARESASAKIKEEEAAKD

20

(ヒトDNMT1の触媒ドメイン;配列番号12)

のいずれかを含み得る。

30

【0151】

DNMT様

一部の態様では、後成的エフェクタードメインはDNMT様ドメインであってよい。「DNMT様」ドメインは、DNMTファミリーのメンバーであるがDNAメチル化活性を保有していないタンパク質又はその機能性断片を意味する。DNMT様タンパク質は、典型的には他の後成的エフェクタードメインを活性化又は動員する。

【0152】

本発明のETMは、例えばDNA(シトシン-5)-メチルトランスフェラーゼ3様(DNMT3L)、即ちその触媒ドメインに結合することによってDNMT3Aを活性化する触媒的に不活性のDNAメチルトランスフェラーゼを含み得る。例えば、本発明のETMは、配列:

40

【化 1 7】

MAAIPALDPEAEPSMDVILVGSSELSSSVSPGTGRDLIAYEVKANQRNIEDICICCG
SLQVHTQHPLFEGGICAPCKDKFLDALFLYDDDGYQSYCSICCSGETLLICGNPDCT
RCYCFECVDSLVGPGTSGKVHAMSNNWVCYLCLPSSRSGLLQRRRKWRSQKAFYDRE
SENPLEMFETVPVWRRQPVRLSLFEDIKKELTSLGFLESGSDPGQLKHVVVDVTDTV
RKDVEEWGPFDLVYGATPPLGHTCDRPPSWYLFQFHRLQYARPKPGSPRPFFWMFV
DNLVLNKEDLDVASRFLEMEPVTIPDVHGGSLQNAVVRVWSNIPAIRSRHWALVSEEE
LSLLAQNKQSSKLAAKWPTKLVKNCFLPLREYFKYFSTELTSSL

(ヒトDNMT3L;配列番号13)を含み得る。

50

【0153】

HMT

一部の態様では、後成的エフェクタードメインはヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)ドメイン、例えば触媒ドメインであってよい。HMTは、ヒストンタンパク質のリシン及びアルギニン残基へのメチル基の転移を触媒するヒストン改変酵素である。

【0154】

リシン特異的HMTは、SET(Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax)ドメインを含んでもよく、SETドメインを含まなくてもよい。

【0155】

HMTの例には、分岐SETドメイン1(SETDB1)がある。

10

【0156】

早期の胚の発達において、KAP1は、転写抑制に関連する2つのヒストンマークであるヒストンH3リシン-9ジ-及びトリ-メチル化(それぞれH3K9me2及びH3K9me3)を堆積させるヒストンメチルトランスフェラーゼであるSETDB1を動員することが知られている。同時に、KAP1はヘテロクロマチンタンパク質1アルファ(HP1 α)に結合し、これはH3K9me2及びH3K9me3と読まれ、KAP1含有複合体を安定化する。KAP1は、他の周知の後成的サイレンサー、例えばヒストンH3 リシン-4メチル化を除去することによって転写を阻害するリシン特異的ヒストンデメチラーゼ1(LSD1)、並びにヒストンからアセチル基を除去するヌクレオソームリモデリング及びデアセチラーゼ複合体(NURD)と相互作用することもできる。最後に、KAP1含有複合体は、シトシンをCpG部位でメチル化するデノボDNAメチルトランスフェラーゼ3A(DNMT3A)の動員に寄与する(Jones, P. A. (2012) Nat. Rev. Genet. 13: 484-92)。併せて、これらのデータは、着床前の胚においてKAP1複合体がヒストン改変酵素とDNAのメチル化との協奏作用によってERVのサイレンシングを保証するというモデルを示唆している。次いで着床後に、既にKRAB-ZFPによってERVに対して標的化されたDNAのメチル化が安定化され(Reik, W. (2007) Nature 447: 425-32)、ERV特異的KRAB-ZFPの連続的な発現を必要とせずに、有糸分裂及び体細胞の分化の全体に受け継がれる。胚性幹細胞の場合と異なり、KAP1複合体は体細胞においてはDNAのメチル化を効率的に誘起することができず、H3K9メチル化を堆積させることができるのみである。しかし、このヒストンマークは、KRAB-ZFPによる標的部位での連続的な堆積なしには維持されない(Hathaway, N.A. et al. (2012) Cell 149: 1447-60)。

20

30

【0157】

一部の態様では、少なくとも2つの後成的エフェクタードメインは、一方が例えばKRABドメイン(例えば胚性幹細胞内のERVで生じる後成的カスケードのイニシエーター)に基づき、他方が例えばDNMT3A(例えばこのプロセスの最終のロック)に基づいて、利用され得る。このアプローチにより、予め選択された標的遺伝子の上で、着床前の胚のERVで確立され、哺乳動物の発達及び成体の生涯にわたって永久的に受け継がれる抑制的なクロマチン状態を反復することが可能になる。

【0158】

本発明のETMは、例えばSETDB1ドメインを含んでよい。例えば、本発明のETMは、配列:

40

【化 18 - 1】

MSSLPGCIGLDAATATVESEEEIAELQQAVVEELGISMEELRHFIDEELEKMDCVQQR
KKQLAELETWVIQKESEVAHVVDQLFDDASRAVTNCESLVKDFYSKLGGLQYRDSSSED
ESSRPTEIEIEIPDEDDDDVLSIDSGDAGSRTPKDQKLREAMAALRKSAQDVQKFMDAV
NKKSSSQDLHKGTLTSLMSGELSKDGDILVSMRILGKKRTKTWHKGTLIAIQTVGPGK
KYKVKFDNKGKSLLSGNHIAIDYHPPADKLYVGSRVVAKYKDGNOVWLYAGIVAETP
NVKNKLRFLIFFDDGYASYVTQSELYPICRPLKKTWEDIEDISCRDFIEEYVTAYPN
RPMVLLKSGQLIKTEWEGTWKSRVEEVDGSLVRILFLDDKRCEWIYRGSTRLEPMF
SMKTSSASALEKKQGQLRTRPNMGAVRSKGPVVQYTQDLTGTGTQFKPVEPPQPTAP
PAPPFPAPPPLSPQAGDSDLESQLAQSRKQVAKKSTSFRPGSVGSGHSSPTSPALSE
NVSGGKPGINQTYRSPLGSTASAPAPSALPAPPAPPVFGMLERAPAEPSPYRAPMEK
LFYLPVCSYTCLSRVRPMRNEQYRGKNPLLVPLLYDFRMTARRRVNRKMGFHVIIY
KTPCGLCLRTMQEIERYLFTGCDLFLFLEMFCCLDPYVLVDRKFQPYKPFYIILDITY
GKEDVPLSCVNEIDTTPPPQVAYSERIPGKGVFINTGPEFLVGCDCCKDGCRDKSKC
ACHQLTIQATACTPGGQINPNSGYQYKRLEECLPTGVYECNKRCCKCDPNMCTNRLVQ
HGLQVRLQLFKTQNKGWGIRCLDDIAKGSFVCIYAGKILTDDFADKEGLEMGDEYFA
NLDHIESVENFKEGYESDAPCSDSSGVLDLKDQEDGNSGTEDPEESNDDSSDDNFCK
DEDFSTSSVWRSYATRRQTRGQKENGLESETTSKDSHPPDLGPPHIPVPPSIPVGGCN
PPSSEETPKNKVASWLSVSEGGFADSDSHSSFKTNEGGEGRAGGSRMEAEKAST
SGLGIKDEGDIKQAKKEDTDDRNMKSVVTESSRNYGYNPSPVKPEGLRRPPSKTSMH
QSRRLMASAQSNPDDVLTLSSTESEGESGTSRKPTAGQTSATAVDSDDIQTISSGS

10

20

【化 18 - 2】

EGDDFEDKKNMTGPMKRQVAVKSTRGFALKSTHGIAIKSTNMASVDKGESAPVRKNT
RQFYDGEESCYIIDAKLEGNLGRYLNHSCSPNLVQNVFVDTHDLRFPWVAFFASKR
IRAGTELTWDYNYEVGSVEGKELLCCCGAIECRGRL

(ヒトSETDB1;配列番号14)

【化 19】

VGCDCKDGCRDKSKCACHQLTIQATACTPGGQINPNSGYQYKRLEECLPTGVYECNK
RCKCDPNMCTNRLVQHGLQVRLQLFKTQNKGWGIRCLDDIAKGSFVCIYAGKILTDD
FADKEGLEMGDEYFANLDHIESVENFKEGYESDAPCSDSSGVLDLKDQEDGNSGTED
PEESNDDSSDDNFCKDEDFSTSSVWRSYATRRQTRGQKENGLESETTSKDSHPPDLGP
PHIPVPPSIPVGGCNPPSSEETPKNKVASWLSVSEGGFADSDSHSSFKTNEGGE
GRAGGSRMEAEKASTSGLGIKDEGDIKQAKKEDTDDRNMKSVVTESSRNYGYNPSPV
KPEGLRRPPSKTSMHQSRRLMASAQSNPDDVLTLSSTESEGESGTSRKPTAGQTS
TAVDSDDIQTISSGSEDDFEDKKNMTGPMKRQVAVKSTRGFALKSTHGIAIKSTNM
ASVDKGESAPVRKNTQFYDGEESCYIIDAKLEGNLGRYLNHSCSPNLVQNVFVDTH
DLRFPWVAFFASKRIRAGTELTWDYNYEVGSVEGKELLCCCGAIECRGRL

30

40

(ヒトSETDB1の触媒ドメイン;配列番号15)

のいずれかを含んでよい。

【0159】

本発明のETMは、例えば配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでよく、例えばアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15によって表されるタンパク質の天然の機能を実質的に保持している。

【0160】

本発明のETMは、例えば配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、1

50

3、14、又は15のタンパク質、又は配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸の同一性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされ、例えばアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15によって表されるタンパク質の天然の機能を実質的に保持している。コード配列は、ヒト細胞内での最適の発現のためにコドン最適化され得る。

【0161】

本発明のETMは、例えば配列番号4637と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、例えばアミノ酸配列は配列番号4637によって表されるタンパク質の天然の機能を実質的に保持している。

10

【0162】

本発明のETMは、例えば配列番号4637のタンパク質又は配列番号4637と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸同一性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされ、例えばアミノ酸配列は配列番号4637によって表されるタンパク質の天然の機能を実質的に保持している。コード配列は、ヒト細胞内での最適の発現のためにコドン最適化され得る。

【0163】

20

エンドヌクレアーゼ

本発明のETM(例えばETR)は、エンドヌクレアーゼを含み得る。

【0164】

エンドヌクレアーゼは、例えば部位特異的であってよい。本明細書で使用される場合、「部位特異的エンドヌクレアーゼ」は、DNAの部位指向的二本鎖切断を誘起する酵素を意味し得る。部位特異的エンドヌクレアーゼは、ETM(例えばETR)がポリヌクレオチド、例えば細胞のゲノムの中の特定の部位への標的とされる活性を可能にする。例えば、エンドヌクレアーゼはgRNAと組み合わせて用いた場合に部位特異的であり、換言すれば、エンドヌクレアーゼはgRNAと組み合わせて用いた場合に部位特異的DNA切断を誘起することができる。

30

【0165】

一態様では、エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼ活性に加えて、エキソヌクレアーゼ活性を有する。

【0166】

エンドヌクレアーゼは、例えば標的遺伝子内又は標的遺伝子の制御配列、例えばプロモーター配列又はエンハンサー配列内の結合部位に結合し得る。

【0167】

エンドヌクレアーゼは、例えばスプライシング部位の中の結合部位に結合し得る。所与の遺伝子のスプライシングバリエーションは、スプライシング部位においてDNAのメチル化/脱メチル化によって制御され得る。続いて、これらの改変は、成熟した転写物において、エクソンの排除/包含を惹起し得る。この排除/包含は治療的関連性を有し得る。例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィーの場合には、最も高頻度の病変性変異を有するエクソンの成熟mRNAからの(遺伝子アブレーション又はエクソンスキッピングによる)排除が治療のために提案されている(Ousterout, D.G. et al. (2015) Mol. Ther. 23: 523-32; Ousterout, D.G. et al. (2015) Nat. Commun. 6: 6244; Kole, R. et al. (2015) Adv. Drug Deliv. Rev. 87: 104-7; Touznik, A. et al. (2014) Expert Opin. Biol. Ther. 14: 809-19)。

40

【0168】

いくつかの好適なエンドヌクレアーゼが当技術で既知である。例えば、CRISPR/Cas系(Sander, J.D. et al. (2014) Nat. Biotechnol. 32: 347-55)を、本発明のET

50

M(例えばETR)における好適なエンドヌクレアーゼとして採用してよい。

【0169】

「CRISPR/Cas系」は、クラスター化され規則的な間隔で配置された短い回文反復/CRISPRに関連するヌクレアーゼ系を意味する。

【0170】

「クラスター化され規則的な間隔で配置された短い回文反復」は、ウイルスゲノムに起源し、細菌のゲノムに組み込まれた短い配列からなる。CRISPR関連タンパク質(Cas)はこれらの配列を処理し、一致するウイルスDNA配列を切断する。Cas及び特別に構築したCRISPRを真核細胞に導入することによって、真核細胞のゲノムを任意の所望の位置で切断することができる。

【0171】

CRISPR/Cas系はRNA誘導DNA結合系(van der Oost et al. (2014) Nat. Rev. Microbiol. 12: 479-92)であり、ガイドRNA(gRNA)は、Casドメインを含むETM(例えばETR)に特定の配列を標的とさせることを可能にするように選択してよい。即ち、CRISPR/Cas系を本発明のエンドヌクレアーゼとして採用するため、後成的エフェクタードメインがCasエンドヌクレアーゼ、例えばCas9エンドヌクレアーゼに作動可能に連結されることを理解されたい。Casエンドヌクレアーゼを含むETM(例えばETR)が、1つ以上のgRNAと組み合わせて標的細胞に送達され得る。gRNAは、ETM(例えばETR)に目的の標的遺伝子又は標的遺伝子の制御エレメント(例えばプロモーター、エンハンサー、又はスプライシング部位)を標的とさせるように設計される。gRNAの設計の方法は当技術で既知である。さらに、完全に直交のCas9タンパク質、並びにCas9/gRNAリボヌクレオプロテイン複合体及び様々なタンパク質に結合するgRNAの構造/組成の改変が、様々なエフェクタードメインに細胞の所望のゲノム部位を同時かつ一方向的に標的とさせるために開発されており(Esvelt et al. (2013) Nat. Methods 10: 1116-21; Zetsche, B. et al. (2015) Cell pii: S0092-8674(15)01200-3; Zalatan, J.G. et al. (2015) Cell 160: 339-50; Paix, A. et al. (2015) Genetics 201: 47-54)、本発明における使用に好適である。

【0172】

一態様では、ETM(例えばETR)は、II型CRISPR細菌免疫系から誘導された少なくとも1つのエンドヌクレアーゼを含む。換言すれば、ET(例えばETR)はII型Casを含み得る。

【0173】

Cas II型酵素の例には、Cas9、Csn2、及びCas4が含まれる。

【0174】

Cas9エンドヌクレアーゼは、典型的にはRecI、RecII、ブリッジヘリックス、RuvC、HNH、及びPAM相互作用ドメインを含む。

【0175】

HNH及びRuvCドメインは、ヌクレアーゼドメインである。RecIDメインはgRNAに結合する。ブリッジヘリックスは標的DNAの結合に際して切断を開始する。PAM相互作用ドメインはPAM特異性を付与し、標的DNAへの結合の開始に関与する。

【0176】

エンドヌクレアーゼはCasエンドヌクレアーゼを含むか、それからなってよい。即ち、エンドヌクレアーゼはヌクレアーゼ活性を有し得る。例えば、エンドヌクレアーゼは触媒的に活性なヌクレアーゼであってよく、gRNAに結合し、標的DNAに結合する。

【0177】

本発明によるETM(例えばETR)に含まれるエンドヌクレアーゼは、触媒的に活性なエンドヌクレアーゼである。換言すれば、ETM(例えばETR)は、標的配列、例えば標的DNAを切断することができる。

【0178】

一態様では、エンドヌクレアーゼは触媒的に活性なCasヌクレアーゼである。

【0179】

一態様では、エンドヌクレアーゼは改変された又はバリエーションのエンドヌクレアーゼ、例えば改変されたCas又は改変されたCas9酵素である。例えば、酵素は標的遺伝子に好適な特定のPAM部位を認識するように改変されてよいことが理解されよう。改変されたPAMは、酵素によって天然に認識されるPAMとは異なってよい。

【0180】

一態様では、本発明によるETM(例えばETR)は、触媒的に不活性な、又は触媒的に死んだ(dCas)ヌクレアーゼのみを含まない。一態様では、本発明によるETM(例えばETR)は、触媒的に不活性な、又は触媒的に死んだ(dCas)ヌクレアーゼ、例えばdCas9を含まない。

10

【0181】

一態様では、エンドヌクレアーゼは触媒的に活性なCas9ヌクレアーゼである。

【0182】

一態様では、エンドヌクレアーゼは、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)由来の触媒的に活性なCas9ヌクレアーゼ(SpCas9)である。

【0183】

タンパク質が触媒的に活性なヌクレアーゼであるか否かを判定する方法は当技術で既知であり、例えばゲルアッセイ、Kunitzアッセイ、放射標識アッセイ、及び蛍光に基づく方法が用いられる。ゲルアッセイは、精製された組換え標的DNAをアッセイ緩衝液中の基質として用いて実施できる。試験すべきタンパク質を基質とともにインキュベートし、例えば37℃で1時間インキュベートしてよい。反応生成物は、例えばヌクレアーゼ反応の生成物を可視化するためのエチジウムブロマイドを添加したアガロースゲル上での電気泳動によって分離することができる。他の方法には、例えばSheppard, E.C., et al. *Sci Rep* 9, 8853 (2019)に報告されているDNA及びRNAのヌクレアーゼ活性の蛍光リアルタイム定量及びJ. Cox et al., *Chem Sci*, 2019 Mar 7; 10(9): 2653-2662に報告されているCasヌクレアーゼの無細胞検出が含まれる。

20

【0184】

例えば、本発明のETM(例えばETR)は、以下の触媒的に活性なCas9配列を含んでよい:

30

40

50

【化 20】

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGET
AEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHER
HPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG
DLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQL
PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQY
ADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLR
KQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLAR
GNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLL
YEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKK
IECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFED
REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS
DGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVK
VVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEH
PVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKV
LTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDK
AGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDF
QFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR
KVLSPQVNIVKKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAY
SVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKL
PKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQK
QLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKRVIADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHL
FTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDS

10

20

(配列番号16)

【0185】

本発明のETM(例えばETR)は、例えば配列番号16と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでよく、例えばアミノ酸配列は配列番号16で表されるタンパク質の天然の機能(例えばエンドヌクレアーゼ機能)を実質的に保持している。

30

【0186】

本発明のETM(例えばETR)は、例えば配列番号16のタンパク質又は配列番号16と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% or 100%のアミノ酸同一性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされてよく、例えばアミノ酸配列は配列番号16で表されるタンパク質の天然の機能を実質的に保持している。コード配列は、ヒト細胞内での最適の発現のためにコドン最適化され得る。

【0187】

比較のため、触媒的に死んだCas9(dCas9)の配列は、

40

【化 2 1】

DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGET
AEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHER
HPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEG
DLNPDNSDVKLF IQLVQTYNQ LFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQL
PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQY
ADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLR
KQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLAR
GNSRFAMWTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLL
YEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKK
IECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFED
REMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQSGKTILDFLKS
DGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVK
VVDELVKVMGRHKPENIVIMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEH
PVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKV
LTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDK
AGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDF
QFYKVBREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQ
EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR
KVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAY
SVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLI IKL
PKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGS PEDNEQK
QLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVI LADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENI IHL
FTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDS

10

20

30

40

50

(触媒的に死んだCas9; dCas9; 配列番号17)

である。

【0188】

上記の配列は、その触媒的に活性な(即ち、生きた)対応物(配列番号16)に対してD9A及びH839Aの置換を含む。触媒的に死んだCas9(例えば上記のdCas9)は、細胞内の別の遺伝子の同時の遺伝子編集なしに、1つ以上の標的遺伝子の後成的編集のためのETMで用いられる。この使用のため、ETM(例えばETR)は、例えば配列番号17と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでよく、例えばアミノ酸配列は、エンドヌクレアーゼ機能を除いて配列番号16で表されるタンパク質の天然の機能を実質的に保持している。ETM(例えばETR)は、例えば配列番号17のタンパク質又は配列番号17と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸同一性を有するタンパク質をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされてよく、例えばアミノ酸配列はエンドヌクレアーゼ機能を除いて配列番号16で表されるタンパク質の天然の機能を実質的に保持している。コード配列は、ヒト細胞内での最適の発現のためにコドン最適化され得る。

【0189】

gRNA

一態様では、本発明はガイドRNA(gRNA)を提供する。

【0190】

gRNAは、ETM(例えばETR)に標的遺伝子を標的とさせる。gRNAは、例えば目的の標的DNA領域を認識し、ETM(例えばETR)内のエンドヌクレアーゼをその領域に指向させるRNA配列であってよい。

【0191】

gRNAは、典型的には2つの部分:

a) スペーサー配列(標的ドメイン、ガイド配列、又は相補性領域とも称され、CRISPR RNA(crRNA)を構成し得る);及び

b) スカフォールド配列(CRISPR/Cas系ではtracrRNAとも称される)。からなっている。

【0192】

スペーサー配列とスカフォールド配列は、例えば分離された分子として提供してもよく、又は例えばリンカーループ若しくは他の配列を介して連結されてもよく、互いに融合してもよい。

【0193】

例えば、gRNAは、2つの分離された分子、例えばスペーサー(crRNA)及びスカフォールド(tracrRNA)によって構成されてもよい。スペーサー(crRNA)の3'末端はスカフォールド(tracrRNA)の5'末端と相補的であってよく、この相補性が2つの分子の二量化をもたらし得る。

【0194】

別の例では、スペーサー(crRNA)とスカフォールド(tracrRNA)は、例えばリンカーループを介して融合してよい。この人工的な構成は、単一ガイドRNA(sgRNA)としても知られてよい。

【0195】

一部の態様では、スカフォールド(tracrRNA)のバリエーションが用いられ得る。例えば、スカフォールド(tracrRNA)配列のテトラループ及びステムループは、特定のタンパク質のドメインが結合することができるRNAアプタマーを含むように改変される。一部の態様では、タンパク質と相互作用するRNAアプタマーに融合した抑制又は活性化のドメインの動員を容易にするため、そのような改変gRNAを用いることができる。

【0196】

例示的なtracrRNA配列は、限定するものではないが、

【化22-1】

5'-GUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUA
GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU-3'

(配列番号4566), 及び

【化22-2】

5'-GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUA
UCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUU-3' (配列番号4567)

を含む。

【0197】

「スペーサー」又は「スペーサー配列」は、標的配列内の標的ドメイン(即ち領域)と完全に相補的であってよい配列を意味する。

【0198】

ゲノム標的配列の3'末端は、一般にプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列を含む。「PAM」配列は、典型的にはヌクレアーゼが標的とするDNA配列のすぐ後に続く2~6塩基対のDNA配列である。PAM配列は切断のために必要であるが、gRNA配列の標的の一部ではない。PAM配列は、ヌクレアーゼの種に応じて変動する。例えば、化膿性連鎖球菌のCas9ヌクレアーゼに関連するカノニカルPAMは配列 5'-NGG-3'であり、ここで「N」は任意の核酸塩基である。様々な生命体から誘導されたヌクレアーゼ酵素又は操作されたヌクレアーゼ酵素は、様々なPAM配列を認識し得る。

【0199】

例えば、フランシセラ・ノビシダ(Francisella novicida)のCas9はカノニカルPAM

10

20

30

40

50

配列 5'-NGG-3'を認識するが、5'-YG-3'を認識するように操作されており(ここで「Y」はピリミジンである)、したがって可能なCas9標的の範囲が追加されている。フランシセラ・ノビシダのCas12a(又はCpf1)ヌクレアーゼは、PAM 5'-TTTN-3'又は5'-YTN-3'を認識する。

【0200】

PAM配列の上流(標的配列の5'末端に向かう)のヌクレオチドは、プロトスペーサー配列である。

【0201】

Cas9ヌクレアーゼは、典型的にはPAMの上流のほぼ3塩基を切断することになる。

【0202】

PAMの特異性及びゲノムの標的に基づいて、特定の文脈の好適なヌクレアーゼが選択されることが理解されよう。

【0203】

「スカフォールド」又は「スカフォールド配列」は、エンドヌクレアーゼの結合、例えばCasの結合に必要な配列である。

【0204】

一態様では、本発明は単一ガイドRNA(sgRNA)を提供する。一態様では、本発明によるgRNAはsgRNAである。sgRNAは、スカフォールドtracrRNA配列に融合したcrRNA配列を含む単一のRNA分子である。本来は、crRNAとtracrRNAは2つの分離されたRNA分子として存在しているが、sgRNAが研究におけるCRISPR gRNAの一般的なフォーマットになっている。

【0205】

一態様では、gRNAは長さ10ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一態様では、gRNAは長さ11ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一態様では、gRNAは長さ12ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一態様では、gRNAは長さ13ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一態様では、gRNAは長さ14ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一態様では、gRNAは長さ15ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一態様では、gRNAは長さ16ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一態様では、gRNAは長さ17ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一態様では、gRNAは長さ18ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一態様では、gRNAは長さ19ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一態様では、gRNAは長さ20ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一態様では、gRNAは長さ21ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。

【0206】

理論に縛られることは望まないが、ETM(例えばETR)による遺伝子編集を誘起するためにある種のgRNA(例えば長さ約20ヌクレオチドのスペーサー配列を含むgRNA)が用いられる一方、短いスペーサー配列を含むgRNA(例えば長さ約16ヌクレオチドのスペーサー配列を含むgRNA)によって、ETM(例えばETR)によるエピサイレンシング等の後成的編集が有利になり得る。例えば図2を参照されたい。これは、長さ約18~20ヌクレオチドのスペーサー配列を含むgRNAがNHEJを誘起する一方、長さ約16ヌクレオチド以下のスペーサー配列を含むgRNAがNHEJを誘起しないことを示している。図3は、長さ約11~16ヌクレオチドのスペーサー配列を含むgRNAが、後成的改変、例えばB2Mのエピサイレンシングを誘起できることを示している。

【0207】

一部の実施形態では、gRNAは長さ15、16、又は17ヌクレオチド以下(例えば17又は16以下)のスペーサー配列を含む。一部の実施形態では、gRNAは長さ11~16ヌクレオチド、例えば長さ12~16、13~16、14~16、15~16、12~17、13~17、14~17、15~17、16、又は17ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。

【0208】

一部の実施形態では、gRNAは、長さ16、17、又は18以上(例えば17又は18以上)のヌクレオチド、例えば長さ18以上、又は19以上、又は20以上のヌクレオチドのスペー

10

20

30

40

50

サー配列を含む。一部の実施形態では、gRNAは、長さ17～30、例えば18～30、19～30、又は20～30ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一部の実施形態では、gRNAは、長さ17～25ヌクレオチド、例えば18～25、19～25、又は20～25ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。一部の実施形態では、gRNAは、長さ17～20ヌクレオチド、例えば長さ18～20又は19～20ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。

【0209】

本発明によるETMは、後成的編集及び遺伝子編集によって、同一細胞内の多数の標的遺伝子の転写、発現、及び/又は活性を改変(例えば転写及び/又は発現を抑制)することができる。

【0210】

本発明は、標的の遺伝子編集又は後成的編集を促進するgRNAの選択を可能にする。このようにして、多重化アプローチにおいて後成的編集を受けにくい遺伝子標的に対して遺伝子編集を実施し、一方同時に、後成的編集を受けやすい遺伝子を後成的に標的とるように選択することができる。

【0211】

一態様では、gRNAは標的の後成的編集を促進することができる。後成的編集は、当技術で既知の方法を用いて測定してよい。例えば、実施例2に記載したように、レポーター遺伝子の発現のレベルを、後成的編集のモデルとして測定してよい。

【0212】

一態様では、gRNAは標的の遺伝子編集を促進することができる。遺伝子編集は、当技術で既知の方法を用いて測定してよい。例えば、実施例1に記載したように、非相同末端結合のレベルを、遺伝子編集のモデルとして測定してよい。

【0213】

β2-ミクログロブリン(B2M)遺伝子の標的化における使用のためのgRNAによって認識されるゲノム標的部位(即ちプロトスペーサー及びPAM)の例示的な配列には、

【化23】

5'-AGGGTAGGAGAGACTCACGCTGG-3' (配列番号21)

|||||

3'-TCCCATCCTCTCTGAGTGCGACC-5' (配列番号22)

が含まれる。下線を付したヌクレオチドはPAMである。

【0214】

一態様では、本発明は、上の配列番号21又は配列番号22で説明されるβ2-ミクログロブリン遺伝子領域を標的とするgRNAを提供する。

【0215】

β2-ミクログロブリン遺伝子、特に上記の標的部位を標的とするgRNAにおいて用いられるスペーサー配列の例には、

【化24】

GAGGGUAGGAGAGACUCACGC -21-nt (配列番号23)

【化25】

AGGGUAGGAGAGACUCACGC -20-nt (配列番号24)

-このスペーサー配列はgRNAに組み込まれ、実施例2に示すようにETMと組み合わせて用いられる場合にはB2Mの遺伝子編集のために用いられる。

10

20

30

40

50

【化 2 6】

GGGUAGGAGAGACUCACGC -19-nt	(配列番号 25)
GGUAGGAGAGACUCACGC -18-nt	(配列番号 26)
GUAGGAGAGACUCACGC -17-nt	(配列番号 27)
UAGGAGAGACUCACGC -16-nt	(配列番号 28)
AGGAGAGACUCACGC -15-nt	(配列番号 29)
GGAGAGACUCACGC -14-nt	(配列番号 30)
GAGAGACUCACGC -13-nt	(配列番号 31)
AGAGACUCACGC -12-nt	(配列番号 32)
GAGACUCACGC -11-nt	(配列番号 33)
AGACUCACGC -10-nt	(配列番号 34)

10

が含まれる。

20

【0 2 1 6】

一部の態様では、スペーサー配列は5'末端に「G」ヌクレオチドを含む。この「G」は、例えば標的配列の一部でなくてよく、その発現を駆動するプロモーターがU6プロモーターである場合に必要となり得る。

【0 2 1 7】

例えば、配列番号23の5'末端の「G」は、本明細書でU6プロモーターからの発現を駆動するために用いられる。即ち、配列番号23におけるスペーサー配列がU6プロモーターによって駆動されなければ、5'末端の「G」は必要でなくてよいことが理解されよう。

【0 2 1 8】

一部の態様では、本発明によるスペーサー配列は、5'末端に「G」ヌクレオチドを含む。

30

【0 2 1 9】

本発明によるgRNAの例としては、

【化 2 7】

AGGGUAGGAGAGACUCACGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUA
AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
(配列番号 4479), 及び

AGGGUAGGAGAGACUCACGCGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA
GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号
4568),

40

があり、これらはスペーサー配列、配列番号24(上で下線を付す)を含む。

【0 2 2 0】

B2Mのエピサイレンシングのための代替のgRNAは、例えばAmabile et al.、上掲に見出すことができる。

【0 2 2 1】

50

例えば、本発明によるgRNAにおいて用いられる代替のスペーサー配列としては、
【化28】

GAGUAGCGCGAGCACAGCUA -20-nt (配列番号35)

がある。

【0222】

本発明によるgRNAの例としては、

【化29】

GAGUAGCGCGAGCACAGCUAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUA
AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU
(配列番号4480)、及び

10

GAGUAGCGCGAGCACAGCUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA
GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号
4569)。

があり、これらはスペーサー配列、配列番号35(上で下線を付す)を含む。

20

【0223】

本発明によるgRNAにおける使用に適した配列番号35に基づくトランケートされた（
切り取られた）スペーサー配列には、

【化30】

AGUAGCGCGAGCACAGCUA -19-nt (配列番号36)

GUAGCGCGAGCACAGCUA -18-nt (配列番号37)

UAGCGCGAGCACAGCUA -17-nt (配列番号38)

AGCGCGAGCACAGCUA -16-nt (配列番号39)

GCGCGAGCACAGCUA -15-nt (配列番号40)

CGCGAGCACAGCUA -14-nt (配列番号41)

GCGAGCACAGCUA -13-nt (配列番号42)

CGAGCACAGCUA -12-nt (配列番号43)

GAGCACAGCUA -11-nt (配列番号44)

AGCACAGCUA -10-nt (配列番号45)

30

40

が含まれる。

【0224】

本発明によるgRNAにおいて用いられる別のスペーサー配列(H8)としては、

【化31】

CAUCGGCGCCCUCCGAUCUG -20-nt (配列番号2780)

がある。

50

このスペーサー(下線を付す)を有するgRNAの例としては、

【化32】

CAUCGGCGCCCUCCGAUCUGGUUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUA
AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
(配列番号 4483), 及び

CAUCGGCGCCCUCCGAUCUGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA
GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUU (配列番号
4570) .

10

がある。本発明によるgRNAにおける使用に適した配列番号2780に基づく切り取られた
スペーサー配列には、

【化33】

AUCGGCGCCCUCCGAUCUG -19-nt	(配列番号 4484)
UCGGCGCCCUCCGAUCUG -18-nt	(配列番号 4485)
CGGGCGCCCUCCGAUCUG -17-nt	(配列番号 4486)
GGCGCCCUCCGAUCUG -16-nt	(配列番号 4487)
GCGCCCUCCGAUCUG -15-nt	(配列番号 4488)
CGCCCUCCGAUCUG -14-nt	(配列番号 4489)
GCCCUCCGAUCUG -13-nt	(配列番号 4490)
CCCUCCGAUCUG -12-nt	(配列番号 4491)
CCUCCGAUCUG -11-nt	(配列番号 4492)
CUCCGAUCUG -10-nt	(配列番号 4493)

20

30

が含まれる。

【0225】

本発明によるgRNAにおいて用いられる別のスペーサー配列(H10)としては、

【化34】

GCGGGCCACCAAGGAGAACU -20-nt (配列番号 2863)

40

がある。

このスペーサー(下線を付す)を有するgRNAの例としては、

【化35-1】

GCGGGCCACCAAGGAGAACUGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUA
AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
(配列番号 4494), 及び

50

【化 3 5 - 2】

CGGGGCCACCAAGGAGAACUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA
GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号
4571) .

がある。

本発明による gRNA における使用に適した配列番号 2863 に基づく切り取られたスペー
サー配列には、

【化 3 6】

CGGGGCCACCAAGGAGAACU -19-nt	(配列番号 4495)
GGGGGCCACCAAGGAGAACU -18-nt	(配列番号 4496)
GGCCACCAAGGAGAACU -17-nt	(配列番号 4497)
GCCACCAAGGAGAACU -16-nt	(配列番号 4498)
CCACCAAGGAGAACU -15-nt	(配列番号 4499)
CACCAAGGAGAACU -14-nt	(配列番号 4500)
ACCAAGGAGAACU -13-nt	(配列番号 4501)
CCAAGGAGAACU -12-nt	(配列番号 4502)
CAAGGAGAACU -11-nt	(配列番号 4503)
AAGGAGAACU -10-nt	(配列番号 4504)

10

20

が含まれる。

【0 2 2 6】

本発明による gRNA において用いられる別のスペーサー配列 (H11) としては、

【化 3 7】

CGAUAAGCGUCAGAGCGCCG -20-nt (配列番号 2778)

30

がある。このスペーサー (下線を付す) を有する gRNA の例としては、

【化 3 8】

CGAUAAGCGUCAGAGCGCCGGUUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUA
AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
(配列番号 4505) , 及び

40

CGAUAAGCGUCAGAGCGCCGGUUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA
GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号
4572) .

がある。本発明による gRNA における使用に適した配列番号 2778 に基づく切り取られた
スペーサー配列には、

50

【化 3 9】

GAUAAGCGUCAGAGCGCCG -19-nt	(配列番号 4506)
AUAAGCGUCAGAGCGCCG -18-nt	(配列番号 4507)
UAAGCGUCAGAGCGCCG -17-nt	(配列番号 4508)
AAGCGUCAGAGCGCCG -16-nt	(配列番号 4509)
AGCGUCAGAGCGCCG -15-nt	(配列番号 4510)
GCGUCAGAGCGCCG -14-nt	(配列番号 4511)
CGUCAGAGCGCCG -13-nt	(配列番号 4512)
GUCAGAGCGCCG -12-nt	(配列番号 4513)
UCAGAGCGCCG -11-nt	(配列番号 4514)
CAGAGCGCCG -10-nt	(配列番号 4515)

10

20

が含まれる。

【0 2 2 7】

本発明によるgRNAにおいて用いられる別のスペーサー配列(H12)としては、

【化 4 0】

GAACGCGUGGAGGGGCGCUU (配列番号 2801)

がある。このスペーサー(下線を付す)を有するgRNAの例としては、

【化 4 1】

GAACGCGUGGAGGGGCGCUUGUUUUAAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUA
AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
(配列番号 4516), 及び

30

GAACGCGUGGAGGGGCGCUUGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA
GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (配列番号
4573)。

がある。本発明によるgRNAにおける使用に適した配列番号2801に基づく切り取られた
スペーサー配列には、

40

50

【化 4 2 - 1】

AACGCGUGGAGGGGCGCUU -19-nt	(配列番号 4517)
ACGCGUGGAGGGGCGCUU -18-nt	(配列番号 4518)
CGCGUGGAGGGGCGCUU -17-nt	(配列番号 4519)
GCGUGGAGGGGCGCUU -16-nt	(配列番号 4520)
CGUGGAGGGGCGCUU -15-nt	(配列番号 4521)

10

【化 4 2 - 2】

GUGGAGGGGCGCUU -14-nt	(配列番号 4522)
UGGAGGGGCGCUU -13-nt	(配列番号 4523)
GGAGGGGCGCUU -12-nt	(配列番号 4524)
GAGGGGCGCUU -11-nt	(配列番号 4525)
AGGGGCGCUU -10-nt	(配列番号 4526)

20

が含まれる。

【0 2 2 8】

TRAC 遺伝子を標的とする gRNA における使用のためのスペーサー配列の例には、

【化 4 3】

AGAGUCUCUCAGCUGGUACA (配列番号 46).

が含まれる。

30

このスペーサー(下線を付す)を有する gRNA の例としては、

【化 4 4】

AGAGUCUCUCAGCUGGUACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUA

AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU

(配列番号 4574), 及び

AGAGUCUCUCAGCUGGUACAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA

GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

(配列番号

4575).

40

がある。

【0 2 2 9】

本開示は、スペーサー配列(下線を付す)の 5' 末端の例えば 1~9 (例えば 3~9)ヌクレオチドが短縮化された、上で例示した gRNA の変形も提供する。本開示は、本明細書に記載したスペーサー(完全長又は切り取られたバージョン)が上で例示した tracrRNA (上記 gRNA の一部、例えば配列番号 4574 及び 4575、これらは下線を付していない)に連結された gRNA も提供する。

【0 2 3 0】

50

一態様では、本発明は、配列番号23～46、562～1076、2778～4478、及び4553～4565のいずれか1つで説明される配列又はそれらのホモログを含むか、それらからなるスパーサー配列を含むgRNAを提供する。

【0231】

一態様では、本発明は、1つ以上(例えば2つ、若しくは3つ、若しくは4つ、若しくは5つ)の保存的置換を有する配列番号23～46、562～1076、2778～4478、及び4553～4565のいずれか1つで説明される配列を含むか、それらからなるスパーサー配列を含むgRNAを提供する。1つ以上の保存的置換を含むスパーサー配列は、配列番号23～46、562～1076、2778～4478、及び4553～4565のいずれか1つで説明される配列を有するスパーサー配列と実質的に同じ活性を保持している。

【0232】

一態様では、本発明は、配列番号23～46、562～1076、2778～4478、及び4553～4565のいずれか1つで説明される配列又はそれらの断片を含むか、それらからなるスパーサー配列を含むgRNAを提供する。

【0233】

好適には、スパーサー配列は、配列番号23～46、562～1076、2778～4478、及び4553～4565のいずれか1つで説明される配列を含むか、それらからなり、長さ21ヌクレオチド以下(例えば20ヌクレオチド、例えば19ヌクレオチド、例えば18ヌクレオチド、例えば17ヌクレオチド、例えば16ヌクレオチド、例えば15ヌクレオチド、例えば14ヌクレオチド、例えば13ヌクレオチド、例えば12ヌクレオチド、例えば11ヌクレオチド、又は例えば10ヌクレオチド)である。

【0234】

一態様では、スパーサー配列は、配列番号23～46、562～1076、2778～4478、及び4553～4565のいずれか1つで説明される配列又は配列番号23～46、562～1076、2778～4478、及び4553～4565の連続する長さ21ヌクレオチド以下(例えば連続する20ヌクレオチド、連続する19ヌクレオチド、連続する18ヌクレオチド、連続する17ヌクレオチド、連続する16ヌクレオチド、連続する15ヌクレオチド、連続する14ヌクレオチド、連続する13ヌクレオチド、連続する12ヌクレオチド、連続する11ヌクレオチド、又は連続する10ヌクレオチド)を含むか、それらからなる、それらの断片を含んでよい。断片は、例えば5'末端からの配列番号23～46、562～1076、2778～4478、及び4553～4565の短縮化(即ち5'末端のヌクレオチドが除去されている)であってよい。

【0235】

一部の態様では、gRNAを化学的に改変することができる。例えば化学的改変によって、例えば(Yin et al., Nat Biotechnol. 2017 Dec;35(12):1179-1187)に記載されているように、標的細胞に投与された場合にgRNAの安定性が増大し得る。そのような化学的改変は文献で知られており、それだけに限らないが、ロックされた核酸(LNA)、ホスホロチオエート改変オリゴヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル改変オリゴヌクレオチド、及び2'-O-メチル改変オリゴヌクレオチドが含まれる。

【0236】

一部の態様では、gRNAの最初の3つのヌクレオシド及び最後の3つのヌクレオシドは、gRNAの長さに関わらず2'-O-メチル改変ヌクレオシドである。一部の態様では、gRNAの最初の3つのヌクレオシド間リンケージ及び最後の3つのヌクレオシド間リンケージは、gRNAの長さに関わらずホスホロチオエートリンケージである。

【0237】

配列番号4567(これは長さ80ヌクレオチドである)のtracrRNAを有するgRNA配列については、完全長のgRNAのtracrRNA配列部分は以下のように改変できる(ヌクレオシド1をtracrRNA配列の5'末端、ヌクレオシド80をtracrRNA配列の3'末端として)ヌクレオシド1～8:未改変RNAヌクレオシド、ヌクレオシド9～20: 2'-O-Me改変ヌクレオシド

ヌクレオシド21~48:未改変RNAヌクレオシド、及び
ヌクレオシド49~80: 2'-O-Me改変ヌクレオシド。

そのような改変されたtracr配列では、ヌクレオシド77と78、78と79、及び79と80との間のヌクレオシド間リンケージ(即ち最後の3つのヌクレオシド間リンケージ)は、ホスホロチオエートリンケージであってよい。スパーサーRNAはこの改変されたtracr配列の5'末端に結合して、完全長のgRNAを形成し得る。この完全長のgRNAにおいて、gRNA配列のtracr部分が上記のように改変され、gRNA配列のスパーサー部分が以下のように改変される。

スパーサー配列の最初の3つのヌクレオシドは2'-O-Meヌクレオシドであり、
最初の3つのヌクレオシド間リンケージはホスホロチオエートリンケージである。

この完全長のgRNAの一般的な概略を以下に示す。ここで小文字は2'-O-Meヌクレオシドを表し、大文字は未改変のRNAヌクレオシドを表し、sはホスホロチオエートリンケージを表し、それぞれのXは独立にA、C、G、又はUヌクレオシドを表し、それぞれのxは2'-O-Me A、C、G、又はUヌクレオシドを表す。

【化45】

5'-xsxsxs [X₇-X₁₇] GUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAAUAAGGCUAGU
CCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3' (配列番号
4638)

【0238】

より具体的には、完全長のスパーサーRNA(即ち20ヌクレオチド)及び配列番号4567のtracr RNA(これは長さ80ヌクレオチドであり、gRNAは長さ100ヌクレオチド)を有するgRNA配列について、gRNAは下記のように改変される(ヌクレオシド1をオリゴヌクレオチドの5'末端、ヌクレオチド100をオリゴヌクレオチドの3'末端として)。

ヌクレオシド1~3: 2'-O-Me改変ヌクレオシド、
ヌクレオシド4~28:未改変RNAヌクレオシド、
ヌクレオシド29~40: 2'-O-Me改変ヌクレオシド、
ヌクレオシド41~68:未改変RNAヌクレオシド、及び
ヌクレオシド79~100: 2'-O-Me改変ヌクレオシド。

そのような改変gRNAでは、ヌクレオシド1と2、2と3、3と4、97と98、98と99、及び99と100との間のヌクレオシド間リンケージ(即ち最初の3つのヌクレオシド間リンケージ及び最後の3つのヌクレオシド間リンケージ)はホスホロチオエートリンケージであってよい。ヌクレオシド間リンケージの残りはホスフェートリンケージである。

【0239】

切り取られたgRNA(例えば11~19ヌクレオチドのスパーサーを有するgRNA)に同様の改変を行なってよい。例えば、gRNAの最初の3つ及び最後の3つのヌクレオシド間リンケージはホスホロチオエートリンケージであってよく、及び/又はヌクレオチドの一部若しくは全部は化学的に改変され、例えば2'-O-メチルヌクレオチドであってよい。

【0240】

例えば、配列番号4568の配列は下記のように改変することができる。

【化46】

5'-asgs^{gs}GUAGGAGAGACUCACGCGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAAU
AAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'

(gRNA ID F4_20)

ここで

N: RNAヌクレオシド、n: 2'-O-メチルヌクレオシド、s: 2つのヌクレオシドの間のホスホロチオエート骨格改変。

【0241】

別の例は、配列番号4569の配列の改変である。

【化47】

5'-gsasgsUAGCGCGAGCACAGCUAGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAAU
AAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'

(gRNA ID C8_20)

【0242】

B2Mを標的とする例示的な完全長の改変されたgRNAを以下に示す。

【化48-1】

5'-csasusCGGCGCCCUCCGAUCUGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号4570の改変版; gRNA ID H8_20)

5'-gscsgsGGCCACCAAGGAGAACUGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号4571の改変版; gRNA ID H10_20)

5'-csgsasUAAGCGUCAGAGCGCCGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA

【化48-2】

UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号4572の改変版; gRNA ID H11_20)

5'-gsasasCGCGUGGAGGGGCGCUUGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号4573の改変版; gRNA ID H12_20)

【0243】

B2Mを標的とする例示的な切り取られた改変gRNAを以下に示す。

【化49】

5'-csascsCAAGGAGAACUGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号4576; gRNA ID H10_14)

5'-gscsgsCCCUCCGAUCUGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号4577; gRNA ID H8_15)

5'-asgscsGCGAGCACAGCUAGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号4578; gRNA ID C8_16)

5'-usasgsGAGAGACUCACGCGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号4579; gRNA ID F4_16)

【0244】

TRACを標的とする例示的な完全長の改変gRNAを以下に示す。

10

20

30

40

50

【化 5 0】

5'-asgsasGUCUCUCAGCUGGUACAGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
 (配列番号4575の改変版)

【0 2 4 5】

TET2を標的とする例示的な切り取られた改変gRNAを以下に示す。

【化 5 1】

5'-cscsgsUGCAGUGGCGCGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
 (配列番号 4580; gRNA ID sgRNA TE13_15)

10

5'-csgscsCGGCCUUUGUGCGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
 (配列番号 4581; gRNA ID sgRNA TE14_15)

5'-gscsgsGGGCCGGCGUCUGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
 (配列番号 4582; gRNA ID sgRNA TE19_15)

20

5'-usgsasAUAUUGAUGCGGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
 配列番号 4583; gRNA ID sgRNA TE20_15)

【0 2 4 6】

TGFR2を標的とする例示的な切り取られた改変gRNAを以下に示す。

【化 5 2】

5'-uscscsUCGCCAACAGCUGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
 (配列番号 4584; gRNA ID sgRNA TG7_15)

30

5'-asgsusCACUCGCGCGCAGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
 (配列番号 4585; gRNA ID sgRNA TG8_15)

5'-ascsusCCCGUAGCUGCAGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
 (配列番号 4586; gRNA ID sgRNA TG19_15)

5'-usgsusUGGCCGCGUUCGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
 UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
 (配列番号 4587; gRNA ID sgRNA TG20_15)

40

【0 2 4 7】

TET2を標的とする例示的な完全長の改変gRNAを以下に示す。

【化 5 3 - 1】

5'-gsgsasAUUAGCUCUGUAUCGGUGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4588; gRNA ID TE1_20)

5'-asasasGUAAGGGCUCUUACGAGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4589; gRNA ID TE2_20)

5'-gsgscsGUCUCACAGAUUGAAAUGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA 10
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4590; gRNA ID TE3_20)

5'-csgsgsUCAUUUCCCAGUUUGUGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4591; gRNA ID TE4_20)

5'-asgscsGCUCCCCUGUUUCACCGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA 20
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4592; gRNA ID TE5_20)

5'-csgscsGGGCAACGGGAUCUAAAGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4593; gRNA ID TE6_20)

5'-csgscsAAGCGGAGGUGUGGUGCGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4594; gRNA ID TE7_20)

5'-gsusgsCGGGUACACUCCGGAGGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA 30

【化 5 3 - 2】

UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4595; gRNA ID TE8_20)

5'-usgscsGCGGGACCUCGAAGUGGGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4596; gRNA ID TE9_20)

5'-asgscsAGAGCAAGCGCGAAGGUGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4597; gRNA ID TE10_20)

5'-usgscsAGCCCUCGGGAACCCCGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4598; gRNA ID TE11_20)

5'-gsusgsGUGCGCCCGGACCAGCGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4599; gRNA ID TE12_20)

5'-uscsasCGCCGUGCAGUGGCGCGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4600; gRNA ID TE13_20)

5'-gsusgsGCCGCCGGCCUUUGUGCGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4601; gRNA ID TE14_20)

5'-gscsasCCGGGCGUCCAGCACAAGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4602; gRNA ID TE15_20)

5'-asgsGsGAAUUAGCCCCCGCACGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4603; gRNA ID TE16_20)

5'-asgsusGGCAGCGGCGAGAGCUUUGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4604; gRNA ID TE17_20)

5'-ascsusUGCAUGCGAGCGGGACCGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4605; gRNA ID TE18_20)

5'-ascsusCAGCGGGGCCGGCGUCUGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4606; gRNA ID TE19_20)

5'-cscsusUAUGAAUAUUGAUGCGGUUUUAGAguagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4607; gRNA ID TE20_20)

10

20

30

40

【0 2 4 8】

TGFBR2を標的とする例示的な完全長の改変gRNAを以下に示す。

【化 5 4 - 1】

5'-ususcsUUUAGGUCGAAGUCUAGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4608; gRNA ID TG1_20)

5'-gsusgsCUCGCGACUCAAUAGAUGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4609; gRNA ID TG2_20)

5'-asascsGCAUCUCUAAAGCACCGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4610; gRNA ID TG3_20)

10

5'-csusgsAUCUACUAGGGAAAACGGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4611; gRNA ID TG4_20)

5'-ususgsAGUAAAUACUUGGAGCGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4612; gRNA ID TG5_20)

5'-asgsusCGGCCAAAGCUCUCGGAGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4613; gRNA ID TG6_20)

20

5'-gsasasACUCCUCGCCAACAGCUGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4614; gRNA ID TG7_20)

5'-gsasgsUGAGUCACUCGCGCGCAGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4615; gRNA ID TG8_20)

5'-csgscsGUGCACCCGCUCGGGACGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4616; gRNA ID TG9_20)

30

5'-gsgsgsGCCUCCCCGCGCCUCGCGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4617; gRNA ID TG10_20)

5'-usgsgsCGAGCGGGCGCCACAUCGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4618; gRNA ID TG11_20)

5'-uscsgsGUCUAUGACGAGCAGCGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4619; gRNA ID TG12_20)

5'-cscsusGAGCAGCCCCGACCCAGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA

40

【化 5 4 - 2】

UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4620; gRNA ID TG13_20)

5'-gsgsasCGAUGUGCAGCGGCCACGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4621; gRNA ID TG14_20)

5'-usgscsUGGCGAUACGCGUCCACGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4622; gRNA ID TG15_20)

10

5'-asascsGUGCGGUGGGAUCGUGCGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4623; gRNA ID TG16_20)

5'-gsascsUGUCAAGCGCAGCGGAGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4624; gRNA ID TG17_20)

5'-csususUCCUCGUUUCGCCCCGGGUUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4625; gRNA ID TG18_20)

20

5'-gscscsCGACUCCCGUAGCUGCAGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4626; gRNA ID TG19_20)

5'-csgsusUGUGUUGGCCGCGUUCGGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4627; gRNA ID TG20_20)

30

【0 2 4 9】

GFPを標的とする例示的な完全長の改変gRNAを以下に示す。

【化 5 5】

5'-csuscsCUCGCCCUGCUCACCAGUUUAGAgcuagaaauagcAAGUUAAAA
UAAGGCUAGUCCGUUAUCAacuugaaaaaguggcaccgagucggugcusususu-3'
(配列番号 4628; gRNA ID GFP1)

【0 2 5 0】

一部の態様では、本発明は2つ以上のgRNAを利用する。

40

【0 2 5 1】

好適には、前記2つ以上のgRNAは、ETM(例えばETR)に異なる標的遺伝子を標的とさせることができる。好適には、前記2つ以上のgRNAは、異なる長さのスペーサー配列を含んでよい。例えば、異なる長さのスペーサー配列は、ETM(例えばETR)のエンドヌクレアーゼに、異なる標的遺伝子を標的とさせてよい。

【0 2 5 2】

一部の態様では、2つ以上のgRNAは、同一の標的遺伝子を標的としてよい。例えば、最適の後成的改変、例えば後成的サイレンシングのために、2つのgRNAによって同一の遺伝子を標的とすることが有益な場合がある。

【0 2 5 3】

50

一態様では、少なくとも2つのgRNAの少なくとも1つは、長さ18、19、又は20ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。

【0254】

一態様では、少なくとも2つのgRNAの少なくとも1つは、長さ17ヌクレオチド以下、例えば長さ16ヌクレオチド、長さ15ヌクレオチド、例えば長さ14ヌクレオチド、例えば長さ13ヌクレオチド、例えば長さ12ヌクレオチド、例えば長さ11ヌクレオチド、又は例えば長さ10ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。

【0255】

多重化-同一細胞内の多数の遺伝子の改変

本発明は、同一細胞内の多数の標的遺伝子の発現及び/又は活性を改変するための遺伝子編集と後成的編集の戦略の組合せの開発に関する。特に、本発明は、1つ以上の遺伝子の後成的編集及び別の遺伝子の遺伝子編集を促進するための、後成的エフェクタードメイン及びエンドヌクレアーゼを含むETM(例えばETR)並びに異なる長さのスペーサー配列を含むgRNAを利用し得る。

10

【0256】

本明細書で使用する場合、「発現及び/又は活性の改変」は、標的遺伝子の発現及び/又は活性を増大又は低下させる(例えば低下させる)ことを意味する。

【0257】

一態様では、標的遺伝子の転写及び/又は発現が抑制され得る。

【0258】

一態様では、標的遺伝子がサイレンシングされ得る。

20

【0259】

一態様では、標的遺伝子が増強され得る。換言すれば、標的遺伝子の発現が増大され得る。例えば、内因性標的遺伝子の発現が増大され得る。

【0260】

別の例では、内因性標的(例えば遺伝子)が遺伝子編集によって改変(例えば変異)され、改変された標的(例えば遺伝子)の発現が増大され得る。

【0261】

ETM又はETMの組合せの効果は、ETM又はETMの組合せの存在下及び非存在下で、標的遺伝子、例えば細胞に対して内因性の遺伝子の転写又は発現を比較することによって、研究することができる。遺伝子の転写又は発現を解析する方法は当技術で既知である。

30

【0262】

ETM又はETMの組合せ及びgRNAの効果は、レポーター遺伝子、例えば蛍光タンパク質をコードする遺伝子の発現をモニターするモデル系を用いて研究してよい。そのようなレポーター遺伝子の発現をモニターする好適な方法には、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別(FACS)、及び蛍光顕微鏡が含まれる。

【0263】

例えば、レポーター遺伝子を有するベクターを細胞の集団にトランスフェクトしてよい。ベクターは、ベクターが細菌にトランスフェクトした場合にレポーター遺伝子が発現するように構築してよい。好適なレポーター遺伝子には、蛍光タンパク質、例えば緑色、黄色、チェリー、シアン、又はオレンジの蛍光タンパク質をコードする遺伝子が含まれる。さらに、細胞の集団に、目的のETMをコードするベクター及び/又はgRNAをトランスフェクトしてよい。続いて、レポーター遺伝子を発現する細胞及び発現しない細胞の数、並びにレポーター遺伝子の発現のレベルを、好適な手法、例えばFACSを用いて定量してよい。次いでレポーター遺伝子の発現のレベルを、ETM及び/又はgRNAの存在下及び非存在下で比較してよい。

40

【0264】

遺伝子、例えばETMの標的の転写を決定する方法は、当技術で既知である。好適な方法には、逆転写PCR及びノーザンブロット系のアプローチが含まれる。遺伝子の転写を決定する方法に加えて、遺伝子の発現を決定する方法が当技術で既知である。好適なさら

50

なる方法には、ウェスタンブロット系又はフローサイトメトリーのアプローチが含まれる。

【0265】

標的遺伝子の転写及び発現

一部の態様では、本発明による産生物(例えばETM及び/又はgRNA)は、少なくとも1つの標的遺伝子の転写及び/又は発現を抑制する方法において用いられる。好適には、標的遺伝子は内因性遺伝子であってよい。

【0266】

一態様では、標的遺伝子の転写及び/又は発現は、後成的編集によって抑制される。一態様では、標的遺伝子の転写及び/又は発現は、遺伝子編集によって抑制される。

【0267】

一部の態様では、本発明による産生物(例えばETM及び/又はgRNA)は、少なくとも2つの標的遺伝子の転写及び/又は発現を抑制する方法において用いられる。好適には、標的遺伝子の少なくとも一方又は両方は、内因性遺伝子であってよい。

【0268】

一態様では、ただ1つの遺伝子の転写及び/又は発現が遺伝子編集によって抑制される。

【0269】

本発明のETM(例えばETR)の(好適なgRNAとともに)投与に続いて、標的遺伝子の転写又は発現のレベルは、ETM(例えばETR)の非存在下における転写又は発現のレベルと比較して、例えば少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、又は100%低減し得る。

【0270】

一部の態様では、本発明による産生物(例えばETM及び/又はgRNA)は、少なくとも1つの標的遺伝子をサイレンシングする方法において用いられる。好適には、標的遺伝子は内因性遺伝子であってよい。好適には、標的遺伝子は外因性遺伝子、例えばウイルス遺伝子であってよい。

【0271】

一態様では、標的遺伝子は後成的編集によってサイレンシングされる。一態様では、標的遺伝子は遺伝子編集によってサイレンシングされる。

【0272】

一部の態様では、本発明による産生物(例えばETM及び/又はgRNA)は、少なくとも2つの標的遺伝子をサイレンシングする方法において用いられる。好適には、標的遺伝子の少なくとも一方又は両方は内因性遺伝子であってよい。

【0273】

一態様では、ただ1つの遺伝子が遺伝子編集によってサイレンシングされる。

【0274】

理論に縛られることは望まないが、遺伝子編集活性を1つの遺伝子に制限することによって、望ましくないゲノム転座の可能性を低減させることができる。

【0275】

「標的遺伝子のサイレンシング」により、標的遺伝子の発現が所望の効果を達成するために十分な程度に低減することを理解されたい。発現の低減は、治療的に関連する効果、例えば疾患の防止又は処置を達成するために十分であり得る。例えば、疾患をもたらす機能不全の標的遺伝子は、標的遺伝子の発現がなくなるか、又は標的遺伝子の発現の残存レベルが疾患状態を改善するか防止するために十分低くなるまでに抑制され得る。さらに、発現の低減によって、遺伝子サイレンシングを有する細胞の精製が可能になる。

【0276】

発現の低減は、その機能が低下し又は欠落した細胞を研究することによって遺伝子の機能の検討を実施することを可能にするために十分であり得る。

【0277】

標的遺伝子の抑制は、例えば細胞への又は細胞の中の(例えば好適なgRNAを伴う)本発

10

20

30

40

50

明のETM (例えばETR)の一過的な送達又は発現に続いて生じ得る。

【0278】

標的遺伝子の増強

「標的遺伝子の増強」は、標的遺伝子の発現が所望の効果を達成するために十分な程度に増大することを意味する理解されたい。発現の増大は、治療に関連のある効果、例えば疾患の防止又は処置を達成するために十分であってよい。例えば、疾患をもたらす機能不全の標的遺伝子は、疾患状態を改善するか防止するために十分な標的遺伝子の発現があるまで増強され得る。或いは、標的遺伝子の発現の増大は、疾患関連遺伝子の機能不全な活性を補償し得る。さらに、標的遺伝子の発現の増大は、その特定の標的遺伝子をデノボで発現する細胞の選択を可能にする。

10

【0279】

本発明のETMの(例えば好適なgRNAを伴う)投与に続いて、標的遺伝子の転写又は発現のレベルは、ETMの非存在下での転写又は発現のレベルと比較して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、100%、200%、300%、400%、又は500%増大し得る。

【0280】

標的遺伝子の増強は、例えば細胞への又は細胞の中の(例えば好適なgRNAを伴う)本発明のETMの一過的な送達又は発現に続いて生じ得る。

【0281】

一過的な発現

20

「一過的な発現」は、ETM(例えばETR)の発現が長期にわたって安定ではないことであると理解されたい。例えば、ETM(例えばETR)をコードするポリヌクレオチドは、宿主ゲノムの中に一体化されない場合がある。より具体的には、一過的な発現は、ETM(例えばETR)をコードするポリヌクレオチドの細胞内への導入の後、20週以内に実質的に失われる発現であり得る。例えば、発現は、ETM(例えばETR)をコードするポリヌクレオチドの細胞内への導入の後、12、6、4、又は2週以内に実質的に失われ得る。

【0282】

同様に、「一過的な送達」は、ETM(例えばETR)が長期にわたって細胞内に実質的に残存しない(即ち細胞によって実質的に失われる)ことであると理解されたい。より具体的には、一過的な送達は、ETM(例えばETR)の細胞内への導入の後、ETM(例えばETR)が20週以内に細胞によって実質的に失われることをもたらし得る。例えば、ETM(例えばETR)は、ETM(例えばETR)の細胞内への導入の後、12、6、4、又は2週以内に実質的に失われ得る。

30

【0283】

一態様では、ETM及び/又はgRNAは、一過的に送達してよい。一過的な送達は、例えば永久的な変化をもたらす得る。ETM及び/又はgRNAの一過的な送達は抑制的制御エレメントのDNAのメチル化をもたらす、これが次に遺伝子の活性化をもたらす得る(例えばこの後成的改変、永久的な遺伝子活性化を前提として)。

【0284】

標的遺伝子は、例えば永久的に抑制され、サイレンシングされ、又は増強され得る。標的遺伝子の「永久的な抑制」、「永久的なサイレンシング」、又は「永久的な増強」は、標的遺伝子の転写又は発現が、少なくとも2か月、6か月、1年、2年、又は細胞/生命体の全生涯にわたって、ETM(例えばETR)の非存在下における転写又は発現のレベルと比較して、低減又は増大する(例えば少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は100%低減又は増大する)ことであると理解されたい。例えば、永久的に抑制、サイレンシング、又は増強された標的遺伝子は、細胞の生涯の残りにわたって抑制、サイレンシング、又は増強されたままであってよい。

40

【0285】

一態様では、ETM及び/又はgRNAは安定的に発現される。例えば、安定的な発現は、いくつかの標的の永久的な遺伝子活性化を達成するために必要であり得る。標的遺伝子は

50

、例えば本発明の産生物が投与された細胞の子孫において抑制、サイレンシング、又は増強されたままであってよい(即ち、標的遺伝子の抑制、サイレンシング、又は増強は細胞の子孫に引き継がれる)。例えば、本発明のETM(例えばETR)及びgRNAは、幹細胞及び幹細胞から分化した細胞を含んでもよい幹細胞の子孫において標的遺伝子を抑制又はサイレンシングするために、幹細胞(例えば造血幹細胞)に投与してよい。

【0286】

標的遺伝子

標的遺伝子は、改変、例えば抑制又はサイレンシングされた場合に、例えば治療効果を生じ得る。

【0287】

本発明の産生物は、CpG アイランド(CGI)を有しない遺伝子を改変、例えば抑制又はサイレンシングするために用いてよい。CGIを有しない遺伝子には、TRAC、TRBC、PDCD1、TIM-3、TIGIT、LAG3、CTLA4、AAVS1、及びCCR5が含まれる。

【0288】

例えば、標的遺伝子、例えばCGIを有しない遺伝子は、同種産生物を産生し得る(例えばTRAC及び/又はTRABCを標的とすることによって)、免疫抑制性腫瘍微小環境に対する耐性を変化させ得る(例えばPDCD1、TIM-3、TIGIT、LAG3、及び/又はCTLA4の標的化によって)、及び/又は安全な部位におけるCAR/トランスジェニックTCRの一体化を可能にし得る(例えばAAVS1及び/又はCCR5の標的化によって)。

【0289】

一態様では、本発明は、配列番号47～561のいずれか1つで説明される配列を標的とするgRNAを提供する。

【0290】

例として、CGIアイランドを有しない標的遺伝子及び前記遺伝子を標的とするために適した例示的なgRNAを、下の表1に提示する(SEQ:配列番号)。

【0291】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表1. CGIアイランドを有しない標的遺伝子及び例示的なgRNA

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
TRAC	GATTAAACCCGGCCACTTTCAGG	47	GAUUAACCCGGCCACUUUC	562
	CGTCATGAGCAGATTAAACCCGG	48	CGUCAUGAGCAGAUUAAACC	563
	CTCGACCAGCTTGACATCACAGG	49	CUCGACCAGCUUGACAUCAC	564
	AAGTTCCTGTGATGTCAAGCTGG	50	AAGUCCUGUGAUGUCAAGC	565
	TTCGGAACCCAATCACTGACAGG	51	UUCGGAACCCAAUCACUGAC	566
	TCAGGGTTCTGGATATCTGTGGG	52	UCAGGGUUCUGGAUAUCUGU	567
	GAGAATCAAAATCGGTGAATAGG	53	GAGAAUCAAAAUCCGUGAAU	568
	CTCTCAGCTGGTACACGGCAGGG	54	CUCUCAGCUGGUACACGGCA	569
	TAAACCCGGCCACTTTCAGGAGG	55	UAAACCCGGCCACUUUCAGG	570
	GGTAAGACAGGGGTCTAGCCTGG	56	GGUAAGACAGGGGUCUAGCC	571
	TGGATTTAGAGTCTCTCAGCTGG	57	UGGAUUUAGAGUCUCUCAGC	572
	GCACCAAAGCTGCCCTTACCTGG	58	GCACCAAAGCUGCCCUUACC	573
	GTAAGACAGGGGTCTAGCCTGGG	59	GUAAGACAGGGGUCUAGCCU	574
	ACCCGGCCACTTTCAGGAGGAGG	60	ACCCGGCCACUUUCAGGAGG	575
	TCTCTCAGCTGGTACACGGCAGG	61	UCUCUCAGCUGGUACACGGC	576
	GTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGG	62	GUCGAGAAAAGCUUUGAAAC	577
	ACACGGCAGGGTCAGGGTTCTGG	63	ACACGGCAGGGUCAGGGUUC	578
	CTGGATATCTGTGGGACAAGAGG	64	CUGGAUAUCUGUGGGACAAG	579
	CCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGG	65	CCGAUCCUCCUCCUGAAAG	580
	AAAGTCAGATTTGTTGCTCCAGG	66	AAAGUCAGAUUUGUUGCUCC	581
	GCTGGTACACGGCAGGGTCAGGG	67	GCUGGUACACGGCAGGGUCA	582
	TGTGCTAGACATGAGGTCTATGG	68	UGUGCUAGACAUGAGGUCUA	583
	ACAAAACGTGTCTAGACATGAGG	69	ACAAAACUGUGCUAGACAUG	584
	CTGACAGGTTTTGAAAGTTTAGG	70	CUGACAGGUUUUGAAAGUUU	585
	ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGG	71	AUCCUCCUCCUGAAAGUGGC	586

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	TAGGCAGACAGACTTGTCCTGG	72	UAGGCAGACAGACUUGUCAC	587
	AGCTTTGAAACAGGTAAGACAGG	73	AGCUUUGAAACAGGUAAGAC	588
	AAGCTGCCCTTACCTGGGCTGGG	74	AAGCUGCCCUUACCUGGGCU	589
	TTCAAACCTGTCAGTGATTGGG	75	UUCAAAACCUUGUCAGUGAUU	590
	TCAGGCCCTCACCTCAGCTGG	76	UCAAGGCCCUUACCUCAGC	591
	GCTTTGAAACAGGTAAGACAGGG	77	GCUUUGAAACAGGUAAGACA	592
	GTCAGGGTTCTGGATATCTGTGG	78	GUCAGGGUUCUGGAUAUCUG	593
	CTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGG	79	CUUCAAGAGCAACAGUGCUG	594
	AAAGCTGCCCTTACCTGGGCTGG	80	AAAGCUGCCCUUACCUGGGC	595
	ATCTGTGGGACAAGAGGATCAGG	81	AUCUGUGGGACAAGAGGAUC	596
	TTAATCTGCTCATGACGCTGCGG	82	UUAUUCUGCUCAUGACGCUG	597
	AGCCCAGGTAAGGCGAGCTTGG	83	AGCCCAGGUAAGGGCAGCUU	598
	CTGCGGCTGTGGTCCAGCTGAGG	84	CUGCGGCGUGGUGCCAGCUG	599
	TGCTCATGACGCTGCGGCTGTGG	85	UGCUCAUGACGCGCGGCUG	600
	CATCACAGGAACCTTCTAAAAGG	86	CAUCACAGGAACUUUCUAAA	601
	TCTGTGGGACAAGAGGATCAGGG	87	UCUGUGGGACAAGAGGAUCA	602
	TTCTGTATCTGTAAAACCAAGAGG	88	UUCGUAUCUGUAAAACCAAG	603
	AGAGTCTCTCAGCTGGTACACGG	89	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	604
	AGGTGAGGGGCTTGAAGCTGGG	90	AGGUGAGGGGCCUUGAAGCU	605
	TTCTTCCCAGCCCAGGTAAGGG	91	UUCUCCCCAGCCCAGGUAA	606
	CACCAAAGCTGCCCTTACCTGGG	92	CACCAAAGCUGCCCUUACCU	607
	GAGGTGAGGGGCTTGAAGCTGG	93	GAGGUGAGGGGCCUUGAAGC	608
	TCCTCCTCTGAAAGTGGCCGGG	94	UCCUCCUCCUGAAAGUGGCC	609
	AGCTGGTACACGGCAGGGTCAGG	95	AGCUGGUACACGGCAGGGUC	610
	AACAAATGTGTACAAAGTAAGG	96	AACAAUUGUGACACAAAGUA	611
TRBC1 (ENST00000 633705)	AGGAAGGGCTTACTTACCCGAGG	97	AGGAAGGGCUUACUUACCCG	612
	TCAAACACAGCGACCTCGGGTGG	98	UCAAACACAGCGACCUCGGG	613
	CGGGTGGGAACACCTTGTTCAGG	99	CGGGUGGGAACACCUUGUUC	614
	GTAGGACACTGTTGGCACGGAGG	100	GUAGGACACUGUUGGCACGG	615
	CACCCAGATCGTCAGCGCCGAGG	101	CACCCAGAUUGUCAGCGCCG	616
	ATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGG	102	AUCGUCAGCGCCGAGGCCUG	617
	AGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGG	103	AGUCCAGUUCUACGGGCUCU	618
	GACGGGTTTGGCCCTATCCTGGG	104	GACGGGUUUGGCCCUAUCCU	619
	TGACGGGTTTGGCCCTATCCTGG	105	UGACGGGUUUGGCCCUAUCC	620
	GAACAAGGTGTTCCACCCGAGG	106	GAACAAGGUGUCCCACCCG	621
	TCTCCGAGAGCCCGTAGAACTGG	107	UCUCCGAGAGCCCGUAGAAC	622
	GGCTCTCGGAGAATGACGAGTGG	108	GGCUCUCGGAGAAUGACGAG	623
	AGACAGGACCCCTTGCTGGTAGG	109	AGACAGGACCCCUUGCUGGU	624
	GGCGCTGACGATCTGGGTGACGG	110	GGCGCUGACGAUCUGGGUGA	625
	CAAACACAGCGACCTCGGGTGGG	111	CAAACACAGCGACCUCGGGU	626
	TGACAGCGGAAGTGGTTGCGGGG	112	UGACAGCGGAAGUGGUUGCG	627
	TGACGAGTGGACCCAGGATAGGG	113	UGACGAGUGGACCCAGGAUA	628
	CGCCCTTGTTGATGGCCATGG	114	CGCCCUUGUGUUGAUGGCCA	629
	ATGACGAGTGGACCCAGGATAGG	115	AUGACGAGUGGACCCAGGAU	630
	CTTTCAGAGGACCTGAACAAGG	116	CUUUCAGAGGACCUGAACA	631
	GGCCTCGGCGCTGACGATCTGGG	117	GGCCUCGGCGCUGACGAUCU	632
	CGTGTCAGTCCAGTTCTACGG	118	CGCUGUCAAGUCCAGUUCUA	633
	GGTCAGCGCCCTTGTTGTGATGG	119	GGUCAGCGCCCUUGUGUUGA	634

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	AACACCTTGTTTCAGGTCCTCTGG	120	AACACCUUGUUCAGGUCCUC	635
	TTGACAGCGGAAGTGTTGCGGG	121	UUGACAGCGGAAGUGGUUGC	636
	GACGATCTGGGTGACGGGTTTGG	122	GACGAUCUGGGUGACGGGUU	637
	GACCAGCACAGCATACAGGGTGG	123	GACCAGCACAGCAUACAGGG	638
	TCCCTAGCAGGATCTCATAGAGG	124	UCCCUAGCAGGAUCUCAUAG	639
	TGTTGATGGCCATGGTAAGCAGG	125	UGUUGAUGGCCAUGGUAAGC	640
	CTGGTAGGACACTGTTGGCACGG	126	CUGGUAGGACACUGUUGGCA	641
	AGGCCTCGGCGCTGACGATCTGG	127	AGGCCUCGGCGCUGACGAUC	642
	CGTAGAACTGGACTTGACAGCGG	128	CGUAGAACUGGACUUGACAG	643
	CCAACAGTGTCTACCAGCAAGG	129	CCAACAGUGUCCUACCAGCA	644
	TGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGG	130	UGAGGGUCUCGGCCACCUUC	645
	GTATCTGGAGTCATTGAGGGCGG	131	GUAUCUGGAGUCAUUGAGGG	646
	TATCTGGAGTCATTGAGGGCGGG	132	UAUCUGGAGUCAUUGAGGGC	647
	GGCTCAAACACAGCGACCTCGGG	133	GGCUAAACACAGCGACCUC	648
	GGCCACCTGTATGCTGTGCTGG	134	GGCCACCCUGUAUGCUGUGC	649
	GCGGCTGCTCAGGCAGTATCTGG	135	GCGGCUGCUCAGGCAGUAUC	650
	TAGCAGGATCTCATAGAGGATGG	136	UAGCAGGAUCUCAUAGAGGA	651
	CTTGTTCAAGTCCTCTGGAAAGG	137	CUUGUUCAGGUCCUCUGGAA	652
	GTTGCGGGGGTTCTGCCAGAAGG	138	GUUGCGGGGGUUCUGCCAGA	653
	TCAGACTGTGGCTTTACCTCGGG	139	UCAGACUGUGGCUUUAACCUC	654
	CTTGACAGCGGAAGTGTTGCGG	140	CUUGACAGCGGAAGUGGUUG	655
	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	141	GCUGUCAAGUCCAGUUCUAC	656
	CAGCTCAGCTCCACGTGGTCAGG	142	CAGCUCAGCUCCACGUGGUC	657
	CAACAGTGTCTTACCAGCAAGGG	143	CAACAGUGUCCUACCAGCAA	658
	AGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGG	144	AGAUCGUCAGCGCCGAGGCC	659
	GATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGG	145	GAUCGUCAGCGCCGAGGCCU	660
	AACAGTGTCTTACCAGCAAGGGG	146	AACAGUGUCCUACCAGCAAG	661
	GACCAGCACGGCATACAAGGTGG	147	GACCAGCACGGCAUACAAGG	662
	CACCCAGATCGTCAGCGCCGAGG	148	CACCCAGAUCGUCAGCGCCG	663
	ATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGG	149	AUCGUCAGCGCCGAGGCCUG	664
	AGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGG	150	AGUCCAGUUCUACGGGCUCU	665
	ACTGACCAGCACGGCATACAAGG	151	ACUGACCAGCACGGCAUACA	666
	AGGAGAGACTCACTTACCGGAGG	152	AGGAGAGACUCACUUAACCGG	667
	TCTCCGAGAGCCCGTAGAACTGG	153	UCUCCGAGAGCCCGUAGAAC	668
	GGCTCTCGGAGAATGACGAGTGG	154	GGCUCUCGGAGAAUGACGAG	669
	GGCCACCTTGATGCCGTGCTGG	155	GGCCACCUUGUAUGCCGUGC	670
	TACCATGGCCATCAGCACGAGGG	156	UACCAUGGCCAUACGACGA	671
	TCAACAGAGTCTTACCAGCAAGG	157	UCAACAGAGUCUUAACCAGCA	672
	TGACAGCGGAAGTGTTGCGGGG	158	UGACAGCGGAAGUGGUUGCG	673
	CTATGAGATCTTGCTAGGGAAGG	159	CUAUGAGAUCUUGCUAGGGA	674
	TGACGAGTGGACCCAGGATAGGG	160	UGACGAGUGGACCCAGGAUA	675
	ATGACGAGTGGACCCAGGATAGG	161	AUGACGAGUGGACCCAGGAU	676
	GACAGGTTTGCCCTATCCTGGG	162	GACAGGUUUGGCCCUAUCCU	677
	TGACAGTGTGCGCCCTATCCTGG	163	UGACAGGUUUGGCCCUAUCC	678
	GGCCTCGGCGCTGACGATCTGGG	164	GGCCUCGGCGCUGACGAUCU	679
	CGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGG	165	CGCUGUCAAGUCCAGUUCUA	680
	GGCTCAAACACAGCGACCTGGG	166	GGCUCAAACACAGCGACCUU	681
	TTGACAGCGGAAGTGTTGCGGG	167	UUGACAGCGGAAGUGGUUGC	682
TRBC2 (ENST00000466254)				

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	TGGGTGGGAACACGTTTTTCAGG	168	UGGGUGGGAACACGUUUUUC	683
	TTACCATGGCCATCAGCACGAGG	169	UUACCAUGGCCAUCAGCACG	684
	CAAACACAGCGACCTTGGGTGGG	170	CAAACACAGCGACCUUGGGU	685
	TCAAACACAGCGACCTTGGGTGG	171	UCAAACACAGCGACCUUGGG	686
	ATGGTTTTGGAGCTAGCCTCTGG	172	AUGGUUUUGGAGCUAGCCUC	687
	CAACAGAGTCTTACCAGCAAGGG	173	CAACAGAGUCUUACCAGCAA	688
	AGGCCTCGGCGCTGACGATCTGG	174	AGGCCUCGGCGCUGACGAUC	689
	CGTAGAACTGGACTTGACAGCGG	175	CGUAGAACUGGACUUGACAG	690
	CACGAGGGCACTGACCAGCACGG	176	CACGAGGGCACUGACCAGCA	691
	TCGTGCTGATGGCCATGGTAAGG	177	UCGUGCUGAUGGCCAUGGUA	692
	AACAGAGTCTTACCAGCAAGGGG	178	AACAGAGUCUUACCAGCAAG	693
	TGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGG	179	UGAGGGUCUCGGGCCACCUUC	694
	TCCCTAGCAAGATCTCATAGAGG	180	UCCCUAGCAAGAUUCUAUAG	695
	GTATCTGGAGTCATTGAGGGCGG	181	GUAUCUGGAGUCAUUGAGGG	696
	TATCTGGAGTCATTGAGGGCGGG	182	UAUCUGGAGUCAUUGAGGGC	697
	CCGACCAGTGGAGCTGAGCTGG	183	CCGACCAGUGGAGCUGAGC	698
	AGGCTTCTACCCGACCACGTGG	184	AGGCUUCUACCCGACCACG	699
	GCGGCTGCTCAGGCAGTATCTGG	185	GCGGCUGCUCAGGCAGUAUC	700
	GAAAAACGTGTCCACCCAAGG	186	GAAAAACGUGUCCCACCCA	701
	CAAGATCTCATAGAGGATGGTGG	187	CAAGAUCAUAGAGGAUGG	702
	TCCTCTATGAGATCTTGCTAGGG	188	UCCUCUAUGAGAUUCUAGUA	703
	GTTGCGGGGTTCTGCCAGAAGG	189	GUUGCGGGGUUCUGCCAGA	704
	AACACGTTTTTCAGGTCTCTGG	190	AACACGUUUUUCAGGUCCUC	705
	CTTGACAGCGGAAGTGGTTGCGG	191	CUUGACAGCGGAAGUGGUUG	706
	ATCCTCTATGAGATCTTGCTAGG	192	AUCCUCUAUGAGAUUCUAGU	707
	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	193	GCUGUCAAGUCCAGUUCUAC	708
	CAGCTCAGCTCCACGTGGTCGGG	194	CAGCUCAGCUCCACGUGGUC	709
	AGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGG	195	AGAUCGUCAGCGCCGAGGCC	710
	GATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGG	196	GAUCGUCAGCGCCGAGGCCU	711
PDCD1	ACCGCCCAGACGACTGGCCAGGG	197	ACCGCCCAGACGACUGGCCA	712
	TGACGTTACCTCGTGGGCCCGG	198	UGACGUUACCUCGUGCGGCC	713
	ATGTGGAAGTCACGCCGTTGGG	199	AUGUGGAAGUCACGCCCGUU	714
	TGGGATGACGTTACCTCGTGCGG	200	UGGGAUGACGUUACCUCGUG	715
	GTCTGGGCGGTGCTACAACTGGG	201	GUCUGGGCGGUGCUACAACU	716
	GACGTTACCTCGTGGGCCCGGG	202	GACGUUACCUCGUGCGGCC	717
	CGTCTGGGCGGTGCTACAACTGG	203	CGUCUGGGCGGUGCUACAAC	718
	GCGTGACTTCCACATGAGCGTGG	204	GCGUGACUCCACAUGAGCG	719
	CGACTGGCCAGGGCGCTGTGGG	205	CGACUGGCCAGGGCGCCUGU	720
	TGTAGCACCGCCGACGACTGG	206	UGUAGCACCGCCGACGAC	721
	CACGAAGCTCTCCGATGTGTTGG	207	CACGAAGCUCUCCGAUGUGU	722
	TGACACGGAAGCGGCAGTCCTGG	208	UGACACGGAAGCGGCAGUCC	723
	TCAGTGGCTGGGCACTCCGAGGG	209	UCAGUGGCGGGCACUCCGA	724
	CGGAGAGCTTCGTGCTAACTGG	210	CGGAGAGCUUCGUGCUAAAC	725
	AGGTGCCGCTGTCTTGGCGCGG	211	AGGUGCCGUGUCAUUGCGC	726
	AGCTTGTCCTGCTGTTGCTGGG	212	AGCUUGUCCGUGUGGUUGCU	727
	CACCTACCTAAGAACCATCCTGG	213	CACCUACCUAAGAACCAUCC	728
	CGCCCACGACACCAACCACAGG	214	CGCCCACGACACCAACCACC	729
	ATTGTCTTCTAGCGGAATGGG	215	AUUGUCUUCCUAGCGGAU	730

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	GTGGCATACTCCGTCTGCTCAGG	216	GUGGCAUACUCCGUCUGCUC	731
	CCCCCTTCGGTCACCACGAGCAGG	217	CCCUUCGGUACACCACGAGC	732
	AGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGG	218	AGGCGCCCGUGGCCAGUCGUC	733
	AGCCGGCCAGTTTCAAACCCTGG	219	AGCCGGCCAGUUCCAAACCC	734
	ACTTCCACATGAGCGTGGTCAGG	220	ACUUCCACAUGAGCGUGGUC	735
	CGTTGGGCAGTTGTGTGACACGG	221	CGUUGGGCAGUUGUGUGACA	736
	CCCTTCGGTCACCACGAGCAGGG	222	CCCUUCGGUACACCACGAGCA	737
	ATCTGCTCCCGGGCCGACGAGG	223	AUCUGCUCGCGGGCCGACG	738
	ACCCTGGTGGTTGGTGTCTGTTGG	224	ACCCUGGUGGUUGGUGUCGU	739
	CACCGCCAGACGACTGGCCAGG	225	CACCGCCAGACGACUGGGCC	740
	GGCGGTGCTACAACTGGGCTGG	226	GGCGGUGCUACAACUGGGC	741
	CAGCTTGTCCGTCTGGTTGCTGG	227	CAGCUUGUCCGUCUGGUUGC	742
	CATGTGGAAGTACGCCCCGTTGG	228	CAUGUGGAAGUCACGCCCGU	743
	CGTGTACACAACGCCCCAACGG	229	CGUGACACAACUGCCCAA	744
	AGGGCCCGCGCAATGACAGCGG	230	AGGGCCCGCGCAAUGACAG	745
	GGTGACAGGTGCGGCCTCGGAGG	231	GGUGACAGGUGCGGCCUCGG	746
	GTGTACACAACGCCCCAACGGG	232	GUGUCACACAACUGCCCAAC	747
	AGGGTTTGAACGCGCGGCTGG	233	AGGGUUUGGAACUGGCCGGC	748
	TGGCGGCCAGGATGTTCTTAGG	234	UGGCGGCCAGGAUGGUUCUU	749
	CGACACCAACCACGAGGTTTGG	235	CGACACCAACCACGAGGUU	750
	AGGCGGCCAGCTTGTCCGTCTGG	236	AGGCGGCCAGCUUGUCCGUC	751
	CTACAACGCGGCTGGCGGCCAGG	237	CUACAACUGGGCUGGCGGCC	752
	GCTCTCTTGTATCTGCGCCTTGG	238	GCUCUCUUUGAUCUGCGCCU	753
	CTCTCTTGTATCTGCGCCTTGGG	239	CUCUCUUUGAUCUGCGCCUU	754
	TCGGTCACCACGAGCAGGGCTGG	240	UCGGUACACCACGAGCGGGC	755
	TCCGCTAGGAAAGACAATGGTGG	241	UCCGCUAGGAAAGACA AUGG	756
	GATGAGGTGCCCATTCCGCTAGG	242	GAUGAGGUGCCCAUUCGCU	757
	ACCTCATCCCCGCGCCGAGGGG	243	ACCUCAUCCCCGCGCCGAG	758
	GATCTGCGCCTTGGGGCCAGGG	244	GAUCUGCGCCUUGGGGGCCA	759
	GGTGCCGCTGTCTATTGCGCCGGG	245	GGUGCCGCGUCAUUGCGCC	760
	AGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGG	246	AGGAUGGUUCUAGGUAGGU	761
TIM- 3/HAVCR2	ATAGGCATCTACATCGGAGCAGG	247	AUAGGCAUCUACAUCGGAGC	762
	TCTCTCTGCCGAGTCGGTGCAGG	248	UCUCUCUGCCGAGUCGGUGC	763
	ATGAGAATACCCTAGTAAGGGGG	249	AUGAGAAUACCCUAGUAAGG	764
	CGACAACCCAAAGGTTGTGAGGG	250	CGACAACCCAAAGGUUGUGA	765
	CCGTAACCTATTGGCCAATGTGG	251	CCGUAACUCAUUGGCCA AUG	766
	TATGAGAATACCCTAGTAAGGGG	252	UAUGAGAAUACCCUAGUAAG	767
	TGAGTTACGGGACTCTAGATTGG	253	UGAGUUACGGGACUCUAGAU	768
	TCTAGAGTCCCGTAACTCATTGG	254	UCUAGAGUCCCGUAACUCAU	769
	GCCAATGACTTACGGGACTCTGG	255	GCCAAUGACUACGGGACUC	770
	GACGGGCACGAGGTTCCCTGGGG	256	GACGGGCACGAGGUUCCUG	771
	AGACGGGCACGAGGTTCCCTGGG	257	AGACGGGCACGAGGUUCCCU	772
	TCTGGAGCAACCATCAGAAATAGG	258	UCUGGAGCAACCAUCAGAAU	773
	CAGACGGGCACGAGGTTCCCTGG	259	CAGACGGGCACGAGGUUCCC	774
	CTGGTTTGTATGACCAATTCAGG	260	CUGGUUUGAUGACCAACUUC	775
	GGCCAGGTAACTATGCATGGGG	261	GGCCAGGUAAACUAGCAUG	776
	ATTGCAAAGCGACAACCCAAAGG	262	AUUGCAAAGCGACAACCCAA	777
	TGGTCATCAAACAGGTGAGTGG	263	UGGUCAUCAACACAGGUGAG	778

10

20

30

40

【表 1 - 6】

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	CTTACAAGTAAGTCTCGGCATGG	264	CUUACAAGUAAGUCUCGGCA	779
	CTAAATGGGGATTTCGCAAAGG	265	CUAAAUGGGGAUUUCCGCAA	780
	CATGCAAATGTCCACTCACCTGG	266	CAUGCAAUGUCCACUCACC	781
	GCTATGAGAATACCCTAGTAAGG	267	GCUAUGAGAAUACCCUAGUA	782
	CTCTCTGCCGAGTCGGTGCAGGG	268	CUCUCUGCCGAGUCGGUGCA	783
	GAACCTCGTGCCGCTCTGCTGGG	269	GAACCUCUGCCCGUCUGCU	784
	GTGAAGTCTCTCTGCCGAGTCGG	270	GUGAAGUCUCUCUGCCGAGU	785
	TCCAGAGTCCCGTAAGTCATTGG	271	UCCAGAGUCCCGUAAGUCAU	786
	AATGTGACTCTAGCAGACAGTGG	272	AAUGUGACUCUAGCAGACAG	787
	TAGGCATCTACATCGGAGCAGGG	273	UAGGCAUCUACAUCGGAGCA	788
	GTTGTTTCTGACATTAGCCAAGG	274	GUUGUUUCUGACAUAAGCCA	789
	TGCTGCCGGATCCAAATCCCAGG	275	UGCUGCCGGAUCCAAAUCCC	790
	GCCAATGTGGATATTGCTATGG	276	GCCAAUGUGGAUAUUUGCUA	791
	CTAGATTGGCCAATGACTTACGG	277	CUAGAUUGGCCAAUGACUUA	792
	CTGCCCCATGCCATAGTTACCTGG	278	CUGCCCCAUGCAUAGUUACC	793
	TGTGTTTGAATGTGGCAACGTGG	279	UGUGUUUGAAUGUGGCAACG	794
	AGAAGTGAATACAGAGCGGAGG	280	AGAAGUGGAAUACAGAGCGG	795
	TGGCCCAGGTAACATGCATGGG	281	UGGCCCAGGUAAUAUGCAU	796
	TAGATTGGCCAATGACTTACGGG	282	UAGAUUGGCCAAUGACUUA	797
	GGAACCTCGTGCCCGTCTGCTGG	283	GGAACCUCGUGCCCGUCUGC	798
	ACGTGACCACATTCAAACACAGG	284	ACGUUGCCACAUUCAAACAC	799
	TGCCCCAGCAGACGGGCACGAGG	285	UGCCCCAGCAGACGGGCACG	800
	ATGGCCCAGGTAACATGCATGG	286	AUGGCCCAGGUAAUAUGCA	801
	AGGTCAACCCTGCACCGACTCGG	287	AGGUCACCCUGCACCGACU	802
	AATGTGGCAACGTGGTGCTCAGG	288	AAUGUGGCAACGUGGUGCUC	803
	GAGTCACATTCTCTATGGTCAGG	289	GAGUCACAUUCUCUAUGGUC	804
	ATCCCCATTTAGCCAGTATCTGG	290	AUCCCCAUUUAGCCAGUAUC	805
	CATCCAGATACTGGCTAAATGGG	291	CAUCCAGAUACUGGCUAAAU	806
	ATGTGACTCTAGCAGACAGTGGG	292	AUGUGACUCUAGCAGACAGU	807
	GATGTAGATGCCTATTCTGATGG	293	GAUGUAGAUGCCUAUUCUGA	808
	CTTACTGTTAGATTTATATCAGG	294	CUUACUGUUAGAUUUUAUUC	809
	ATCAGAATAGGCATCTACATCGG	295	AUCAGAAUAGGCAUCUACAU	810
	ATTATTGCTATGTCAGCAGCAGG	296	AUUAUUGCUAUGUCAGCAGC	811
TIGIT	GTACTCCCCTGTATCGTTCACGG	297	GUACUCCCCUGUAUCGUUCA	812
	TATCGTTACCGTCAAGGACTGG	298	UAUCGUUACCGUCAGCGAC	813
	TCGCTGACCGTGAACGATACAGG	299	UCGCUGACCGUGAACGAUAC	814
	TGGGGCCACTCGATCCTTGAAGG	300	UGGGGCCACUCGAUCCUUGA	815
	CGTTCACGGTCAGCGACTGGAGG	301	CGUUCACGGUCAGCGACUGG	816
	ACCCTGATGGGACGTACACTGGG	302	ACCCUGAUGGGACGUACACU	817
	GCGGCCATGGCTCCAAGCAATGG	303	GCGGCCAUGGCUCCAAGCAA	818
	CGCTGACCGTGAACGATACAGGG	304	CGCUGACCGUGAACGAUACA	819
	TCCCAGTGACGTCCCATCAGGG	305	UCCCAGUGUACGUCCCAUCA	820
	CCCATCCTTCAAGGATCGAGTGG	306	CCCAUCCUUAAGGAUCGAG	821
	CGCGTTGACTAGAAAGGTAATGG	307	CGCGUUGACUAGAAAGGUAA	822
	CTCCCAGTGACGTCCCATCAGG	308	CUCCCAGUGUACGUCCCAUC	823
	AGTGTAAGTCCCATCAGGGTAGG	309	AGUGUACGUCCCAUCAGGGU	824
	TTCAAGGATCGAGTGGCCCCAGG	310	UUCAAGGAUCGAGUGGCCCC	825
	GAAAGCTCAGGTATTCCTGCTGG	311	GAAAGCUCAGGUAUUCCUGC	826

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	GGTGGTCGCGTTGACTAGAAAGG	312	GGUGGUCGCGUUGACUAGAA	827
	GACCACCAGCGTCGCGGCCATGG	313	GACCACCAGCGUCGCGGCCA	828
	GCCACTCGATCCTTGAAGGATGG	314	GCCACUCGAUCCUUGAAGGA	829
	GCAGATGACCACCAGCGTCGCGG	315	GCAGAUGACCACCAGCGUCG	830
	GTTCACGGTCAGCGACTGGAGGG	316	GUUCACGGUCAGCGACUGGA	831
	CAGGCACAATAGAAACAACGGGG	317	CAGGCACAUAAGAAACAACG	832
	TGGAGCCATGGCCGCGACGCTGG	318	UGGAGCCAUGGCCGCGACGC	833
	CACAAGTGACCCAGGTCAACTGG	319	CACAAGUGACCCAGGUCAAC	834
	TAGCAACCAGAGGCATCTTCTGG	320	UAGCAACCAGAGGCAUCUUC	835
	GCTGACCGTGAACGATACAGGGG	321	GCUGACCGUGAACGAUACAG	836
	GACCTGGGTCACTTGTGCCGTGG	322	GACCUGGGUCACUUGUGCCG	837
	TACCCTGATGGGACGTACACTGG	323	UACCCUGAUGGGACGUACAC	838
	GACTAGAAAGGTAATGGCTCCGG	324	GACUAGAAAGGUAAUGGCUC	839
	TCTATCACACCTACCCTGATGGG	325	UCUAUCACACCUACCCUGAU	840
	AGGTTCCAGATTCCATTGCTTGG	326	AGGUUCCAGAUUCCAUGCU	841
	ATTGAAGTAGTCATGCAGCTCGG	327	AUUGAAGUAGUCAUGCAGCU	842
	CACCACGGCACAAAGTGACCCAGG	328	CACCACGGCACAAAGUGACCC	843
	TTTGTAATGCTGACTTGGGGTGG	329	UUUGUAAUGCUGACUUGGGG	844
	TCAGGCCTTACCTGAGGCGAGGG	330	UCAGGCCUUAUCCUGAGGCGA	845
	GATTCCATTGCTTGGAGCCATGG	331	GAUUCUUAUGCUUGGAGCCA	846
	CTGCACAGCAGTCATCGTGGTGG	332	CUGCACAGCAGUCAUCGUGG	847
	GATCGAGTGGCCCCAGGTCCCGG	333	GAUCGAGUGGCCCCAGGUCC	848
	AGCCATGGCCGCGACGCTGGTGG	334	AGCCAUGGCCGCGACGCUUG	849
	ATCTATCACACCTACCCTGATGG	335	AUCUAUCACACCUACCCUGA	850
	AGAGACTGGTTAGCAACCAGAGG	336	AGAGACUGGUUAGCAACCAG	851
	ACAAGTGACCCAGGTCAACTGGG	337	ACAAGUGACCCAGGUCAACU	852
	CGGTACGCGACTGGAGGGTGAGG	338	CGGUCAGCGACUGGAGGGUG	853
	GTACACTGGGAGAATCTTCCTGG	339	GUACACUGGGAGAAUCUUC	854
	ATTCTGTGAAGGTGACCTCAGG	340	AUUCUGUGGAAGGUGACCUC	855
	TACCCAGGCTTCTGTAATCAGG	341	UACCCAGGCUUCUGUAACUC	856
	CCATTGTGAATGCTGACTTGGGG	342	CCAUUUGUAAUGCUGACUUG	857
	CAGGCCCTACCTGAGGCGAGGGG	343	CAGGCCUUAUCCUGAGGCGAG	858
	GTCCAGCTGATTTCTCCTGAGG	344	GUCCAGCUGAUUUUCUCCUG	859
	CACTCGATCCTTGAAGGATGGGG	345	CACUCGAUCCUUGAAGGAUG	860
	GCCATTTGTAATGCTGACTTGGG	346	GCCAUUUGUAAUGCUGACUU	861
LAG3	GTGCATTGTTCCGGAACCGGGG	347	GUGCAUUGGUUCCGGAACCG	862
	CGACTTTACCTTCGACTAGAGG	348	CGACUUUACCCUUCGACUAG	863
	TCGACTAGAGGATGTGAGCCAGG	349	UCGACUAGAGGAUGUGAGCC	864
	GCTTTCGCTAAGTGGTGATGGG	350	GCUUUCGCUAAGUGGUGAU	865
	CGCTACACGGTGCTGAGCGTGGG	351	CGCUACACGGUGCUGAGCGU	866
	GCGTACACTGTCAAGGGAGTTGG	352	GCGUACACUGUCAAGGGAGU	867
	AGCGCGGGGACTTCTCGCTATGG	353	AGCGCGGGGACUUCUCGCUA	868
	GCTCCAGCGTACACTGTCAAGGG	354	GCUCCAGCGUACACUGUCA	869
	GCTCACATCCTCTAGTCGAAGGG	355	GCUCACAUCCUCUAGUCGAA	870
	GGCTCACATCCTCTAGTCGAAGGG	356	GGCUCACAUCCUCUAGUCGA	871
	CGCCCCACATACTCGAGGCCTGG	357	CGCCCCACAUACUCGAGGCC	872
	CTGTGCATTGGTTCCGGAACCGG	358	CUGUGCAUUGGUUCCGGAAC	873
	TTGGTTCCGGAACCGGGGCCAGG	359	UUGGUUCCGGAACCGGGGCC	874

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	CGCTCATCCAGCTGGACGCGGGG	360	CGCUCAUCCAGCUGGACGCG	875
	TTCCGCTAAGTGGTGATGGGGGG	361	UCCCGCUAAGUGUGAUGGG	876
	CAGGCCCTCGAGTATGTGGGCGG	362	CAGGCCUCGAGUAUGUGGGG	877
	GCAAGGGATTACCCCTCCGCAGG	363	GCAAGGGAUUCACCCUCCGC	878
	AGCTTTCCGCTAAGTGGTGATGG	364	AGCUUCCGCUAAGUGGUGA	879
	CGCTCAGCACCGTGTAGCGGCGG	365	CGCUCAGCACCGUGUAGCGG	880
	CGTACACTGTCAAGGGAGTTGGG	366	CGUACACUGUCAAGGGAGUU	881
	ACCGTGTAGCGGCGGGGCTGGG	367	ACCGUGUAGCGGCGGGGCCU	882
	GCCGGCCGCGCTCATCCAGCTGG	368	GCCGGCCGCGCUCAUCCAGC	883
	CGTCCCCCCCCACATACTCGAGG	369	CGUCCCCCCCCACAUACUCG	884
	ACTCCCTTGACAGTGTACGCTGG	370	ACUCCCUUGACAGUGUACGC	885
	CGCCGGCGAGTACCGCGCGCGG	371	CGCCGGCGAGUACCGCGCCG	886
	GTTCCGGAACCAATGCACAGAGG	372	GUUCCGGAACCAUUGCACAG	887
	CGCGTCCAGCTGGATGAGCGCGG	373	CGCGUCCAGCUGGAUGAGCG	888
	GTACGCTGGAGCAGGTTCCAGGG	374	GUACGUGGAGCAGGUUCCA	889
	TCTAAGGCAGAAAAATCGTCTTGG	375	UCUAAGGCAGAAAAUCGUCU	890
	AAGCGTTCTTGTCCAGATACTGG	376	AAGCGUUCUUGUCCAGAUAC	891
	GCGAGAAGTCCCCGCGCTGCCGG	377	GCGAGAAGUCCCCGCGCUGC	892
	CACCGCGCGCGGTACTCGCCGG	378	CACCGCGCGCGGUACUCGC	893
	TCCATAGGTGCCAACGCTCTGG	379	UCCAUAGGUGCCCAACGCUC	894
	CACCGTGTAGCGGCGGGGCTGG	380	CACCGUGUAGCGGCGGGGCC	895
	GGGTGGCTCCAGGTAACCGGGG	381	GGGUGGCUCAGGUAACCG	896
	GACGTTGAAGCCATCTCTGTAGG	382	GACGUUGAAGCCAUCUCUGU	897
	GATGGGGGGACTCCCGGACAGGG	383	GAUGGGGGACUCCCGGACA	898
	AGTATGTGGGGCGGACGATGGG	384	AGUAUGUGGGGCGGGACGAU	899
	CCAGGTAACCGGGGATGGCGGG	385	CCAGGUAAAACGGGGAUAGG	900
	GGGCCAGGCCTCGAGTATGTGGG	386	GGGCCAGGCCUCGAGUAUGU	901
	GGTAAACCGGGGATGGCGGGAGG	387	GGUAAAACGGGGAUGGCGGG	902
	ACCGCGCGCGGTGCACCTCAGG	388	ACCGCGCGCGGUGCACCUC	903
	ACTCGCCGGCGTCCGCGCGCGG	389	ACUCGCGCGGUCGCGCGGC	904
	GATCTCTCAGAGCCTCCGACTGG	390	GAUCUCUCAGAGCCUCCGAC	905
	GCGGTCCCTGAGGTGCACGCGG	391	GCGGUCCUGAGGUGCACCG	906
	GTCCCCCATCACCACTTAGCGG	392	GUCCCCCAUACCACUUAAG	907
	AGAGGAAGCTTTCCGCTAAGTGG	393	AGAGGAAGCUUCCGCUAAG	908
	TGCTCCAGCGTACACTGTCAAGG	394	UGCUCCAGCGUACACUGUCA	909
	TTGACAGTGTACGCTGGAGCAGG	395	UUGACAGUGUACGCUAGAGC	910
	AGGCCTCGAGTATGTGGGCGGG	396	AGGCCUCGAGUAUGUGGGGC	911
CTLA4	ACACCGTCCCATAAAGCCATGG	397	ACACCGCUCCCAUAAAGCCA	912
	GTGCGGCAACCTACATGATGGGG	398	GUGCGGCAACCUACAUGAUG	913
	TACCCACCGCCATACTACCTGGG	399	UACCCACCGCCAUACUACCU	914
	CCGCCATACTACCTGGGCATAGG	400	CCGCCAUACUACCGGGCAU	915
	GTACCCACCGCCATACTACCTGG	401	GUACCCACCGCCAUACUACC	916
	GGGTTCCGTTGCCTATGCCCAGG	402	GGGUUCCGUUGCCUAUGCCC	917
	CATAGACCCCTGTTGTAAGAGGG	403	CAUAGACCCUGUUGUAAGA	918
	TGCCCAGGTAGTATGGCGGTGGG	404	UGCCCAGGUAGUAUGGCGGU	919
	AGGTCGCGGTGACAGTGCTTCGG	405	AGGUCCGGGUGACAGUGCUU	920
	TGAACCTGGCTACCAGGACCTGG	406	UGAACCUGGCUACCAGGACC	921
	TTGCCTATGCCAGGTAGTATGG	407	UUGCCUAUGCCCAGGUAGUA	922

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	CTGTGCGGCAACCTACATGATGG	408	CUGUGCGGCAACCUACAUGA	923
	TGTGCGGCAACCTACATGATGGG	409	UGUGCGGCAACCUACAUGAU	924
	CCGGGTGACAGTGCTTCGGCAGG	410	CCGGGUGACAGUGCUUCGGC	925
	ACATAGACCCCTGTTGTAAGAGG	411	ACAUAGACCCUGUUGUAAG	926
	CCTTGGAATTTCAGCGGCACAAGG	412	CCUUGGAUUUCAGCGGCACA	927
	GTTCACCTTGATTTCCTACTGGAGG	413	GUUCACUUGAUUUCACUGG	928
	GGCCACGTGCATTGCTAGCATGG	414	GGCCACGUGCAUUGCUAGCA	929
	TACTACCTGGGCATAGGCAACGG	415	UACUACCUGGGCAUAGGCAA	930
	GCTCACCAATTACATAAATCTGG	416	GCUCACCAAUACAUAUAUUC	931
	ACTGGAGGTGCCGTGCAGATGG	417	ACUGGAGGUGCCCGUGCAGA	932
	TTCCATGCTAGCAATGCAGTGG	418	UUCCAUGCUAGCAAUGCACG	933
	AAGGCAAGCCATGGCTTTATGGG	419	AAGGCAAGCCAUGGCUUUAU	934
	CAAGGCAAGCCATGGCTTTATGG	420	CAAGGCAAGCCAUGGCUUUA	935
	ATCTGCACGGGCACCTCCAGTGG	421	AUCUGCACGGGCACCUCCAG	936
	CACTGTCACCCGGACCTCAGTGG	422	CACUGUCACCCGGACCUCAG	937
	CCTCACTATCCAAGGACTGAGGG	423	CCUCACUAUCCAAGGACUGA	938
	CTAGATGATTCCATCTGCACGGG	424	CUAGAUGAUUCCAUCUGCAC	939
	GCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGG	425	GCUUCGGCAGGCUGACAGCC	940
	CACGGGACTCTACATCTGCAAGG	426	CACGGGACUCUACAUCUGCA	941
	ATGCCCAGGTAGTATGGCGGTGG	427	AUGCCCAGGUAGUAUGGCGG	942
	AAGAAGCCCTCTTACAACAGGGG	428	AAGAAGCCCUUACAACAG	943
	GCAAAGGTGAGTGAGACTTTTGG	429	GCAAAGGUGAGUGAGACUUU	944
	GGGACTCTACATCTGCAAGGTGG	430	GGGACUCUACAUCUGCAAGG	945
	ACCTCACTATCCAAGGACTGAGG	431	ACCUCACUAUCCAAGGACUG	946
	CAAGTGAACCTCACTATCCAAGG	432	CAAGUGAACCUACUAUCCA	947
	GCTGGCGATGCCTCGGCTGCTGG	433	GCUGGCGAUGCCUCGGCUGC	948
	CTCACCAATTACATAAATCTGGG	434	CUCACCAAUACAUAUAUUCU	949
	GGAACCCAGATTTATGTAATTGG	435	GGAACCCAGAUUUAUGUAU	950
	CCTAGATGATTCATCTGCACGG	436	CCUAGAUGAUUCCAUCUGCA	951
	AAAGAAGCCCTCTTACAACAGGG	437	AAAGAAGCCCUUACAACA	952
	GAGGTTCACCTTGATTTCCTACTGG	438	GAGGUUCACUUGAUUCCAC	953
	CGGACCTCAGTGGCTTTGCCTGG	439	CGGACCUCAGUGGCUUUGCC	954
	TGTCCATGGCCCTCAGTCCTTGG	440	UGUCCAUGGCCCUCAGUCCU	955
	ACACAAAGCTGGCGATGCCTCGG	441	ACACAAAGCUGGCGAUGCCU	956
	AAGCCATGGCTTTATGGGAGCGG	442	AAGCCAUGGCUUUAUGGGAG	957
	CTCAGCTGAACCTGGCTACCAGG	443	CUCAGCUGAACCUGGCUACC	958
	GATGTAGAGTCCCCTGTCCATGG	444	GAUGUAGAGUCCCUGUCCA	959
	AAAAGAAGCCCTCTTACAACAGG	445	AAAAGAAGCCCUUACAAC	960
	GCACGTGGCCAGCCTGCTGTGG	446	GCACGUGGCCAGCCUGCUG	961
AAVS1	GCTGCTCTGACGCGGCCGTCTGG	447	GCUGCUCUGACGCGGCCGUC	962
	TATAAGGTGGTCCCAGCTCGGGG	448	UAUAAGGUGGUCCAGCUCG	963
	GACGCAAGGGAGACATCCGTCCG	449	GACGCAAGGGAGACAUCCGU	964
	AGGGAGACATCCGTCCGAGAAGG	450	AGGGAGACAUCCGUCGGAGA	965
	CTTAGGATGGCCTTCTCCGACGG	451	CUUAGGAUGGCCUUCUCCGA	966
	CTGGTGCCTTTCACTGATCCTGG	452	CUGGUGCGUUUCACUGAUCC	967
	CAGGTAAACTGACGCACGGAGG	453	CAGGUAAAACUGACGCACGG	968
	GATCAGTGAAACGCACCAGACGG	454	GAUCAGUGAAACGCACCAGA	969
	GTCACCAATCCTGTCCCTAGTGG	455	GUCACCAAUCCUGUCCUAG	970

10

20

30

40

50

【表 1 - 10】

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	GAGAGGTGACCCGAATCCACAGG	456	GAGAGGUGACCCGAAUCCAC	971
	CCTCTAAGGTTTGCTTACGATGG	457	CCUCUAAGGUUUGCUUACGA	972
	TAAGGAATCTGCCTAACAGGAGG	458	UAAGGAAUCUGCCUACAGG	973
	ATTCCCAGGGCCGTTAATGTGG	459	AUUCCCAGGGCCGUAUAAUG	974
	CCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGG	460	CCCAAAGUACCCCGUCUCCC	975
	ATATAAGGTGGTCCAGCTCGGG	461	AUAUAAGGUGGUCCCAGCUC	976
	TAACCGGCCCTGGGAATATAAGG	462	UAACCGGCCUGGGAAUAUA	977
	CTGCATCATCACGTTTCTCTGG	463	CUGCAUCAUACCGUUUUUC	978
	TAAGAAACGAGAGATGGCACAGG	464	UAAGAAACGAGAGAUGGCAC	979
	AGAGCTAGCACAGACTAGAGAGG	465	AGAGCUAGCACAGACUAGAG	980
	GGCTACTGGCCTTATCTCACAGG	466	GGCUACUGGCCUUAUCUCAC	981
	ACCCCGTTCTCTGTGGATTCGG	467	ACCCCGUUCUCUGUGGAUU	982
	CGGAGGAACAATATAAATTGGGG	468	CGGAGGAACAAUAUAAUUG	983
	ACAGTGGGGCCACTAGGGACAGG	469	ACAGUGGGGCCACUAGGGAC	984
	CGGCCGCGTCAGAGCAGCTCAGG	470	CGGCCGCGUCAGAGCAGCUC	985
	ACGGAGGAACAATATAAATTGGG	471	ACGGAGGAACAAUAUAAUUG	986
	GGGACCACCTTATATTTCCAGGG	472	GGGACCACCUUAUAUUCCTCA	987
	TGGGACCACCTTATATTTCCAGG	473	UGGGACCACCUUAUAUUCCTC	988
	CCATCTCTCGTTTCTTAGGATGG	474	CCAUCUCUCGUUUCUUAAGGA	989
	TAAGCAAACCTTAGAGGTTCTGG	475	UAAGCAAACCUUAGAGGUUC	990
	CGTCAGAGCAGCTCAGGTTCTGG	476	CGUCAGAGCAGCUCAGGUUC	991
	GACCCGAATCCACAGGAGAACGG	477	GACCCGAUCCACAGGAGAA	992
	AGAGCCACATTAACCGGCCCTGG	478	AGAGCCACAUAACCGGCCCC	993
	TCACAGGTAAAACCTGACGCACGG	479	UCACAGGUAAAACUGACGCA	994
	TTCTGGGAGAGGGTAGCGCAGGG	480	UUCUGGGAGAGGGUAGCGCA	995
	GGATCCTGTGTCCCGAGCTGGG	481	GGAUCCUGUGUCCCGAGCU	996
	TGGGGGTTAGACCAATATCAGG	482	UGGGGGUAGACCCAAUAUC	997
	GTCCCTAGTGGCCCCACTGTGGG	483	GUCCCUAGUGGCCCCACUGU	998
	TGTTAGGCAGATTCTTATCTGG	484	UGUUAGGCAGAUUCCUUAUC	999
	AAACCTTAGAGGTTCTGGCAAGG	485	AAACCUUAGAGGUUCUGGCA	1000
	CTGGACACCCCGTTCTCCTGTGG	486	CUGGACACCCCGUUCUCCUG	1001
	GGGGGGATGCGTGACCTGCCCGG	487	GGGGGGAUGCGUGACCUGCC	1002
	GGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGG	488	GGUUAUUGUGGCUCUGGUUC	1003
	TGATGCAGGCCTACAAGAAGGG	489	UGAUGCAGGCCUACAAGAAG	1004
	TAGCTGAGCTCTCGGACCCCTGG	490	UAGCUGAGCUCUCGGACCCC	1005
	TGCTTACGATGGAGCCAGAGAGG	491	UGCUUACGAUGGAGCCAGAG	1006
	TGCTGTCCTGAAGTGGACATAGG	492	UGCUGUCCUGAAGUGGACAU	1007
	CTGTCCTGAAGTGGACATAGGGG	493	CUGUCCUGAAGUGGACAUAG	1008
	CAGGGAGACGGGGTACTTTGGGG	494	CAGGGAGACGGGGUACUUUG	1009
	ATGATGCAGGCCTACAAGAAGGG	495	AUGAUGCAGGCCUACAAGAA	1010
	ACCCGAATCCACAGGAGAACGGG	496	ACCCGAUCCACAGGAGAAC	1011
	GCAAACATGCTGTCTGAAGTGG	497	GCAAACAUGCUGUCCUGAAG	1012
	GACATAGGGGCCCGGTTGGAGG	498	GACAUAGGGGCCCGGGUUGG	1013
	TGGGGGTGTGTACCCAGATAAGG	499	UGGGGGUGUGUACCAGAUUA	1014
	TGGCTAAAGCCAGGGAGACGGGG	500	UGGCUAAAGCCAGGGAGACG	1015
	TTGGTCCTGAGTTCTAACTTTGG	501	UUGGUCCUGAGUUCUAACUU	1016
	TCCCTAGTGGCCCCACTGTGGGG	502	UCCCUAGUGGCCCCACUGUG	1017
	CAGAAAAACGGTGATGATGCAGG	503	CAGAAAAACGGUGAUGAUGC	1018

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	CTTCCTAGTCTCCTGATATTGGG	504	CUUCCUAGUCUCCUGAUUU	1019
	CACGGAGGAACAATATAAATTGG	505	CACGGAGGAACAAUUAUAAU	1020
	GAACCTGAGCTGCTCTGACGCGG	506	GAACCUGAGCUGCUCUGACG	1021
	GAGCCACATTAACCGGCCCTGGG	507	GAGCCACAUUAACCGGCCCU	1022
	ACCCACAGTGGGGCCACTAGGG	508	ACCCACAGUGGGGCCACUA	1023
	GTCCCGCTCCCTTCTTGTAGG	509	GUCCCGCCUCCCUUCUUGU	1024
	CCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGG	510	CCCCGUUCUCCUGUGGAUUC	1025
	CCACCTTATATTCAGGGCCGG	511	CCACCUUAUUAUCCAGGGC	1026
	TCAGTTTACACCCGATCCACTGG	512	UCAGUUUACACCCGAUCCAC	1027
	AGTTTACACCCGATCCACTGGGG	513	AGUUUACACCCGAUCCACUG	1028
CCR5	TCATCCTCCTGACAATCGATAGG	514	UCAUCCUCCUGACAAUCGAU	1029
	CTTGTGACACGGACTCAAGTGGG	515	CUUGUGACACGGACUCAAGU	1030
	CAGTTTACACCCGATCCACTGGG	516	CAGUUUACACCCGAUCCACU	1031
	ACAATGTGTCAACTCTTGACAGG	517	ACAAUGUGUCAACUCUUGAC	1032
	GGTACCTATCGATTGTGACGAGG	518	GGUACCUAUCGAUUGUCAGG	1033
	GTAAACTGAGCTTGCTCGCTCGG	519	GUAAACUGAGCUUGCUCGCU	1034
	GACAAGTGTGATCACTTGGGTGG	520	GACAAGUGUGAUCACUUGGG	1035
	TCTGAACCTCTCCCGACAAAGG	521	UCUGAACUUCUCCCGACAA	1036
	CCTGACAATCGATAGGTACCTGG	522	CCUGACAAUCGAUAGGUACC	1037
	CTCGCTCGGGAGCCTCTTGCTGG	523	CUCGCUCGGGAGCCUCUUGC	1038
	CAGGTTGGACCAAGCTATGCAGG	524	CAGGUUGGACCAAGCUAUGC	1039
	TGACCATGACAAGCAGCGGCAGG	525	UGACCAUGACAAGCAGCGGC	1040
	CACCCCAAAGGTGACCGTCCTGG	526	CACCCCAAAGGUGACCGUCC	1041
	TAAACTGAGCTTGCTCGCTCGGG	527	UAAACUGAGCUUGCUCGCUC	1042
	TCACTATGCTGCCGCCAGTGGG	528	UCACU AUGCUGCCGCCAGU	1043
	AGCGTTTGGCAATGTGCTTTTGG	529	AGCGUUUGGCAAUGUGCUUU	1044
	TTGACAGGGCTCTATTTTATAGG	530	UUGACAGGGCUCUAUUUUU	1045
	CATCATCTATGCCTTTGTCGGGG	531	CAUCAUCUAUGCCUUUGUCG	1046
	CAATGTGTCAACTCTTGACAGGG	532	CAUUGUGUCAACUCUUGACA	1047
	TTGCAGTAGCTCTAACAGGTTGG	533	UUGCAGUAGCUCUAACAGGU	1048
	GCTGCCGCCAGTGGGACTTTGG	534	GCUGCCGCCAGUGGGACUU	1049
	AAGCCAGGACGGTCACCTTTGGG	535	AAGCCAGGACGGUACCCUUU	1050
	TGACACGGACTCAAGTGGGCTGG	536	UGACACGGACUCAAGUGGGC	1051
	CGACAAAGGCATAGATGATGGGG	537	CGACAAAGGCAUAGAUGAUG	1052
	ATAATTGCAGTAGCTCTAACAGG	538	AUAAUUGCAGUAGCUCUAA	1053
	CAGGACGGTCACCTTTGGGCTGG	539	CAGGACGGUACCCUUUGGGG	1054
	AGCCAGGACGGTCACCTTTGGGG	540	AGCCAGGACGGUACCCUUUG	1055
	CAGAATTGATACTGACTGTATGG	541	CAGAAUUGAUACUGACUGUA	1056
	GACACCGAAGCAGAGTTTCTAGG	542	GACACCGAAGCAGAGUUUUU	1057
	GGTGACAAGTGTGATCACTTGGG	543	GGUGACAAGUGUGAUCACUU	1058
	AACACCAGTGAGTAGAGCGGAGG	544	AACACCAGUGAGUAGAGCGG	1059
	CTCACTATGCTGCCGCCAGTGG	545	CUCACU AUGCUGCCGCCAG	1060
	CTGTTCTATTTCCAGCAAGAGG	546	CUGUUCUAUUUCCAGCAAG	1061
	TGTCATGGTCATCTGCTACTCGG	547	UGUCAUGGUCAUCUGCUACU	1062
	CCATCATCTATGCCTTTGTCGGG	548	CCAUCAUCUAUGCCUUUGUC	1063
	GTCATGGTCACTGCTACTCGGG	549	GUCAUGGUCAUCUGCUACUC	1064
	CATACAGTCAGTATCAATTCTGG	550	CAUACAGUCAGUAUCAAUUC	1065
	TTTACCAGATCTCAAAAAGAAGG	551	UUUACCAGAUUCUAAAAAGA	1066

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 2】

標的遺伝子 (CGIなし)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	ACAGCATTTGCAGAAGCGTTTGG	552	ACAGCAUUUGCAGAAGCGUU	1067
	ATATCTGTGGGCTTGTGACACGG	553	AUAUCUGUGGGCUUGUGACA	1068
	AAGTGTGATCACTTGGGTGGTGG	554	AAGUGUGAUCACUUGGGUGG	1069
	TTGTATTTCCAAAGTCCCCTGG	555	UUGUAUUUCCAAAGUCCCAC	1070
	CCCATCATCTATGCCCTTGTCTGG	556	CCCAUCAUCUAUGCCUUUGU	1071
	TGTATTTCCAAAGTCCCCTGGG	557	UGUAUUUCCAAAGUCCCACU	1072
	ATGCAGGTGACAGAGACTCTTGG	558	AUGCAGGUGACAGAGACUCU	1073
	TCAGCCTTTTGCAGTTTATCAGG	559	UCAGCCUUUUGCAGUUUAUC	1074
	AAAGATAGTCATCTTGGGGCTGG	560	AAAGAUAGUCAUCUUGGGGC	1075
	AAAGCCAGGACGGTCACCTTGG	561	AAAGCCAGGACGGUCACCUU	1076

10

【0292】

本発明の産生物は、CpGアイランド(CGI)を有する遺伝子を改変、例えば抑制又はサイレンシングするために用いてよい。CGIを有する遺伝子には、B2M、TET2、TGFB2、A2AR、CISH、PTPN11、PTPN6、PTPA、PTPN2、JUNB、TOX、TOX2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、MAP4K1、REL、IRF4、DGKA、PIK3CD、HLA-A、USP16、DCK、及びFASが含まれる。

20

【0293】

例えば、標的遺伝子、例えばCGIを有する遺伝子は、同種産生物を産生し得る(例えばB2M及び/又はHLA-Aを標的とすることによって)、免疫抑制性腫瘍微小環境に対する耐性を変化させ得る(例えばTGFB2、A2AR、PTPN11、PTPN6、PTPN2、及び/又はDGKAを標的とすることによって)、安全な部位におけるCAR/トランスジェニックTCRの一体化を可能にし得る(例えばAAVS1及び/又はCCR5を標的とすることによって)、消耗に対する耐性を提供し得る(例えばFAS、CISH、PTPA、PIK3CD、MAP4K1、NR4A1、NR4A2、NR4A3、JUNB、REL、TOX、TOX2、IRF4、及び/又はTET2を標的とすることによって)、及び/又はT細胞の老化を遅延させ得る(例えばUSP16を標的とすることによって)。

30

【0294】

TCR遺伝子、即ちPDCD1及びCTLA4のサイレンシングは、がん免疫療法アプローチの有効性を改善するために用いてよい。

【0295】

B2Mのサイレンシングは、移植のために用いられる同種HSPC、T細胞、又は間葉細胞を生成するために用いてよい。

【0296】

一態様では、本発明は、配列番号1077~2777のいずれか1つで説明される配列を標的とするgRNAを提供する。

40

【0297】

例として、CGIアイランドを有する標的遺伝子及び前記遺伝子を標的とするために適した例示的なgRNAを、下の表2に提示する(SEQ:配列番号)。

【0298】

50

【表 2 - 1】

表2. CGIアイランドを有する標的遺伝子及び例示的なgRNA

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
B2M	CGATAAGCGTCAGAGCGCCGAGG	1077	CGAUAAGCGUCAGAGCGCCG	2778
	TTTGGCCTACGGCGACGGGAGGG	1078	UUUGGCCUACGGCGACGGGA	2779
	CATCGGCGCCCTCCGATCTGGGG	1079	CAUCGGCGCCCUCCGAUCUG	2780
	CTTTGGCCTACGGCGACGGGAGG	1080	CUUUGGCCUACGGCGACGGG	2781
	TATAAGTGAGGCGTCGCGCTGG	1081	UAUAAGUGGAGGCGUCGCGC	2782
	CTCCCGTCGCCGTAGGCCAAAGG	1082	CUCCCGUCGCCGUAGGCCAA	2783
	GACCTTTGGCCTACGGCGACGGG	1083	GACCUUUGGCCUACGGCGAC	2784
	AGACCTTTGGCCTACGGCGACGG	1084	AGACCUUUGGCCUACGGCGA	2785
	CGCTACTTGCCCTTTTCGGCGGG	1085	CGCUACUUGCCCCUUCGGC	2786
	ACATCGGCGCCCTCCGATCTGGG	1086	ACAUCGGCGCCCUCCGAUCU	2787
	CGCGCGCTACTTGCCCTTTTCGG	1087	CGCGCGCUACUUGCCCCUUU	2788
	TACATCGGCGCCCTCCGATCTGG	1088	UACAUCGGCGCCCUCCGAUC	2789
	GTCCGAGCAGTTAACTGGCTGGG	1089	GUCCGAGCAGUUAACUGGCU	2790
	CACGCGTTTAAATATAAGTGAGG	1090	CACGCGUUUAAUAUAAGUGG	2791
	CGCGACGTTTGTAGAATGCTTGG	1091	CGCGACGUUUGUAGAAUGCU	2792
	GGGCACGCGTTTAAATATAAGTGG	1092	GGGCACGCGUUUAAUAUAAG	2793
	GCTACTTGCCCTTTTCGGCGGGG	1093	GCUACUUGCCCCUUCGGCG	2794
	AAGCGTCAGAGCGCCGAGGTTGG	1094	AAGCGUCAGAGCGCCGAGGU	2795
	GCGCTACTTGCCCTTTTCGGCGG	1095	GCGCUACUUGCCCCUUCGG	2796
	AAGTGAGGCGTCGCGCTGGCGG	1096	AAGUGGAGGCGUCGCGUGG	2797
	GCCTACGGCGACGGGAGGGTCGG	1097	GCCUACGGCGACGGGAGGGU	2798
	GGTCCGAGCAGTTAACTGGCTGG	1098	GGUCCGAGCAGUUAACUGGC	2799
	AGCGTCAGAGCGCCGAGGTTGGG	1099	AGCGUCAGAGCGCCGAGGUU	2800
	GAACGCGTGAGGGGGCGCTTGGG	1100	GAACGCGUGGAGGGGGCGCUU	2801
	GGCGCTCATTCTAGGACTTCAGG	1101	GGCGCUCAUUCUAGGACUUC	2802
	TTCGCATGTCCTAGCACCTCTGG	1102	UUCGCAUGUCCUAGCACCUC	2803
	AACCTCAGCGCCGCGCCTTTGGG	1103	AACCUCAGCGCCGCGCCUUU	2804
	CTCCTTGGTGGCCCCGCGTGGGG	1104	CUCCUUGGUGGCCCCGCGUG	2805
	ACTCACGCTGGATAGCCTCCAGG	1105	ACUCACGUGGAUAGCCUCC	2806
	GGCGCGCACCCCAGATCGGAGGG	1106	GGCGCGCACCCCAGAUCCGA	2807
	TCGCATGTCCTAGCACCTCTGGG	1107	UCGCAUGUCCUAGCACCUCU	2808
	AACGCGTGAGGGGGCGCTTGGGG	1108	AACGCGUGGAGGGGGCGCUUG	2809
	TTCTCTTCCGCTCTTTCGCGGGG	1109	UUCUCUCCGCUCUUUCGCG	2810

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	GACGGGTAGGCTCGTCCCAAAGG	1110	GACGGGUAGGCUCGUCCCAA	2811
	CCCCCGGTGGGGCTAGTCCAGGG	1111	CCCCCGUGGGGCUAGUCCA	2812
	GAGTAGCGCGAGCACAGCTAAGG	1112	GAGUAGCGCGAGCACAGCUA	2813
	GGGGCAAGTAGCGCGCTCCCGG	1113	GGGGCAAGUAGCGCGGUCC	2814
	AGCGCCCGGTGTCCCAAGCTGGG	1114	AGCGCCCGGUGUCCCAAGCU	2815
	CCTACGGCGACGGGAGGGTCGGG	1115	CCUACGGCGACGGGAGGGUC	2816
	CAAGCCAGCGACGCGAGTGCCAGG	1116	CAAGCCAGCGACGCGAGUGCC	2817
	AAACCTCAGCGCCGCGCCTTTGG	1117	AAACCUCAGCGCCGCGCCUU	2818
	TGAACGCGTGAGGGGCGCTTGG	1118	UGAACGCGUGGAGGGGCGCU	2819
	CTAACCTGGCACTGCGTCGCTGG	1119	CUAACUGGCACUGCGUCGC	2820
	CGTCAGAGCGCCGAGGTTGGGGG	1120	CGUCAGAGCGCCGAGGUUGG	2821
	GGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGG	1121	GGCCGAGAUGUCUGCUCCG	2822
	GCTAGGACATGCGAACTTAGCGG	1122	GCUAGGACAUGCGAACUUAG	2823
	CGCTGAGGTTTGTGAACGCGTGG	1123	CGCUGAGGUUUUGUAACGCG	2824
	GGGCGCGCACCCAGATCGGAGG	1124	GGGCGCGCACCCAGAUCCG	2825
	AAACGCGTGCCAGCCAATCAGG	1125	AAACGCGUGCCAGCCAAUC	2826
	TGCAGGTCCGAGCAGTTAACTGG	1126	UGCAGGUCCGAGCAGUUAAC	2827
	GGACACCGGGCGCTCATTCTAGG	1127	GGACACCGGGCGCUAUUCU	2828
	CCGCTCTTTGCGGGGCTCTGG	1128	CCGCUUUUCGCGGGGCCUC	2829
	GTAGGCTCGTCCCAAAGGCGCGG	1129	GUAGGUCGUCCCAAAGGCG	2830
	TCCGAGCAGTTAACTGGCTGGGG	1130	UCCGAGCAGUUAACUGGCUG	2831
	TAGTCCAGGGCTGGATCTCGGGG	1131	UAGUCCAGGGCUGGAUCUCG	2832
	CTAGGACATGCGAACTTAGCGGG	1132	CUAGGACAUGCGAACUUAGC	2833
	AGTGGAGGCGTCGCGCTGGCGGG	1133	AGUGGAGGCGUCGCGUGGC	2834
	TCTATGTGGGGCCACACCGTGGG	1134	UCUAUGUGGGGCCACACCGU	2835
	CTATGTGGGGCCACACCGTGGGG	1135	CUAUGUGGGGCCACACCGUG	2836
	GCGTCAGAGCGCCGAGGTTGGGG	1136	GCGUCAGAGCGCCGAGGUUG	2837
	GCGCCCGGTGTCCCAAGCTGGGG	1137	GCGCCCGGUGUCCCAAGCUG	2838
	CGCAGCAGACAGGCTTACCCGGG	1138	CGCAGCAGACAGGCUUACCC	2839
	CAATCAGGACAAGGCCCGCAGGG	1139	CAAUCAGGACAAGGCCCGCA	2840
	GAGTCTCGTGATGTTTAAGAAGG	1140	GAGUCUCGUGAUGUUUAAGA	2841
	TGGATCTCGGGGAAGCGGCGGGG	1141	UGGAUCUCGGGGAAGCGGCG	2842
	CATCACGAGACTCTAAGAAAAGG	1142	CAUCACGAGACUCUAAGAAA	2843
	GGGCAAGTAGCGCGCTCCCGGG	1143	GGGCAAGUAGCGCGGUCCC	2844
	GAGGGTCGGGACAAAGTTTAGGG	1144	GAGGGUCGGGACAAAGUUUA	2845
	GCCCCCTTCGCGGGGAGCAGGG	1145	GCCCCUUUCGCGGGGAGCA	2846
	TCTCCTTGGTGGCCCCGCCGTGGG	1146	UCUCCUUGGUGGCCCGCCGU	2847
	TCCCCTGCTCCCCGCCGAAAGGG	1147	UCCCCUGCUCCCGCCGAAA	2848
	GCCCGCCGTGGGGCTAGTCCAGG	1148	GCCCGCCGUGGGGCUAGUCC	2849
	TGCCCCCTTCGGCGGGGAGCAGG	1149	UGCCCCUUUCGGCGGGGAGC	2850
	GAGGTTTGTGAACGCGTGGAGGG	1150	GAGGUUUGUAACGCGUGGA	2851
	TGGGGTGCGCGCCCCAGCTTGGG	1151	UGGGGUGCGCGCCCCAGCUU	2852

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	AGGTTTGTGAACGCGTGGAGGGG	1152	AGGUUUGUGAACGCGUGGAG	2853
	GCCCGAATGCTGTCTAGCTTCAGG	1153	GCCCGAAUGCUGUCAGCUUC	2854
	GAGAGCTGTGGACTTCGTCTAGG	1154	GAGAGCUGUGGACUUCGUCU	2855
	CTAGCACCTCTGGGTCTATGTGG	1155	CUAGCACCUUGGGUCUAUG	2856
	CCGGGTAAGCCTGTCTGCTGCGG	1156	CCGGGUAAGCCUGUCUGCUG	2857
	CGCAGTGCCAGGTAGAGAGAGG	1157	CGCAGUGCCAGGUUAGAGAG	2858
	TGAGGTTTGTGAACGCGTGGAGG	1158	UGAGGUUUGUGAACGCGUGG	2859
	AGCCCCACGGCGGGCCACCAAGG	1159	AGCCCCACGGCGGGCCACCA	2860
	TGCGTCGCTGGCTTGGAGACAGG	1160	UGCGUCGUGGCUUGGAGAC	2861
	GGCCACGGAGCGAGACATCTCGG	1161	GGCCACGGAGCGAGACAUCU	2862
	GCGGGCCACCAAGGAGAACTTGG	1162	GCGGGCCACCAAGGAGAACTT	2863
	TTCTCCTTGGTGGCCCGCGTGG	1163	UUCUCCUUGGUGGCCCGCGG	2864
	CCTGCGGGCCTTGTCTGATTGG	1164	CCUGCGGGCCUUGUCCUGAU	2865
	GCCCCAGCCAGTTAACTGCTCGG	1165	GCCCCAGCCAGUUAACUGCU	2866
	CTGGATCTCGGGGAAGCGGCGGG	1166	CUGGAUCUCGGGGAAGCGGC	2867
	CTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGG	1167	CUCGCGCUACUCUCUCUUUC	2868
	CGCGAGCACAGCTAAGGCCACGG	1168	CGCGAGCACAGCUAAGGCCA	2869
	GAAAGTCCCTCTCTCTAACCCTGG	1169	GAAAGUCCUCUCUCUAACC	2870
	GTCCCAAAGGCGGGCGCTGAGG	1170	GUCCCAAAGGCGGGCGGCGUG	2871
	CGGGCCTTGTCTGATTGGCTGG	1171	CGGGCCUUGUCCUGAUUGGC	2872
	CGGAGCGAGAGAGCACAGCGAGG	1172	CGGAGCGAGAGAGCACAGCG	2873
	GTCTATGTGGGGCCACACCGTGG	1173	GUCUAUGUGGGGCCACACCG	2874
	CGGCTCTGCTTCCCTTAGACTGG	1174	CGGCUCUGCUUCCCUAGAC	2875
	CTCATCTAGGACTTCAGGCTGG	1175	CUCAUUCUAGGACUUCAGGC	2876
	CGCGCCCCAGCTTGGGACACCGG	1176	CGCGCCCCAGCUUGGGACAC	2877
	AGGGTAGGAGAGACTCACGCTGG	1177	AGGGUAGGAGAGACUCACGC	2878
HLA-A	GGCGCTTCTCCGCGGGTACCGG	1178	GGCGCUUCCUCCGCGGGUAC	2879
	GAGTCCCGGTGGGTGCGTGCGGG	1179	GAGUCCCGGUGGGUGCGUGC	2880
	CAGACTGACCGAGTGGACCTGGG	1180	CAGACUGACCGAGUGGACCU	2881
	TACCGGCAGGACGCTACGACGG	1181	UACCGGCAGGACGCCUACGA	2882
	TGGTACAGGATCTGGAACCCAGG	1182	UGGUACAGGAUCUGGAACCC	2883
	CGTCCTGCCGGTACCCGCGGAGG	1183	CGUCCUGCCGGUACCCGCGG	2884
	AGGCGTCTTGCCGGTACCCGCGG	1184	AGGCGUCCUGCCGGUACCCG	2885
	CTTCCTCCGCGGGTACCCGCGAGG	1185	CUUCCUCCGCGGGUACCCGG	2886
	ACAGACTGACCGAGTGGACCTGG	1186	ACAGACUGACCGAGUGGACC	2887
	CCAGTCACAGACTGACCGAGTGG	1187	CCAGUCACAGACUGACCGAG	2888
	TGCCGTCGTAGGCTCCTGCCGG	1188	UGCCGUCGUAGGCGUCCUGC	2889
	CAGGATGAAGGACCTACGTAGG	1189	CAGGAUGAAGGACCCUACGU	2890
	GACCAACCCGGGGGATTTTGG	1190	GACCAACCCGGGGGAUUUU	2891
	TACAGGATCTGGAACCCAGGAGG	1191	UACAGGAUCUGGAACCCAGG	2892
	ACGACACTGATTGGCTTCTCTGG	1192	ACGACACUGAUUGGCUUCUC	2893
	GGCCAAAAATCCCCCGGGTTGG	1193	GGCCAAAAAUCCCCCGGGU	2894

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	GGCCCGTCCGTGGGGGATGAGGG	1194	GGCCCGUCCGUGGGGAUGA	2895
	TCCTGGCGGGGCGCAGGACCGG	1195	UCCUGGCGGGGCGCAGGAC	2896
	GCGACCGCGACGACACTGATTGG	1196	GCGACCGCGACGACACUGAU	2897
	CTACGTAGGTCCTTCATCCTGG	1197	CUACGUAGGUGCCUUAUCC	2898
	TTTAGGCCAAAAATCCCCCGGG	1198	UUUAGGCCAAAAUCCCCC	2899
	GAGGTTTCGGGCGCCATGACGG	1199	GAGGDUUCGGGCGCCAUGA	2900
	TGAAGGACCTACGTAGGTTGGG	1200	UGAAGGACCUACGUAGGUU	2901
	CGCCTCTCGGGGAGAAGCAAGG	1201	CGCCUCUGCGGGGAGAAGCA	2902
	GCCCGTCCGTGGGGGATGAGGGG	1202	GCCCGUCCGUGGGGAUGAG	2903
	ACCCTCATCCCCACGGACGGG	1203	ACCCCUCAUCCCCACGGAC	2904
	TCAGGACCCTCATCCCCACGG	1204	UCAGGACCUCUCCCCCA	2905
	TGGGCGACCTGGCCCGTCCGTGG	1205	UGGGCGACCUGGCCCGUCCG	2906
	GACCCTACGTAGGTTGGGAGAGG	1206	GACCCUACGUAGGUUGGGAG	2907
	GACGCCGAGGATGGCCGTCATGG	1207	GACGCCGAGGAUGCCGUCA	2908
	TTACATCCGTGTCCCGGCCCGG	1208	UUCACAUCCGUGUCCCGGCC	2909
	GACGCCATCCTCGGCGTCTGGG	1209	GACGCCAUCCUCGGCGUCU	2910
	ACCTACGTAGGTTGGGAGAGGG	1210	ACCUACGUAGGUUGGGAGA	2911
	ACGCCATCCTCGGCGTCTGGGG	1211	ACGCCAUCCUCGGCGUCUG	2912
	ATGAAGGACCTACGTAGGTTGG	1212	AUGAAGGACCUACGUAGGU	2913
	AAGCAAGGGGCCCTCTGGCGGG	1213	AAGCAAGGGGCCUCCUGGC	2914
	TGACGGCCATCCTCGGCGTCTGG	1214	UGACGGCCAUCCUCGGCGUC	2915
	AGGCGCCTGGGCCTCTCCCGGG	1215	AGGCGCCUGGGCCUCUCCG	2916
	ATTTCTTACATCCGTGTCCCGG	1216	AUUUCUACAUCCGUGUCC	2917
	TCTCCCGGGCAAGGGTCTCGGG	1217	UCUCCCGGGCAAGGUCUC	2918
	TCCCTCTCCAACCTACGTAGGG	1218	UCCUCUCCCAACCUACGUA	2919
	GGGCGACCTGGCCGTCCGTGGG	1219	GGGCGACCUGGCCGUCCGU	2920
	GAAGCAAGGGGCCCTCTGGCGG	1220	GAAGCAAGGGGCCUCCUGG	2921
	GTCTCGGGTCCCGCGGCTTCGG	1221	GUCUCGGGUCCCGCGGUU	2922
	GCGAGTTGGGGAATCCCAAGG	1222	GCGAGUUGGGGAUCCCCA	2923
	GCGCCGCGGCTCCATCCTCTGG	1223	GCGCCGCGGCUCCAUCUC	2924
	TCTCGGGTCCCGCGGCTTCGGG	1224	UCUCGGGUCCCGCGGUUC	2925
	GACCCCTCATCCCCACGGACGG	1225	GACCCCUCAUCCCCACGGA	2926
	AGCAAGGGGCCCTCTGGCGGGG	1226	AGCAAGGGGCCUCCUGGCG	2927
	CATCCTGGATACTCACGACGCGG	1227	CAUCCUGGAUACUACGACG	2928
TGFB2	TCGGTCTATGACGAGCAGCGGGG	1228	UCGGUCUAUGACGAGCAGCG	2929
	GAGTGAGTCACTCGCGCGCACGG	1229	GAGUGAGUCACUCGCGCA	2930
	TGCTGGCGATACGCGTCCACAGG	1230	UGCUGGCGAUACGCGUCCAC	2931
	CGTTGTGTTGGCCGCTTCGAGG	1231	CGUUGUGUUGGCCGCGUUCG	2932
	GTGGGGGCTCGCCTCGAACGCGG	1232	GUGGGGCUCCGCUCAACG	2933
	TGGGCACGCGGCATCGCCATGGG	1233	UGGGCACGCGGCAUCGCCAU	2934
	CTTCTCTGTTTCCGCGCGGGGG	1234	CUUCCUCGUUCCGCGCGG	2935
	GCACGCGGCATCGCCATGGGCGG	1235	GCACGCGGCAUCGCCAUGGG	2936

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	GAAACTCCTCGCCAACAGCTGGG	1236	GAAACUCCUCGCCAACAGCU	2937
	GCCCCACTCCCGTAGCTGCAGGG	1237	GCCCCGACUCCCGUAGCUGCA	2938
	GA CTGTCAAGCGCAGCGGAGAGG	1238	GACUGUCAAGCGCAGCGGAG	2939
	AGTCGGCCAAAGCTCTCGGAGGG	1239	AGUCGGCCAAAGCUCUCGGA	2940
	TGGTTATCTGAAGGCGGCCGGGG	1240	UGGUUAUCUGAAGGCGGCCG	2941
	AACGTGCGGTGGGATCGTGCTGG	1241	AACGUGCGGUGGGAUCGUGC	2942
	ACTTTCCTCGTTTCCGCCCGGGG	1242	ACUUUCCUCGUUUCGCCCG	2943
	TCTCCGCTGCGCTTGACAGTCGG	1243	UCUCCGCGUGCGCUUGACAGU	2944
	GGACGATGTGCAGCGGCCACAGG	1244	GGACGAUGUGCAGCGGCCAC	2945
	CTCGGTCTATGACGAGCAGCGGG	1245	CUCGGUCUAUGACGAGCAGC	2946
	GTGGGCACGCGGCATCGCCATGG	1246	GUGGGCACGCGGCAUCGCCA	2947
	GTCGGCCAAAGCTCTCGGAGGGG	1247	GUCGGCCAAAGCUCUCGGAG	2948
	TCACCCGACTTCTGAACGTGCGG	1248	UCACCCGACUUCUGAACGUG	2949
	ACGTTCAAGAGTCGGGTGAGTGG	1249	ACGUUCAGAAGUCGGGUGAG	2950
	GTTCAAGTTGCAAGGGGCGCGGGG	1250	GUUCAGUUGCAAGGGGCGCG	2951
	CGGCATCGCCATGGGCGGAGTGG	1251	CGGCAUCGCCAUGGGCGGAG	2952
	GCTCGGTCTATGACGAGCAGCGG	1252	GCUCGGUCUAUGACGAGCAG	2953
	GACAGTCGGGCCCCGGCAACCCGG	1253	GACAGUCGGGCCCCGGCAACC	2954
	CGCGTGACCCGCTCGGGACAGG	1254	CGCGUGCACCCGUCGGGAC	2955
	CTCCGCTGCGCTTGACAGTCGGG	1255	CUCCGUCGCGCUUGACAGUC	2956
	TGGCGAGCGGGCGCCACATCTGG	1256	UGGCGAGCGGGCGCCACAUC	2957
	AACTTCAACTCAGCGCTGCGGGG	1257	AACUUAACUCAGCGCUGCG	2958
	ACTTCAACTCAGCGCTGCGGGG	1258	ACUUAACUCAGCGCUGCGG	2959
	GTCCCGAGCGGGTGACGCGCGG	1259	GUCCCGAGCGGGUGACGCG	2960
	AGCCCGACTCCCGTAGCTGCAGG	1260	AGCCCGACUCCCGUAGCUGC	2961
	AACTTTCCTCGTTTCCGCCCGGG	1261	AACUUUCCUCGUUUCGCCCC	2962
	GCCTTTCCTGCTCGCACAAAGGG	1262	GCCUUUCCUCGUCGCACAAA	2963
	GGCCCGACTGTCAAGCGCAGCGG	1263	GGCCCGACUGUCAAGCGCAG	2964
	GTCGGGCTGCGTGAGTGTCGCGG	1264	GUCGGGCGCGUGAGUGUCG	2965
	TTGGTCCCCTTTGTGCGAGCAGG	1265	UUGGUCCCCUUUGGCGAGC	2966
	CGCAGCGGACGGCGCCTTCCCGG	1266	CGCAGCGGACGGCGCCUCC	2967
	CTCGTTTCCGCCCGGGGGCCGGG	1267	CUCGUUUCGCCCGGGGGCC	2968
	CCTCGTTTCCGCCCGGGGGCCGG	1268	CCUCGUUUCGCCCGGGGGC	2969
	AGTCCGGCTCCTGTCCCGAGCGG	1269	AGUCCGGCUCUCCGAG	2970
	GTGGCCGTCTCCAGGAGCTAAGG	1270	GUGGCCGUCUCCAGGAGCUA	2971
	GGCAGCTACGAGAGAGCTAGGGG	1271	GGCAGCUACGAGAGAGCUAG	2972
	TCAAGCGCAGCGGAGAGGCGGGG	1272	UCAAGCGCAGCGGAGAGGCG	2973
	CCCACCGCACGTTTCAAGTTCGG	1273	CCCACCGCACGUUCAGAAGU	2974
	TGGCAGCTACGAGAGAGCTAGGG	1274	UGGCAGCUACGAGAGAGCUA	2975
	GAGCTGGCCTTTTGAACGGGTGG	1275	GAGCUGGCCUUUUGAACGGG	2976
	TGTCAAGCGCAGCGGAGAGGCGG	1276	UGUCAAGCGCAGCGGAGAGG	2977
	CGAGCAGCGGGTCTGCCATGGG	1277	CGAGCAGCGGGUCUGCCAU	2978

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	TTCTTTAGGTCGAAGTCTAGAGG	4539	UUCUUUAGGUCGAAGUCUAG	4553
	GTGCTCGCGACTCAATAGATTGG	4540	GUGCUCGCGACUCAAUAGAU	4554
	AACGCATCTCTAAAGCACCTAGG	4541	AACGCAUCUCUAAAGCACCU	4555
	CTGATCTACTAGGGAAAACGTGG	4542	CUGAUCUACUAGGGAAAACG	4556
	TTGAGTAAATACTTGGAGCGAGG	4543	UUGAGUAAAUAUUGGAGCG	4557
	GGGGCCTCCCCGCGCCTCGCCGG	4544	GGGGCCUCCCCGCGCCUCGC	4558
	CCTGAGCAGCCCCGACCCATGG	4545	CCUGAGCAGCCCCGACCCA	4559
A2AR	AAGGTTTCATGCGAGCGCGGGG	1278	AAGGUUCAUGCGAGCGCGG	2979
	GAAGGTTTCATGCGAGCGCGGG	1279	GAAGGUUCAUGCGAGCGCG	2980
	ATTTGGCGCAAGGCGGCCAAGG	1280	AUUUGGCGCAAGGCGGCCA	2981
	TCCTGGAAGGACGATCCCGCAGG	1281	UCCUGGAAGGACGAUCCCGC	2982
	CGAAGGTTTCATGCGAGCGCGGG	1282	CGAAGGUUCAUGCGAGCGCG	2983
	GTCTGCGGCGCATGGACGGACGG	1283	GUCUGCGGCGCAUGGACGGA	2984
	TCCGTCCCCGTCGTCTCCTGGG	1284	UCCGUCCCCGUCGUCUCCU	2985
	TCCGTCCATGCGCCGACACCGG	1285	UCCGUCCAUGCGCCGACAG	2986
	AACTGCACCGGAAGGCGCGCAGG	1286	AACUGCACCGGAAGGCGCGC	2987
	GTGGCGGCTCTCGAGGGATTGG	1287	GUGGCGGCUCUCGAGGGAUU	2988
	ACCTGCGGGATCGTCTTCCAGG	1288	ACCUGCGGGAUCGUCCUCC	2989
	ATCCGTCCCCGTCGTCTCCTGG	1289	AUCCGUCCCCGUCGUCUCC	2990
	CGCGCCTTCCGGTGCAGTTTGGG	1290	CGCGCCUUCGGUGCAGUUU	2991
	CTCGGTTTCTCCGCGCAGCGGGG	1291	CUCGGUUUCUCCGCGCAGCG	2992
	CTGTCCCAAACGACCGGAAGG	1292	CUGUCCCAAACUGACCGGA	2993
	CGAGCTGTCCCAAACGACCGG	1293	CGAGCUGUCCCAAACUGCAC	2994
	GTGCGGCTCTGCTCTGACAGGG	1294	GUCGCGGCCUCGUCCUGACA	2995
	AGGACTCGGACCCGCGCGGGG	1295	AGGACUCGGACCCGCGCCG	2996
	TCACGTCCAGGCGCAGTTGCGG	1296	UCACGUCCAGGCGCAGUUG	2997
	TGTCAGGACGAGGCGCGACGGG	1297	UGUCAGGACGAGGCGCGAC	2998
	ACCGGAAGGCGCGCAGGGTAGG	1298	ACCGGAAGGCGCGCAGGGU	2999
	CTCTCGAGGGATTGGCGCAAGG	1299	CUCUCGAGGGAUUUGGCGCA	3000
	TTTCATGCGAGCGCGGGGCCGG	1300	UUCAUGCGAGCGCGGGGC	3001
	TTTCTCCGCGCAGCGGGGCGGG	1301	UUUCUCCGCGCAGCGGGCG	3002
	GCCCCGGACGCGCCGAGAAAGG	1302	GCCCCGGACGCGCCGAGAAA	3003
	TCGAGGGATTGGCGCAAGCGG	1303	UCGAGGGAUUUGGCGCAAG	3004
	CGGCGGGAAGGAACCTGAGGG	1304	CGGCGGGAAGGAACCCUGA	3005
	GCGCCGGGAACGGTCTCGGGG	1305	GCGCCGGGAACUGGUCUCG	3006
	GAGACAGTTCCCCGGCGCGGG	1306	GAGACAGUCCCCGGCGCG	3007
	AGGATCGCTGCGGGCCTCGCGG	1307	AGGAUCGCCUGCGGGCCUCG	3008
	CCGAGCGCTGGCGTCTTCCGTGG	1308	CCGAGCGUGGCGUCUCCG	3009
	CCGGGACGCGCCGAGAAAGGGG	1309	CCGGGACGCGCCGAGAAAGG	3010
	AAAGTCTGAGTGCGGGACACAGG	1310	AAAGUCUGAGUGCGGGACAC	3011
	TTTGGCGCAAGGCGGCCAAGGG	1311	UUUGGCGCAAGGCGGCCAA	3012
	GGGAATGGTGGCGGCTCTCGAGG	1312	GGGAUUGGUGGCGGUCUCG	3013

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	CACGCCGGCTCCCGCTGTCTCGG	1313	CACGCCGGCUCGCGCUGUCU	3014
	CGTCGCGGCTCGTCTGACAGG	1314	CGUCGCGGCCUCGUCCUGAC	3015
	CGCCCGGGACGCGCCGAGAAAGG	1315	CGCCCGGGACGCGCCGAGAA	3016
	GGCTCGCGGGCCGATGCCTCGG	1316	GGCCUCGCGGGCCGAUGCCU	3017
	TGCAGTTTGGGACAGCTCGGAGG	1317	UGCAGUUUGGGACAGCUCGG	3018
	CTGACCTGCCGCTCGCACGCCGG	1318	CUGACCUGCCGCUCGCACGC	3019
	GCCGGTCTGCGGCGCATGGACGG	1319	GCCGGUCUGCGGCGCAUGGA	3020
	GCGCGCCTTCCGCTGACGTTTGG	1320	GCGCGCCUCCGGUGCAGUU	3021
	GCCTCGGTTTCTCGCGCAGCGG	1321	GCCUCGGUUUCGCGCGCAG	3022
	GCCGGTCCCGCTGTCTCGGCGG	1322	GCCGGCUCGCGCUGUCUCGG	3023
	ACCCGAGGCATCGGCCCGGAGG	1323	ACCCGAGGAUCGGCCCGCG	3024
	GGGACGGATGCGAGCCCGGAGG	1324	GGGACGGAUGCGAGCCCGGG	3025
	GGCCCGCAGGCGATCCTGGAAGG	1325	GGCCCGCAGGCGAUCCUGGA	3026
	TAGTTGCCCGACTGTACCATGG	1326	UAGUUGCCCGACUGUACCA	3027
	AAGGCGCGCAGGGGTAGGCGGGG	1327	AAGGCGCGCAGGGGUAGGCG	3028
	GAGACGACGGGGGACGGATGGGG	1328	GAGACGACGGGGGACGGAUG	3029
	GCGGCGCCGCAACTGCGCCTGGG	1329	GCGGCGCCGCAACUGCGCCU	3030
	CCTCGGTTTCTCCGCGCAGCGGG	1330	CCUCGGUUUCUCCGCGCAGC	3031
	CGTGCGAGCGGCAGGTGACCGG	1331	CGUGCGAGCGGCAGGUCAGC	3032
	CGGGGGATGTGGCGCGGTCCAGG	1332	CGGGGGAUUGGCGCGGUCC	3033
	CGGCGGGACGGATGCGAGCCCGG	1333	CGGCGGGACGGAUGCGAGCC	3034
	CGATGCCTCGGGTCCCCCTCCGG	1334	CGAUGCCUCGGUCCCCCUC	3035
	ACTGCACCGGAAGGCGCGCAGGG	1335	ACUGCACCGGAAGGCGCGCA	3036
	GGAGACGACGGGGGACGGATGGG	1336	GGAGACGACGGGGGACGGAU	3037
	GTTTCTCCGCGCAGCGGGGCGGG	1337	GUUUCUCCGCGCAGCGGGGC	3038
	CTTCGCGAGCTCCTCCAGCAGGG	1338	CUUCGCGAGCUCCUCCAGCA	3039
	CTGGCGTCTTCCGTGGACAGTGG	1339	CUGGCGUCUCCGUGGACAG	3040
	GCGGCGCATGGACGGACGACGG	1340	GCGGCGCAUGGACGGACGGA	3041
	GCAGAGATACCCGAGCGCCCGGG	1341	GCAGAGAUACCCGAGCGCCC	3042
	CGGGCGGAGACCGGTTCCCGGG	1342	CGGGCGGAGACCGGUUCCCC	3043
	GGTTTCTCCGCGCAGCGGGGCGG	1343	GGUUUCUCCGCGCAGCGGGG	3044
	TGCGAGCGGCAGGTCAGCCGGGG	1344	UGCGAGCGGCAGGUCAGCCG	3045
	ACCGGTTCCCCGGGAAGGTGAGG	1345	ACCGGUUCCCCGGGAAGGUG	3046
	GGAAGTGGTCTCGGGGCGGCGGG	1346	GGAACUGGUCUGGGGCGGC	3047
	AGACGACGGGGGACGGATGGGGG	1347	AGACGACGGGGGACGGAUGG	3048
	CGAGACCAAGTTCCCCGGCGCGG	1348	CGAGACCAGUCCCCGGCGC	3049
	TGGGGCCCCGGAGCGCTCCAAGGG	1349	UGGGGCCCGGAGCGCUCCAA	3050
	GTGAGCCGGGTGCTAGGTCTGG	1350	GUCAGCCGGGGUGCUAGGUC	3051
	CCGGGCGGAGACCGGTTCCCGGG	1351	CCGGGCGGAGACCGGUUCCC	3052
	CTGCACCGGAAGGCGCGCAGGGG	1352	CUGCACCGGAAGGCGCGCAG	3053
	GCGTCTTCCGTGGACAGTGGTGG	1353	GCGUCUCCGUGGACAGUGG	3054
	GGCAGAGATACCCGAGCGCCCGG	1354	GGCAGAGAUACCCGAGCGCC	3055

10

20

30

40

50

【表 2 - 8】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	CGCCATTCTCTACCTCCGCTCCGG	1355	CGCCAUUCCUACCUCCGCUC	3056
	TTCTCTCCCATGGTACAGTCGGGG	1356	UUCUCCCAUGGUACAGUCG	3057
	GGTGCTAGGTCTGGCGTGCAGGG	1357	GGUGCUAGGUCUGGCGUGCG	3058
	GGAATGGTGGCGGCTCTCGAGGG	1358	GGAUUGGUGGCGGCUCUCGA	3059
	CTGTGAGGACGAGGCCGCGACGG	1359	CUGUCAGGACGAGGCCGCGA	3060
	CGGAGCCGCGAGGTAGCGGGCGGG	1360	CGGAGCCGCGAGGUAGCGGGC	3061
	GCCTACCCCTGCGCGCCTTCCGG	1361	GCCUACCCUUGCGGCCUUC	3062
	GGCGCAGAGGCGCTTCTGAGGG	1362	GGCGCAGAGGCGCUUCCUGA	3063
	TGCGCGCCTCGGACTGGCCCCGG	1363	UGCGCGCCUCGGACUGGGCC	3064
	TGCCCCGACTGTACCATGGGAGG	1364	UGCCCCGACUGUACCAUGGG	3065
	GCGCAGAGGCGCTTCTGAGGGG	1365	GCGCAGAGGCGCUUCCUGAG	3066
	GTCTTCCAGGATCGCTGCGGG	1366	GUCCUUCAGGAUCCGCGC	3067
	CGCCCCCGGTCCATCCCTGCTGG	1367	CGCCCCCGGUCCAUCCUGC	3068
	GGGTGCTAGGTCTGGCGTGCAGGG	1368	GGGUGCUAGGUCUGGCGUGC	3069
	GGTGGGTGCGCGCCTCGGACTGG	1369	GGUGGGUGCGCGCCUCGGAC	3070
	CGCGGAGAAACCGAGGCCGAGG	1370	CGCGGAGAAACCGAGGCCGG	3071
	CTGCAGGGGCGCCCGTGAGCGG	1371	CUGCAGGGGCGCCCGUGAG	3072
	GCCCGAGCGCTCCAAGGGCGG	1372	GCCCGAGCGCUCCAAGGGG	3073
	AAGTCTGAGTGGGGACACAGGG	1373	AAGUCUGAGUGCGGGACACA	3074
	CGTCCTTCCAGGATCGCTGCGG	1374	CGUCCUUCAGGAUCGCCUG	3075
	GCGGCGGGAAGGAACCCGAGG	1375	GCGGCGGGAAGGAACCCUG	3076
FAS	CGGTGACAGTACTTGGCTGG	1378	CGGUUACGAGUGACUUGGC	3079
	AACTTGGCTGCGCGCGGGTAGG	1379	AACUUGGCCUGCGCGGGU	3080
	GACCCGCTCAGTACGAGTTGGG	1380	GACCCGCUAGUACGAGAUU	3081
	CTATCCCCGGGACTAAGACGGGG	1381	CUAUCCCCGGGACUAAGACG	3082
	CGAAGCAGTGGTTAAGCCGAGG	1382	CGAAGCAGUGGUUAAGCCGG	3083
	CCCGTCTTAGTCCCGGGGATAGG	1383	CCCGUCUAGUCCCGGGGAU	3084
	GGACGCGTGCGGGATTGCGGCGG	1384	GGACGCGUGCGGGAUUGCGG	3085
	TGCCGTCTTCCGAGCCCTCCGG	1385	UGCCGUUCUCCGAGCCUC	3086
	GTTGGTGGACCCGCTCAGTACGG	1386	GUUGGUGGACCCGCUAGUA	3087
	CCAAAGGTCGCTCCGGCGCGGG	1387	CCAAAGGUCCGCUCCGGCGC	3088
	ATGCGAAGTGCTGACCCCGCTGG	1388	AUGCGAAGUGCUGACCCCGC	3089
	GCCGAGCGGACCTTGGCTTGG	1389	GCCGAGCGGACCUUUGGCU	3090
	CTCGCGCAAGAGTGACACACAGG	1390	CUCGCGCAAGAGUGACACAC	3091
	CTTACCCCGTCTTAGTCCCGGGG	1391	CUUACCCCGUCUAGUCCCG	3092
	GAAGCGGTTTACGAGTGACTTGG	1392	GAAGCGGUUACGAGUGACU	3093
	GGGTCAGCACTTCGCATCAAGG	1393	GGGUCAGCACUUCGCAUCA	3094
	ACTGCGCTCCAGTTGAGGTGGG	1394	ACUGCGUCCACGUUGAGGU	3095
	TGCGAAGTGCTGACCCCGCTGGG	1395	UGCGAAGUGCUGACCCCGCU	3096
	GAGCGGGTCCACCAACCCGCGGG	1396	GAGCGGGUCCACCAACCCGC	3097

10

20

30

40

50

【表 2 - 9】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	AGACGGGGTAAGCCTCCACCCGG	1397	AGACGGGGUAAGCCUCCACC	3098
	ACCCGCTCAGTACGGAGTTGGGG	1398	ACCCGCUCAGUACGGAGUUG	3099
	GCCAAAGGTCCGCTCCGGCGCGG	1399	GCCAAAGGUCCGCUCCGGCG	3100
	GGACCCGCTCAGTACGGAGTTGG	1400	GGACCCGCUCAGUACGGAGU	3101
	GCCTATCCCGGGACTAAGACGG	1401	GCCUAUCCCGGGACUAAGA	3102
	GAGCTCACGAAAAGCCCCGTGG	1402	GAGCUCACGAAAAGCCCCGG	3103
	TGAGCGGGTCCACCAACCCGCGG	1403	UGAGCGGUCCACCAACCCG	3104
	GAAAAGCCCCGGTGGTCAGGAGG	1404	GAAAAGCCCCGGUGGUCAGG	3105
	GACGAGCTCACGAAAAGCCCCGG	1405	GACGAGCUCACGAAAAGCCC	3106
	GCGTTGGAGACTGGCTCCCGGGG	1406	GCGUUGGAGACUGGCUCCCG	3107
	AGGTCCGCTCCGGCGCGGGTGGG	1407	AGGUCCGCUCGGCGCGGGU	3108
	GCTTACCCCGTCTTAGTCCCGGG	1408	GCUUACCCCGUCUAGUCCC	3109
	CTCCACGTTGAGGTGGGCGTGGG	1409	CUCCACGUUGAGGUGGGCGU	3110
	GGCTTACCCCGTCTTAGTCCCGG	1410	GGCUUACCCCGUCUAGUCC	3111
	GCGGGACGCGTGCGGGATTGCGG	1411	GCGGGACGCGUGCGGGAUUG	3112
	CACGAAAAGCCCCGGTGGTCAGG	1412	CACGAAAAGCCCCGGUGGUC	3113
	GTCAGGGTTCGTTGCACAAATGG	1413	GUCAGGGUUCGUUGCACAAA	3114
	GACGGGGTAAGCCTCCACCCGGG	1414	GACGGGGUAAGCCUCCACCC	3115
	CGTTGGAGACTGGCTCCCGGGG	1415	CGUUGGAGACUGGCUCCCG	3116
	TTCTGGCAGTTCTCAGACGTAGG	1416	UUCUGGCAGUUCUCAGACGU	3117
	GTCCCGGGCGTTCTGCACTGG	1417	GUCCCGGGCGUUCUGCAG	3118
	GCCAAGCCAAAGGTCCGCTCCGG	1418	GCCAAGCCAAAGGUCCGCUC	3119
	AAGTCCGCTCCGGCGCGGGTGG	1419	AAGGUCCGCUCGGCGCGGG	3120
	GCGCACTACCCACCCGCGCCGG	1420	GCGCACUCACCCACCCGCGC	3121
	CGGAAGTCTGGGAAGCTTTAGGG	1421	CGGAAGUCUGGGAAGCUUUA	3122
	CACCTCAACGTGGAGCGCAGTGG	1422	CACCUCAACUGGAGCGCAG	3123
	AACCCGGGCGTTCCCCAGCGAGG	1423	AACCCGGGCGUCCCCAGCG	3124
	TCAGCAACTTGGCCTGCGCGCGG	1424	UCAGCAACUUGGCCUGCGCG	3125
	GGGAAGCTCTTCACTTCGGAGG	1425	GGGAAGCUCUUUCACUUCGG	3126
	CAGTGGTCTCCGAGGAGCGCCGG	1426	CAGUGGUCUCCGAGGAGCGC	3127
	GTTCCGCTCCTCTCTCAACCGG	1427	GUUCCGCUCUCUCUCCAAC	3128
DCK	CGGGGACCGCAGTCACCCCGTGG	1428	CGGGGACCGCAGUCACCCCG	3129
	GGTTTGACTTTGGCGCGCGGAGG	1429	GGUUUGACUUUGGCGCGCGG	3130
	CTTGCGTCCACATTTCCGGAGG	1430	CUUGCGUCCACAUUUCGG	3131
	GCGCGCCTCACAGAGACCGCAGG	1431	GCGCGCCUCACAGAGACCGC	3132
	CTCCGGAATGTGGGACGCAAGG	1432	CUCCGGAAGUGGGACGCA	3133
	CGGGGTTTGACTTTGGCGCGCGG	1433	CGGGGUUUGACUUUGGCGCG	3134
	GAACATCGGTAAGGAGCCTCCGG	1434	GAACAUCGUUAAGGAGCCUC	3135
	AGCTCACTAGCTGACCCGGCAGG	1435	AGCUCACUAGCUGACCCGGC	3136
	GGAAAACCCGCCTCTCTAGTGGG	1436	GGAAAACCCGCCUCUCUAGU	3137
	GTGGCGGCCAGAGCTCGTCCGG	1437	GUGGCGGCCAGAGCUCGUC	3138
	CATCGAAGGGAACATCGGTAAGG	1438	CAUCGAAGGGAACAUCGGUA	3139

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	TTTGCAGTTCCCAACAAAGAGG	1439	UUUGCGAGUCCCAACAAAG	3140
	TGAGCTACCGGCCCGCCGCGG	1440	UGAGCUCACCGGCCCGCCG	3141
	CAGAGCTCGTCCGGCAAAGAGGG	1441	CAGAGCUCGUCCGGCAAAGA	3142
	TAGTGAGCTACCGGCCCGCCG	1442	UAGUGAGCUCACCGGCCCG	3143
	CTCGTCCGGCAAAGAGGGCTGGG	1443	CUCGUCCGGCAAAGAGGGCU	3144
	ACTAGCTGACCCGGCAGGTCAGG	1444	ACUAGCUGACCCGGCAGGUC	3145
	ATCTCCATCGAAGGGAACATCGG	1445	AUCUCCAUCGAAGGGAACAU	3146
	CACGGGGTGACTGCGGTCCCGG	1446	CACGGGGUGACUGCGGUCCC	3147
	GAGGCTTCCGCCACACGCGCGG	1447	GAGGCCUUCGCCACACGCG	3148
	CTTTGTTGGGAACTCGCAAAGGG	1448	CUUUGUUGGGAACUCGCAA	3149
	CGGGAAGAGGTTCCGGAGTCGGG	1449	CGGGAAGAGGUUCCGGAGUC	3150
	CTTACCGATGTTCCCTTCGATGG	1450	CUUACCGAUGUCCCUUCGA	3151
	ACGGGGTGACTGCGGTCCCGGG	1451	ACGGGGUGACUGCGGUCCCC	3152
	GAACTCGCAAAGGGAAGCGGGGG	1452	GAACUCGCAAAGGGAAGCGG	3153
	GAAGGGTATTAGATTTCTTGAGG	1453	GAAGGGUAAUAGAUUUCUUG	3154
	AGTCAAACCCCGACACCCGCGG	1454	AGUCAACCCCGACACCCGC	3155
	AGCTCCAGTGCGCGCACCCGTGG	1455	AGCUCCAGUGCGCGCACCCG	3156
	TCTGGGCCGCCACAAGACTAAGG	1456	UCUGGGCCGCCACAAGACUA	3157
	GCGGGAAGAGGTTCCGGAGTCGG	1457	GCGGGAAGAGGUUCCGGAGU	3158
	TGGAAAACCCGCCTCTCTAGTGG	1458	UGGAAAACCCGCCUCUCUAG	3159
	CGGGTGTCGGGGTTTGACTTTGG	1459	CGGGUGUCGGGGUUUGACUU	3160
	CTCTTTGCCGGACGAGCTCTGGG	1460	CUCUUUGCCGGACGAGCUCU	3161
	CCTCTTTGCCGGACGAGCTCTGG	1461	CCUCUUUGCCGGACGAGCUC	3162
	AAACCCCGACACCCGCCGCGGG	1462	AAACCCCGACACCCGCCGGC	3163
	TGGCGCCAGTCTGACCCCGGGG	1463	UGGCGCCAGUCUGACCCCG	3164
	TTGCGAGTTCCCAACAAAGAGGG	1464	UUGCGAGUCCCAACAAAGA	3165
	CAAACCCCGACACCCGCCGCGG	1465	CAAACCCCGACACCCGCCGG	3166
	TCTTTGTTGGGAACTCGCAAAGG	1466	UCUUUGUUGGGAACUCGCAA	3167
	CGATGGAGATTTTCTTGATGCGG	1467	CGAUGGAGAUUUUCUUGAUG	3168
	CGCCTCTCTAGTGGCCTGTTGG	1468	CGCCUCUCUAGUGGGCCUGU	3169
	GCCCCGGCCTTCAGTGACCTGG	1469	GCCCCGGCCUUCACGUGACC	3170
	GCTCGTCCGGCAAAGAGGGCTGG	1470	GCUCGUCCGGCAAAGAGGGC	3171
	TGCGGTCCCCGGGGTCAGACTGG	1471	UGCGGUCCCCGGGGUCAGAC	3172
	AGCCTTGCGTCCACATTTCCGG	1472	AGCCUUGCGUCCACAUUUC	3173
	CTGCAGAGAGATGCGGCGAAGGG	1473	CUGCAGAGAGAUCCGGCGAA	3174
	GCGGTCCCCGGGGTCAGACTGGG	1474	GCGGUCCCCGGGGUCAGACU	3175
	CAGCTAGGGAGCGCGGCTTGAGG	1475	CAGCUAGGGAGCGCGGUUG	3176
	ACGCCAGGTCACGTGAAGGCCGG	1476	ACGCCAGGUCACGUAAGGC	3177
	CGCCAGGTACGTGAAGGCCGGG	1477	CGCCAGGUCACGUAAGGCC	3178
DGKA	ATCCCTCCGAATGAGCGGGAGGG	1478	AUCCCUCCGAAUGAGCGGGA	3179
	ATCCCTCCCGCTCATTCGGAGGG	1479	AUCCCUCCGCUCAUUCGGA	3180
	GTATCGAGAAGGGTCTGCGCTGG	1480	GUAUCGAGAAGGGUCUGCGC	3181

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 1】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	CTATGTCGTCAGGAACGGGGCGG	1481	CUAUGUCGUCAGGAACGGGG	3182
	GCAGCACGAACGCAGCCCGTGGG	1482	GCAGCACGAACGCAGCCCGU	3183
	CTTCGAAGTTCAGAGTCGGGG	1483	CUUCGAAGUCCCCAGAGUCG	3184
	CATCCCTCCGAATGAGCGGGAGG	1484	CAUCCCUCCGAUAGAGCGGG	3185
	GAAACGTTACCCACCGGGTTCGG	1485	GAAACGUUACCCACCGGGU	3186
	ACGGGCTGCGTTCGTGCTGCTGG	1486	ACGGGCGUGCGUUCGUGCUGC	3187
	GAACCTCCACAGTGCCGCACGGG	1487	GAACCUCCACAGUGCCGCAC	3188
	GTTCTGGGACCCGACTCGGAGG	1488	GUUCCUGGGACCCGACUCGG	3189
	CATCCCTCCGCTCATTTCGGAGG	1489	CAUCCCUCCGCUCAUUCGG	3190
	AACTTCGAAGTTCAGAGTCGG	1490	AACUUCGAAGUCCCAGAGU	3191
	CTCCGAATGAGCGGGAGGGATGG	1491	CUCCGAUAGAGCGGGAGGGA	3192
	ACTTCGAAGTTCAGAGTCGGG	1492	ACUUCGAAGUCCCAGAGUC	3193
	AAACGTTACCCACCGGGTTCGGG	1493	AAACGUUACCCACCGGGUUC	3194
	CTCCCGCTCATTTCGGAGGGATGG	1494	CUCCCGCUCAUUCGGAGGGA	3195
	CCCCCATCGGAAAAGGACAGGGG	1495	CCCCAUCGAAAAGGACAG	3196
	CAGCTATGTCGTCAGGAACGGGG	1496	CAGCUAUGUCGUCAGGAACG	3197
	GGAACCTCCACAGTGCCGCACGG	1497	GGAACCUCCACAGUGCCGCA	3198
	GTCTGGGAAACGTTACCCACCGG	1498	GUCUGGGAAACGUUACCCAC	3199
	GGGCGGGCAGCTATGTCGTCAGG	1499	GGGCGGGCAGCUAUGUCGUC	3200
	CGCGGTGCGAGCTGAAGCGCCGG	1500	CGCGGUCGAGCUGAAGCGC	3201
	TTCGAAGTTCAGAGTCGGGGG	1501	UUCGAAGUCCCAGAGUCGG	3202
	TCTGGGAAACGTTACCCACCGGG	1502	UCUGGGAACGUUACCCACC	3203
	TATCGAGAAGGGTTCGCGTGGG	1503	UAUCGAGAAGGGUCUGCGCU	3204
	AGCTGGAGCGGGTATCGAGAAGG	1504	AGCUGGAGCGGGUUCGAGA	3205
	CCTCCACAGTGCCGCACGGGTGG	1505	CCUCCACAGUGCCGCACGGG	3206
	CCGGTTCCTGGGACCCGACTCGG	1506	CCGGUCCUGGGACCCGACU	3207
	GAACGCAGCCCGTGGGTCTTCGG	1507	GAACGCAGCCCGUGGGUCCU	3208
	TACCCCTGTCCTTTTCCGATGGG	1508	UACCCUGUCCUUUCCGAU	3209
	AAGAGGACTTCCCTCCGATCGG	1509	AAGAGGACUUCCUCCGAGU	3210
	TCACCATCCCTCCGAATGAGCGG	1510	UCACCAUCCUCCGAAUGAG	3211
	TTCTGCGGACCCGACTCGGAGGG	1511	UUCUUGGGACCCGACUCGGA	3212
	ACCGCGAGCCCTCTCAAGCAAGG	1512	ACCGCGAGCCCUCAAGCA	3213
	ACCCCTGTCCTTTTCCGATGGGG	1513	ACCCUGUCCUUUCCGAUG	3214
	AGGGTCTGCGCTGGGACGCGGGG	1514	AGGGUCUGCGCUGGGACGCG	3215
	ACTCGGAGGGAAGTCTCTTCGG	1515	ACUCGGAGGGAAGUCCUCUU	3216
	CTCCCCATCGGAAAAGGACAGG	1516	CUCCCCAUCGAAAAGGAC	3217
	AGAACCCTTCTCCACCCGTGCGG	1517	AGAACCUCUCCACCCGUG	3218
	GGTCTCTACCTTGCTTGAGAGGG	1518	GGUCUCUACCUUGCUUGAGA	3219
	CAGTGCCGCACGGGTGGAGAAGG	1519	CAGUGCCGCACGGGUGGAGA	3220
	GCAGCTATGTCGTCAGGAACGGG	1520	GCAGCUAUGUCGUCAGGAAC	3221
	CTGTCTTTTCCGATGGGGAGG	1521	CUGUCCUUUCCGAUGGGGG	3222
	TTCCCTCCGAGTCGGGTCCCAGG	1522	UUCCCUCCGAGUCGGGUCCC	3223

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 2】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	AGTGCCGCACGGGTGGAGAAGGG	1523	AGUGCCGCACGGGUGGAGAA	3224
	CACCATCCCTCCGAATGAGCGGG	1524	CACCAUCCCUCCGAUAGAGC	3225
	CGAGTCGGGTCCCAGGAACCGGG	1525	CGAGUCGGGUCCCAGGAACC	3226
	AGAGGACTTCCCTCCGAGTCGGG	1526	AGAGGACUCCCUCCGAGUC	3227
	GGGTCTCTACCTTGCTTGAGAGG	1527	GGGUCUCUACCUUGCUUGAG	3228
USP16	TAAC TGCTCCGATCCACGGGG	1528	UAACUGCUCCGAUCCACGG	3229
	CTAACTGCTCCGATCCACGGGG	1529	CUAACUGCUCCGAUCCACG	3230
	TCTCGACCCCGTGACCCAGAGG	1530	UCUCGACCCCGUGGACCCAG	3231
	GTCGCTCTCAATTCGTCAACAGG	1531	GUCGCUCUCAAUUCGUCACC	3232
	CGCAGTACCGGAAAGTAGCCGGG	1532	CGCAGUACCGGAAAGUAGCC	3233
	CTTCCCATATGCGCGTTCCGG	1533	CUUCCCAUAAUGCCGCGUUC	3234
	TTCCGGTACTGCGATCTCATTGG	1534	UUCGGUACUGCGAUCUCAU	3235
	CGCCGGATGTTCTGGGTTTAGGG	1535	CGCCGGAUGUUCGGGUUAG	3236
	ACTTCCGGAACGCGGCATTATGG	1536	ACUUCGGAACGCGGCAUUA	3237
	GCGCCGGATGTTCTGGGTTTAGGG	1537	GCGCCGGAUGUUCGGGUUUA	3238
	TGGCGGCCCTTCTCGACCCCGTGG	1538	UGGCGGCCUUCUCGACCCCG	3239
	CGGAAGTTATTGCTTTCAGGGG	1539	CGGAAGUUAUUGCUUCCAG	3240
	GTAGCCGGGTACGTGCTTAAGG	1540	GUAGCCGGGUACGUGCUUA	3241
	TCGAGTACCGGAAAGTAGCCGG	1541	UCGAGUACCGGAAAGUAGC	3242
	AGCCAATGAGATCGCAGTACCGG	1542	AGCCAAUGAGAUCCGAGUAC	3243
	GCGGCTTGCGCCGATGTTCTGGG	1543	GCGGCUUGCGCCGGAUGUUC	3244
	TGCGCCGGATGTTCTGGGTTTAGG	1544	UGCGCCGGAUGUUCGGGUUU	3245
	TGCGGCTTGCGCCGATGTTCTGG	1545	UGCGGCUUGCGCCGGAUGUU	3246
	CACGTAACCCGGCTACTTTCCGG	1546	CACGUAACCCGGCUACUUUC	3247
	GTTATGGGCTCTGTGCGCGTGGG	1547	GUUAUGGGCUCUGCGCCGU	3248
	GGAGCATTTATATACTTCGTGG	1548	GGAGCAUUUAUAACUUCG	3249
	TTTACTAGCGTCAGAGCCGATGG	1549	UUUACUAGCGUCAGAGCCGA	3250
	ATCCGGCGCAAGCCGCACGCAGG	1550	AUCCGGCGCAAGCCGCACGC	3251
	CTTCCGGAACGCGGCATTATGGG	1551	CUUCCGGAACGCGGCAUUUAU	3252
	GGTTACGTGCTTAAGGAGAGCGG	1552	GGUACGUGCUUAAGGAGAG	3253
	GCTCTCAATTCGTCACAGGAGG	1553	GCUCUCAUUCGUCACCAGG	3254
	AAGCAATAACTTCCGGAACGCGG	1554	AAGCAAUAACUCCGGAACG	3255
	TCAGAGCCGATGGTCCCGGAGG	1555	UCAGAGCCGAUGGUCCCGGG	3256
	GCCGTGTTCATACGGCTGGTAGG	1556	GCCGUGUUCAUACGGCUGGU	3257
	TCTAACTGCTCCGATCCCACGGG	1557	UCUACUGCUCCGAUCCAC	3258
	AGTAAATCTGCGCCTGCGTGCGG	1558	AGUAAUUCUGCGCCUGCGUG	3259
	CCGGAAGTTATTGCTTTCAGGG	1559	CCGGAAGUUAUUGCUUCCA	3260
	AACCCCTAAACCCGAACATCCGG	1560	AACCCCUAAACCCGAACAUC	3261
	GTGCGAGGCGCCGAGCAAATGGG	1561	GUGGCGAGGCGCCGAGCAAU	3262
	CGTGGCAGGACTTCCCTATGGG	1562	CGUGGCGAGGACUCCCUAU	3263
	TGCAGCCGTGTTTCATACGGCTGG	1563	UGCAGCCGUGUUCAUACGGC	3264
	CCTGGCAGTCGTCGCTCGCCTGG	1564	CCUGGCGAGUCGUCGUCGCC	3265

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 3】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	CTGTCGCCGTGGGTGAGTTCTGG	1565	CUGUCGCCGUGGGUGAGUUC	3266
	AGCGACGACTGCCAGGCAGTGGG	1566	AGCGACGACUGCCAGGCAGU	3267
	TGGTGACGAATTGAGAGCGACGG	1567	UGGUGACGAAUUGAGAGCGA	3268
	GAACCGCGCATTATGGGAAGTGG	1568	GAACCGCGCAUUAUGGGAAG	3269
	TCCGGAAGTTATTGCTTTCCAGG	1569	UCCGGAAGUUAUUGCUUCC	3270
	ATCGGAGCAGTTAGAAGGGGAGG	1570	AUCGGAGCAGUUAGAAGGGG	3271
	CTGGGTCCACGGGTCGAGAAGG	1571	CUGGGUCCACGGGUCGAGA	3272
	ATACGGCTGGTAGGAAAAGCAGG	1572	AUACGGCUGGUAGGAAAAGC	3273
	TTCTAACTGCTCCGATCCACGG	1573	UUCUACUGCUCCGAUCCCA	3274
	GCGCCGAGCAAATGGTGGGTGG	1574	GCGCCGAGCAAUUGGUGGG	3275
	GCGTCAGAGCCGATGGTCCCGGG	1575	GCGUCAGAGCCGAUGGUCCC	3276
	GTGGGATCGGAGCAGTTAGAAGG	1576	GUGGGAUCGGAGCAGUUAGA	3277
	CGCCTGCGTGCGGCTTGCGCCGG	1577	CGCCUGCGUGCGGCUUGCGC	3278
PTPN11	ACGGGTCGGTGGCGTAGACGCGG	1578	ACGGGUCGGUGGCGUAGACG	3279
	ACGGGGCTAACCGAACGCGGCGG	1579	ACGGGGCUAACCGAACGCGG	3280
	CGTCGCGAGCGGTGACATCACGG	1580	CGUCGCGAGCGGUGACAUCA	3281
	TCGGTTAGCCCCGTCCGGAAGGG	1581	UCGGUAGCCCCGUCCGGAA	3282
	CGGTTAGCCCCGTCCGGAAGGG	1582	CGGUUAGCCCCGUCCGGAA	3283
	AACCGAACGCGGCGGTGGCCGGG	1583	AACCGAACGCGGCGGUGGCC	3284
	TAACCGAACGCGGCGGTGGCCGG	1584	UAACCGAACGCGGCGGUGGC	3285
	TCGCGAGCGGTGACATCACGGGG	1585	UCGCGAGCGGUGACAUCACG	3286
	TAGAGCCGCCGAGGGAACACGG	1586	UAGAGCCGCCGAGGGAACCA	3287
	AACATGACATCGCGGAGGTGAGG	1587	AACAUGACAUCGCGGAGGUG	3288
	GGTTAGCCCCGTCCGGAAGGGG	1588	GGUAGCCCCGUCCGGAAGG	3289
	TCGCTCGGTCTCTCCGTGACGGG	1589	UCGCUCGGUCCUCCGUGAC	3290
	GGGCTAACCGAACGCGGCGGTGG	1590	GGGCUAACCGAACGCGGCGG	3291
	CGCGTTCGGTTAGCCCCGTCCGG	1591	CGCGUUCGGUAGCCCCGUC	3292
	CGAAATAACCTGCTCACTTGGG	1592	CGAAUAACCCUGCUCACUU	3293
	ACACGAGAGGGGAGTTGCGCGGG	1593	ACACGAGAGGGGAGUUGCGC	3294
	TTCGGTTAGCCCCGTCCGGAAGG	1594	UUCGGUAGCCCCGUCCGGA	3295
	CGCGAGCGGTGACATCACGGGGG	1595	CGCGAGCGGUGACAUCACGG	3296
	GACACGAGAGGGGAGTTGCGCGG	1596	GACACGAGAGGGGAGUUGCG	3297
	TCTACGCCACCGACCCGTCCGGG	1597	UCUACGCCACCGACCCGUCC	3298
	CGGTGACATCACGGGGGCGACGG	1598	CGGUGACAUCACGGGGGCGA	3299
	GTCTACGCCACCGACCCGTCCGG	1599	GUCUACGCCACCGACCCGUC	3300
	GGAGGAACATGACATCGCGGAGG	1600	GGAGGAACAUGACAUCGCGG	3301
	GGACCCCGTGGTTCCTTCGCGGG	1601	GGACCCGUGGUUCCUCCG	3302
	AGCAAGGAGCGGGTCCGTCGCGG	1602	AGCAAGGAGCGGGUCCGUCG	3303
	CGGACGGGGCTAACCGAACGCGG	1603	CGGACGGGGCUAACCGAACG	3304
	CACGAGAGGGGAGTTGCGCGGGG	1604	CACGAGAGGGGAGUUGCGCG	3305
	ATGAGTGGAGCGGCGATTGTGG	1605	AUGAGUGGAGCGGCAUUUG	3306
	GACCGAGCGACGGCCGGGAATGG	1606	GACCGAGCGACGGCCGGGAA	3307

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 4】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	GTCGCTCGGTCCTCCGCTGACGG	1607	GUCGCUCGGUCCUCCGUGA	3308
	GTCCTCCGCTGACGGGAAGCAGG	1608	GUCCUCCGUGACGGGAAGC	3309
	GTTATTTCCGAATCACCATGAGG	1609	GUUAUUUCGGAUACCAUG	3310
	TTCCTGCTTCCCGTCAGCGGAGG	1610	UCCUGCUUCCCGUCAGCGG	3311
	AGAGCCGCCGAGGGAACCGGG	1611	AGAGCCGCCGAGGGAACAC	3312
	GGGTCCGTCGCGGAGCCGGAGGG	1612	GGGUCCGUCGCGGAGCCGGA	3313
	ATGTGGCAGCGGGCCCGGACGGG	1613	AUGUGGCAGCGGGCCCGGAC	3314
	AATCGATGTGGCAGCGGGCCCGG	1614	AAUCGAUGUGGCAGCGGGCC	3315
	TGCCATTCCCGGCCGTCGCTCGG	1615	UGCCAUUCCCGGCCGUCGCU	3316
	CCGAAATAACCTGCTCACTTGG	1616	CCGAAUAACCCUGCUCACU	3317
	TCCTGGAAACCGCGGCCGAGG	1617	UCCUGGAAACCGCGGCCGCC	3318
	TTCGGGCTCCCGCCCCGGTCCG	1618	UUCGGGCUCCGCCCGGGU	3319
	TTCTCATGAGGCAATGGGTCAGG	1619	UUCUCAUGAGGCAUUGGGUC	3320
	GAGCGGGTCCGTCGCGGAGCCGG	1620	GAGCGGGUCCGUCGCGGAGC	3321
	GCGGGAGGAACATGACATCGCGG	1621	GCGGGAGGAACAUGACAUCG	3322
	CCCGATGTGACCGAGCCGAGCGG	1622	CCCGAUGUGACCGAGCCAG	3323
	TCCGCTGGGCTCGGTCACATCGG	1623	UCCGUGGGCUCGUCACAU	3324
	CGGAGGACCGAGCGACGGCCGGG	1624	CGGAGGACCGAGCGACGGCC	3325
	GAAATGAATGGGGACCCGAGGGG	1625	GAAUGAAUGGGGACCCGAG	3326
	GCTGCCGACGCGGAACGCGGG	1626	GCUGCCGACGCGGAACUCG	3327
	TGACATCAGGGGGCGACGCGG	1627	UGACAUCACGGGGCGACGG	3328
PTPN6	GGGTACCGTCCTTCTAAGTGGG	1628	GGGUACCGUCCUUCUAAGUG	3329
	CTACTGTACAAAACGCAACTCGG	1629	CUACUGUACAAAACGCAACU	3330
	GTCCGCCTCGACCAACCGCGG	1630	GUCCGCCUCGACCAACCGG	3331
	AATCGTCCTAGTCAAGGCATAGG	1631	AAUCGUCCUAGUCAAGGCAU	3332
	CTACGTCGCGCGGAAATGGGG	1632	CUACGUCCGCGGAAAUUG	3333
	CCGGGTACCGTCCTTCTAAGTGG	1633	CCGGGUACCGUCCUUCUAAG	3334
	CTGTTCTCCGACGCTACCCGGG	1634	CUGUUCUCCGACCCUACCC	3335
	CAGCGCTCAAGGCCGCGGTTGG	1635	CAGCGCUCAAGGCCGCGGU	3336
	TGGGTCGAGGCGGACGCCATAGG	1636	UGGUGCGAGGCGGACGCCAU	3337
	AGCGCTCAAGGCCGCGGTTGGG	1637	AGCGCUCAGGCCGCGGUU	3338
	GAAACAGCATCCGGCGCAGCCGG	1638	GAAACAGCAUCCGGCGCAGC	3339
	TAATTCCTTGCGCTCTCCGCTGG	1639	UAAUUCUUGCGCUCUCCGC	3340
	ACGCCTGGATCACCTCCGCGAGG	1640	ACGCCUGGAUACCUCCGCG	3341
	GATAACGCCTGCAACGACATGGG	1641	GAUAACGCCUGCAACGACAU	3342
	GGATAACGCCTGCAACGACATGG	1642	GGUAACGCCUGCAACGACA	3343
	CAAGGCCGCCGTTGGGTCGAGG	1643	CAAGGCCGCCGUUGGGUCG	3344
	GGGTCGAGGCGGACGCCATAGG	1644	GGGUCGAGGCGGACGCCAUA	3345
	CGGGTACCGTCCTTCTAAGTGGG	1645	CGGGUACCGUCCUUCUAAGU	3346
	GCTACGTCGCGGGGAAATGGG	1646	GCUACGUCCGCCGGGAAAU	3347
	GCGCGCAGTGGTCTCGCGGAGG	1647	GCGCGCAGUGGUCCUCGCGG	3348
	GGTGAGAATCGTCTAGTCAAGG	1648	GGUGAGAAUCGUCCUAGUCA	3349

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 5】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	GCCGCCGTGTGGCGAGAAAGGGG	1649	GCCGCCGUGUGGCGAGAAAG	3350
	AATTCCTTGGCTCTCCGCTGGG	1650	AAUUCUUGCGCUCUCCGCU	3351
	TTTCCCGGCGGACGTAGCCAGG	1651	UUUCCCGGCGGACGUAGCC	3352
	CGGAGAGCGCAAGGAATTAGTGG	1652	CGGAGAGCGCAAGGAAUAG	3353
	CATCTTACCATGTGCTTGCAGG	1653	CAUCUACCCAUUGUCGUUGC	3354
	TCTCCGGGGCGGAGAACGCCTGG	1654	UCUCCGGGGCGGAGAACGCC	3355
	TTTCCGCTCCAGGGGCGTTGGG	1655	UUUCCGCUCCAGGGGCGUU	3356
	CATGCGCACTGCATCTCCGGGG	1656	CAUGCGCACUGCAUUCUCCG	3357
	AACTCGGACGCACAAGCTCAGGG	1657	AACUCGGACGCACAAGCUCA	3358
	TGAAGCTCTAGGTTTACGCGAGG	1658	UGAAGCUCUAGGUUACGCGG	3359
	GGCGTCGGAGAACAGACAGCGGG	1659	GGCGUCGGAGAACAGACAGC	3360
	AGTTGCGTTTGTACAGTAGAGG	1660	AGUUGCGUUUUGUACAGUAG	3361
	GTCCGCCGGGAAAATGGGGTAGG	1661	GUCCGCCGGGAAAUGGGGU	3362
	CTAGAGCTTCAGACGCCCTATGG	1662	CUAGAGCUUCAGACGCCCUA	3363
	ACAAACCTGGCTACGTCCGCCGG	1663	ACAAACCUGGCUACGUCCGC	3364
	TCCGCCGGGAAAATGGGGTAGGG	1664	UCCGCCGGGAAAUGGGGUA	3365
	TTGGGAACGGTTGTAGGACGTGG	1665	UUGGGAACGGUUGUAGGACG	3366
	GAATGCAGTGCGCATGGACGAGG	1666	GAAUGCAGUGCGCAUGGACG	3367
	GGCGCTTGCCCCAAGACTTGGG	1667	GGCGCUUGCCCCAAGACUU	3368
	TCTGTTCTCCGACGCTACCCGG	1668	UCUGUUCUCCGACGCCUACC	3369
	CAACTCGGACGCACAAGCTCAGG	1669	CAACUCGGACGCACAAGCUC	3370
	GGCTACGTCCGCCGGGAAAATGG	1670	GGCUACGUCCGCCGGGAAA	3371
	TGCCGCCGTGTGGCGAGAAAGGG	1671	UGCCGCCGUGUGGCGAGAAA	3372
	AGATTGTGGCTGCCGCCGTGTGG	1672	AGAUUGUGGUGCCGCCGUG	3373
	TCCCCTTTCTGCCACACGGCGG	1673	UCCCCUUUCUGCCACACGG	3374
	AAGCGCCCCACTTAGAAGGACGG	1674	AAGCGCCCCACUUAGAAGGA	3375
	TTGAGCGCTGAGCAAGCAAAGGG	1675	UUGAGCGCUGAGCAAGCAA	3376
	GGCCGCCGGTTGGGTCGAGGCGG	1676	GGCCGCCGGUUGGGUCGAGG	3377
	AATAGTGGATTGAGGCTGTAGG	1677	AAUAGUGGAUUGAGGCUGU	3378
PTPA	GCGACTGCCACGATTGTGCGGGG	1678	GCGACUGCCACGAUUGUGCG	3379
	CGTTCCCGGACGCAACCGCACGG	1679	CGUUCCGGACGCAACCGCA	3380
	TCTCGGTTTTCGGTTATAGCCGG	1680	UCUCGGUUUUCGGUUAUAGC	3381
	CGGACTGCGTGTCCGCGGACGGG	1681	CGGACUGCGUGUCCGCGGAC	3382
	CGTGCGGTTGCGTCCGGGAACGG	1682	CGUGCGGUUGCGUCCGGGAA	3383
	GCGGACTGCGTGTCCGCGGACGG	1683	GCGGACUGCGUGUCCGCGGA	3384
	GCCAACGGCCGCCAAGCGCTAGG	1684	GCCAACGGCCGCCAAGCGCU	3385
	GCCTATTAAACGGCCGGCGCGCGG	1685	GCCUAUUAACGGCCGGCGCG	3386
	CGCGACTGCCACGATTGTGCGGG	1686	CGCGACUGCCACGAUUGUGC	3387
	CAGTCGCGGCGCCCGACGTTCCGG	1687	CAGUCGCGGCGCCCGACGUU	3388
	CCGTGAGCGGTCCTAGCGCTTGG	1688	CCGUGAGCGGUCCUAGCGCU	3389
	AGTCGCGGCGCCCGACGTTCCGG	1689	AGUCGCGGCGCCCGACGUUC	3390
	CATGGCGGCGCTCTCGCTGTGG	1690	CAUGGCGGCGGUCUUCGUG	3391

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 6】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	CTTGACGCCCCGCACAATCGTGG	1691	CUUGACGCCCCGCACAUCG	3392
	GGGATCCGCCGCACTCACCACGG	1692	GGGAUCCGCCGCACUCACCA	3393
	ACATCTTCGCTGCCCGTCCGCGG	1693	ACAUCUUCGCUGCCCGUCCG	3394
	CGGAGCGGACTGCGTGTCCGCGG	1694	CGGAGCGGACUGCGUGUCCG	3395
	ACGGCCGCCATGTCGGTGCGGGG	1695	ACGGCCGCCAUGUCGGUGCG	3396
	GCTCACGGCCGCCGAACGTCGG	1696	GCUCACGGCCGCCGAACGU	3397
	TATTAACGGCCGGCGCGCGCGG	1697	UAUUAACGGCCGGCGCGCGG	3398
	AGCCTACTGCGACCCGCTACCGG	1698	AGCCUACUGCGACCCGCUAC	3399
	GCCTACTGCGACCCGCTACCGGG	1699	GCCUACUGCGACCCGCUACC	3400
	GCGGGCCGTGCGGTGTGCGTCCG	1700	GCGGGCCGUGCGGUUGCGUC	3401
	ATTGTGCGGGGCGTCAAGTTTGG	1701	AUUGUGCGGGGCGUCAAGUU	3402
	GCCGCGCGCCGGCGCTTAATAGG	1702	GCCGCGCGCCGGCGGUAAU	3403
	GCGACGGCCATGTCAGTGCGGGG	1703	GCGACGGCCAUGUCAGUGCG	3404
	AAACACAACCATGTTGACCGGGG	1704	AAACACAACCAUGUUGACCG	3405
	GGGACTGCAAGCATCCGGGTCCG	1705	GGGACUGCAAGCAUCCGGGU	3406
	CTGGAGGCCGGGTGCAACAGCGG	1706	CUGGAGGCCGGGUCGAACAG	3407
	GGAGCAAGCCTATTAACGGCCGG	1707	GGAGCAAGCCUAUUAACGGC	3408
	CCGCACAATCGTGGCAGTCGCGG	1708	CCGCACAACUGUGGCAGUCG	3409
	TGAGCGGTCTAGCGCTTGCGCG	1709	UGAGCGGUCCUAGCGCUUGG	3410
	ATGTCGGTGCGGGGCGCTCAGGG	1710	AUGUCGGUGCGGGGCGCUCA	3411
	GCCCGGTAGCGGGTCGAGTAGG	1711	GCCCGGUAGCGGGGCGCAGU	3412
	TGCACCTTTCCAACCTCCGTCTGG	1712	UGCACCUUCCAACUCCGUC	3413
	TTGTGCGGGGCGTCAAGTTTGGG	1713	UUGUGCGGGGCGUCAAGUUU	3414
	TCCTAGCGCTTGCGGGCCGTTGG	1714	UCCUAGCGCUUGGCGGCCGU	3415
	CGGACTTTGCCCGGTGTGTGGG	1715	CGGACUUUGCCCGGUGUGUG	3416
	AGACGGCCGCCATGTCGGTGCGG	1716	AGACGGCCGCCAUGUCGGUG	3417
	GGTTTTCGGTTATAGCCGGCCGG	1717	GGUUUUCGGUUAUAGCCGGC	3418
	GGGCGAGAGTCATGACACGAGG	1718	GGGCGAGAGUCAUGACACGG	3419
	GCATTCACTTCCAACGACCCAGG	1719	GCAUUCAGUCCAACGACCC	3420
	GGAACGGAGACCGCGTCTGCGG	1720	GGAACGGAGACCGGUCCUG	3421
	ACTCAGCGACCTTGCCCCGAAGG	1721	ACUCAGCGACCUUGGCCCGA	3422
	GCGGGATTAAACCCACGTCCTGG	1722	GCGGGAUUAACCCACGUCC	3423
	GGTAGCGGGTCGAGTAGGCTGG	1723	GGUAGCGGGUCGCAGUAGGC	3424
	AGATGTTAGCCTTCGCTGCCAGG	1724	AGAUGUUAAGCCUUCGUGCC	3425
	CGGGCCGTGCGGTTGCGTCCGGG	1725	CGGGCCGUGCGGUUGCGUCC	3426
	CGCGGACTTTGCCCGGTGTGTGG	1726	CGCGGACUUUGCCCGGUGUG	3427
	GAGTCATGACACGGAGGAACTGG	1727	GAGUCAUGACGAGGGAAC	3428
PTPN2	CTCTTCGAACTCCCCTCGATGG	1728	CUCUUCGAACUCCCGCUCGA	3429
	ACGGCCGACAGGGCTTGCGTGG	1729	ACGGCCGACAGGGCUUGGCG	3430
	TTCGAACTCCCGCTCGATGGTGG	1730	UUCGAACUCCCGCUCGAUGG	3431
	CGTGCCGCGCGCAGGGACCACGG	1731	CGUGCCGCGCGCAGGGACCA	3432
	GCGTGCCGCGGACTTCTCAGGGG	1732	GCGUGCCGCGGACUUCUCAG	3433

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 7】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	GATGCGCCACCAGCGTTGCGCGG	1733	GAUGCGCCACCAGCGUUGCG	3434
	AGCGAGCTTCGCCTCGCAGAGGG	1734	AGCGAGCUUCGCCUCGCAGA	3435
	GAGGTCGGCGACTGCCGCGTGGG	1735	GAGGUCGGCGACUGCCGCGU	3436
	GCACGATCCGGGGAGAGCGCTGG	1736	GCACGAUCCGGGGAGAGCGC	3437
	AGCGTGCCGCGCACTTCTCAGGG	1737	AGCGUGCCGCGCACUUCUCA	3438
	GTACTTTCCCCACGCCGACAGG	1738	GUACUUUCCCCACGCCGAC	3439
	ACGAGTCCGGGTCTCGGAGGAGG	1739	ACGAGUCCGGGUCUCGGAGG	3440
	TAGCGCGGGTTACTGGAATGGG	1740	UAGCGCGGGUUACUGGAU	3441
	CGGACGTCAGCGCGCAGACTCGG	1741	CGGACGUCAGCGCGCAGACU	3442
	AGCGTTGCGCGGCCCGGGTCTGG	1742	AGCGUUGCGCGGCCCGGGUC	3443
	GCGTTGCGCGGCCCGGGTCTGGG	1743	GCGUUGCGCGGCCCGGGUCU	3444
	CGTGGGTAGCGCGGGTTACTGG	1744	CGUGGGUAGCGCGGGUUAC	3445
	TGGTGAGTCGCGGACCCACGCGG	1745	UGGUGAGUCGCGGACCCACG	3446
	CCGCGACTCACCAAGTACAGCGG	1746	CCGCGACUCACCAAGUACAG	3447
	TCGGAAGACGCAAGCCCAAGGGG	1747	UCGGAAGACGCAAGCCCAAG	3448
	CGCCCCGAGCGAGAGGCTAGAGG	1748	CGCCCCGAGCGAGAGGCUAG	3449
	GTCGGAAGACGCAAGCCCAAGGG	1749	GUCGGAAGACGCAAGCCCAA	3450
	TTCATTTGTGACACCCGTCTGGG	1750	UUCAUUUGGACACCCGUCU	3451
	CTCAGGCCCGCACGATCCGGGG	1751	CUCAGGCCCGCACGAUCCG	3452
	AGCGCTCTCCCGGATCGTGC GG	1752	AGCGCUCUCCCGGAUCGUG	3453
	ACGGCGAAGCTGCGGCCCGGGGG	1753	ACGGCGAAGCUGCGGCCCGG	3454
	AGACCCGGGCGCGCAACGCTGG	1754	AGACCCGGGCGCGCAACGC	3455
	TCGGCCGTGGGGAAAGTACCTGG	1755	UCGGCCGUGGGGAAAGUACC	3456
	CGAGCGGGAGTTTCGAAGAGTTGG	1756	CGAGCGGGAGUUCGAAGAGU	3457
	CGCCAAGCCCTGTCGCGCGTGGG	1757	CGCCAAGCCUGUCGCGCGU	3458
	TCGCCTCTAGCCTCTCGCTCGGG	1758	UCGCCUCUAGCCUCUCGCUC	3459
	AGCAAGAGAGCGGTTCAGCGCAGG	1759	AGCAAGAGAGCGGUCAGCGC	3460
	ACGCCAAGCCCTGTCGCGCGTGG	1760	ACGCCAAGCCUGUCGCGCG	3461
	TCGTTCGGGAAGGTTCTATGGG	1761	UCGUUCCGGGAAGGUUCUAU	3462
	AGCGCAAGCGCAGTTAGTTCTGG	1762	AGCGCAAGCGCAGUUAUUC	3463
	CACGAGGTGAGCCGCCCTTGGG	1763	CACGAGGUGAGCCGCCCUU	3464
	ATTCAATTTGTGACACCCGTCTGG	1764	AUUCAUUUGGACACCCGUC	3465
	GCCGACTTCGCGCCGCGCTCGGG	1765	GCCGACUUCGCGCCGCGCUC	3466
	CTGGCGGAGCCGCGGTGGTTGGG	1766	CUGGCGGAGCCGCGGUGGUU	3467
	CGGTGGTCCGTGGGTAGCGCGGG	1767	CGGUGGUCCGUGGGUAGCGC	3468
	GTCTTCCGACAAGAGAGAGCGG	1768	GUCUCCGACAAGAGAGAGG	3469
	GCGCAGTTAGTTCTGGAGGCGG	1769	GCGCAGUUAUUCUGGAGGG	3470
	CAGTAACCCCGCGCTACCCACGG	1770	CAGUAACCCCGCGCUACCCA	3471
	GCAAGCGCAGTTAGTTCTGGAGG	1771	GCAAGCGCAGUUAUUCUGG	3472
	CGCCTCTAGCCTCTCGCTCGGGG	1772	CGCCUCUAGCCUCUCGCUCG	3473
	TGGTCCCTGCGCGCGGCACGAGG	1773	UGGUCCUGCGCGCGGCACG	3474
	TACTTTCCCCACGGCCGACAGGG	1774	UACUUUCCCCACGGCCGACA	3475

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 8】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	CGTTCGGGAAGGTTCTATGGGG	1775	CGUCCGGGAAGGUUCUAUG	3476
	TGTCGGAAGACGCAAGCCCAAGG	1776	UGUCGGAAGACGCAAGCCCA	3477
	GAGCGAGCTTCGCCTCGCAGAGG	1777	GAGCGAGCUUCGCCUCGCAG	3478
CISH	TCGCGATTGGTCAGCTCGCGGGG	1778	UCGCGAUUGGUCAGCUCGCG	3479
	ACCAATCGCGACGCTGAAGGTGG	1779	ACCAAUCGCGACGCUAAGG	3480
	CGTCGCGATTGGTCAGCTCGCGG	1780	CGUCGCGAUUGGUCAGCUCG	3481
	CTGACCAATCGCGACGCTGAAGG	1781	CUGACCAAUCGCGACGCUGA	3482
	GTCGCGATTGGTCAGCTCGCGGG	1782	GUCGCGAUUGGUCAGCUCGC	3483
	CAACGACGCAGAATGCCAGAAGG	1783	CAACGACGCAGAAUGCCAGA	3484
	AGGGCCCTCTTATCTCGCGGTGG	1784	AGGGCCCUUUAUCUCGCGG	3485
	CGGCTAAAGGAGGAACTCACAGG	1785	CGGCUAAAGGAGGAACUCAC	3486
	AATAGCAGCGCTGGACCCGGGG	1786	AAUAGCAGCGGUGGACCCG	3487
	TTATCTCGCGGTGGAACCTCGTGG	1787	UUAUCUCGCGGUGGAACUCG	3488
	TCCACCTTCAGCGTCGCGATTGG	1788	UCCACCUUCAGCGUCGCGAU	3489
	GTGGCGCGGACCGCTGCGAGGG	1789	GUGGCGCGGACCGCCUGCGA	3490
	TCGCGCTGCCGCGGGGACATGG	1790	UCGCCGUGCCGCGGGGACA	3491
	CCAATAGCAGCGCTGGACCCGG	1791	CCAAUAGCAGCGGUGGACC	3492
	AGTTCACCGCGAGATAAGAGGG	1792	AGUCCACCGCGAGAUAGA	3493
	TCTGCGTTCAGGGGTAAGCGCGG	1793	UCUGCGUUCAGGGGUAAGCG	3494
	CCGGTTTCCCAATCCACAGTGGG	1794	CCGGUUCCTCAUCCACAGU	3495
	GTTCTCCCGTGCGCCCTCGTGG	1795	GUUCUCCCGUGCGCCCUUCG	3496
	TCGCGGTGGAACCTCGTGGCAGGG	1796	UCGCGGUGGAACUCGUGGCA	3497
	GAGTTCACCGCGAGATAAGAGG	1797	GAGUCCACCGCGAGUAAG	3498
	TAGAACCGCGGGCTGAGCGGTGG	1798	UAGAACCGCGGGCUGAGCGG	3499
	GGACCATGTCCCGCGGCAGCGG	1799	GGACCAUGUCCCGCGGCAG	3500
	AGTGGCGCGGACCGCTGCGAGG	1800	AGUGGCGCGGACCGCUGCG	3501
	GCGCGGAGCGCTGCTGGGTAGG	1801	GCGCGGAGCGCGUGCUGGU	3502
	CGTGTGGGACGGCGCTCCTGG	1802	CGUGUUGGACGGCCGCUCC	3503
	CTTCTGGCATTCTGCGTCGTTGG	1803	CUUCUGGCAUUCUGCGUCGU	3504
	ACCGGGGGCTGGCCGGCTAAAGG	1804	ACCGGGGGCUGGCCGGCUAA	3505
	AGAACCGCGGGCTGAGCGGTGGG	1805	AGAACCGCGGGCUGAGCGGU	3506
	CGCAGAGGACCATGTCCCCGCGG	1806	CGCAGAGGACCAUGUCCCG	3507
	GCAGCGTCTTCCTAGAACC GCGG	1807	GCAGCGUCUCCUAGAACC G	3508
	GGAGCGGCCGTCCCAACACGGGG	1808	GGAGCGGCCGUCCCAACACG	3509
	GACCGCCGGCTTGACCTCAGTGG	1809	GACCGCCGGCUUGACCUCAG	3510
	GGAGGGCCAATAGCAGCGCTGG	1810	GGAGGGCCAUAAGCAGCGG	3511
	TCTGGCATTCTGCGTCGTTGGGG	1811	UCUGGCAUUCUGCGUCGUUG	3512
	ACGCCGACAGACCTCCTTGAGG	1812	ACGCCGACAGACCUCCUUGG	3513
	AGGAGCGGCGCTCCCAACACGGG	1813	AGGAGCGGCGUCCCAACAC	3514
	ACTGAGCGCAGACGGACCTCAGG	1814	ACUGAGCGCAGACGGACCUC	3515
	GCGACTCCGGAGTGGGACTCGG	1815	GCGACUCCGGAGUGGGGACU	3516
	CTTTCAGGAAAACGGGGCGGGG	1816	CUUCCAGGAAAACGGGGCGG	3517

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 9】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	GTGTGCAAGCGCCCCGTGTTGGG	1817	GUGUGCAAGCGCCCCGUGUU	3518
	CTGTGTGTCGGGTGTCGGATTGG	1818	CUGUGUGUCGGGUGUCGGAU	3519
	CCCGCGCCAGATTGCCTTCTGG	1819	CCCGCGCCAGAUUGCCUUC	3520
	TTCTGGCATTCTGCGTCGTTGGG	1820	UUCUGGCAUUCUGCGUCGUU	3521
	TCGTGCTAGCTGCCGGGCATTGG	1821	UCGUGCUAGCUGCCGGGCAU	3522
	CGTCTGCGCTCAGTCACCTCTGG	1822	CGUCUGCGCUCAGUCACCUC	3523
	CACACGCCGACAGACCTCCTTGG	1823	CACACGCCGACAGACCUCU	3524
	AGACCGGGTCGGGGAAGTTAAGG	1824	AGACCGGGUCGGGGAAGUUA	3525
	ATTGGCCCTCCCGACCGCTCGG	1825	AUUGGCCCUCCCGACCGCU	3526
	CAGGAGCGGCGCTCCCAACACGG	1826	CAGGAGCGGCGUCCCAACA	3527
	CCCTCGTGGTGGCCGGGAAGGGG	1827	CCCUCGUGGUGCCGGGAAG	3528
PI3KCD.1	GGTCCCAGAAAGTGCCTGTGGG	1828	GGUCCCAGAAAGUGCGCUGU	3529
	AGGTCCCAGAAAGTGCCTGTGG	1829	AGGUCCCAGAAAGUGCGCUG	3530
	GATCGCCGCTGGCTGCGTCAGGG	1830	GAUCGCCGCUGGCUGCGUCA	3531
	CAGTTCGCCTACCGCTAGAGGGG	1831	CAGUUCGCCUACCGCUAGAG	3532
	AGCAAACGCGGCGAGCAACGCGG	1832	AGCAAACGCGGCGAGCAACG	3533
	CGGTTTTTGCCGCGTAACCCCGG	1833	CGGUUUUGCCGCGUAACCC	3534
	TTGCCGCGTAACCCCGGCTCGG	1834	UUGCCGCGUAACCCCGGCU	3535
	GGACGGTAAGCGATCGCCGCTGG	1835	GGACGGUAAGCGAUCGCCGC	3536
	GCGGCGATCGCTTACCGTCCCGG	1836	GCGGCGAUCGCUUACCGUCC	3537
	CCTCTAGCGGTAGCGAACTGGG	1837	CCUCUAGCGGUAGCGGAACU	3538
	CGATCGCCGCTGGCTGCGTCAGG	1838	CGAUCGCCGUGGCUGCGUC	3539
	CCCTCTAGCGGTAGGCGAACTGG	1839	CCCUCUAGCGGUAGGCGAAC	3540
	AGGTAGGGGCGAGATTTCCGGGG	1840	AGGUAGGGGCGAGAUUCCG	3541
	GATGATGCCCTCTAGCGGTAGG	1841	GAUGAUGCCCUUAGCGGU	3542
	CCGGATCTGCGGCGAGCCGGGG	1842	CCGGAUCUGCGGCGAGCCG	3543
	CCGCTCCGAGCGCTGACTAGAGG	1843	CCGCUCCGAGCGCUGACUAG	3544
	CCGAAAAGTGCCTGTGGGTGGG	1844	CCGAAAAGUGCGCUGUGGGU	3545
	GGCGAGATTTCCGGGGTCGCGGG	1845	GGCGAGAUUCCGGGGUCGC	3546
	CCCGAAAAGTGCCTGTGGGTGG	1846	CCCGAAAAGUGCGCUGUGGG	3547
	AGGACCCGGCTCGCTAGACTCGG	1847	AGGACCCGGCUCGCUAGACU	3548
	GGAAC TGGGACGACCTTTCGTGG	1848	GGAACUGGGACGACCUUUCG	3549
	GCAAACGCGGCGAGCAACGCGGG	1849	GCAAACGCGGCGAGCAACGC	3550
	GGTCCTCGCGTGGCACCCTTGGG	1850	GGUCCUCGCGUGGCACCCUU	3551
	CCCCCGTGGGCCCGCCGAGAGGG	1851	CCCCCGUGGGCCCGCCGAGA	3552
	CTCTAGTCAGCGCTCGGAGCGGG	1852	CUCUAGUCAGCGCUCGAGC	3553
	CAGTTTTCGGATGGAGCGCGGGG	1853	CAGUUUCGGAUGGAGCGCG	3554
	GAACTGGGACGACCTTTCGTGGG	1854	GAACTGGGACGACCUUUCGU	3555
	TGGGCGCGAGTGAGCCTCGAGGG	1855	UGGGCGCGAGUGAGCCUCGA	3556
	AACGCGGCGAGCAACGCGGGAGG	1856	AACGCGGCGAGCAACGCGGG	3557
	TAGACTCGGGGAGCGCCAGGG	1857	UAGACUCGGGGAGCGCCCA	3558
	TCGCGCCTCAGCCGGCGCACCGG	1858	UCGCGCCUCAGCCGGCGCAC	3559

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 0】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	CGCCTCAGCCGGCGCACCGGAGG	1859	CGCCUCAGCCGGCGCACCGG	3560
	GGACCCGGCTCGCTAGACTCGGG	1860	GGACCCGGCUCGCUAGACUC	3561
	CCAGTTTTCGGATGGAGCGCGGG	1861	CCAGUUUGCGGAUGGAGCGC	3562
	CTCTAGCGGTAGGCGAACTGGGG	1862	CUCUAGCGGUAGGCGAACUG	3563
	TAGGACTTCTCAGGAATCGGCGG	1863	UAGGACUUCUCAGGAAUCGG	3564
	CGAGATCAGCTCCGGATCTGCGG	1864	CGAGAUCAAGCUCGGAUCUG	3565
	GACCCGGCTCGCTAGACTCGGG	1865	GACCCGGCUCGCUAGACUCG	3566
	TGGACCCCGCTGCCGTACAGAGG	1866	UGGACCCCGCUGCCGUACAG	3567
	CGCGAGTGAGCCTCGAGGGAGGG	1867	CGCGAGUGAGCCUCGAGGGA	3568
	GACGACCTTTCGTGGGCACCAGG	1868	GACGACCUUUCGUGGGCACC	3569
	GAGGGCTGCGCACAGTTTCGCCG	1869	GAGGGCUGCGCACAGUUCGC	3570
	AGTCTAGCGAGCCGGGTCTGGG	1870	AGUCUAGCGAGCCGGGUCCU	3571
	CGAGCGCTGACTAGAGGACCAGG	1871	CGAGCGCUGACUAGAGGACC	3572
	TCCGGATCTGCGGCCGAGCCGGG	1872	UCCGGAUCUGCGGCCGAGCC	3573
	CGCGTTTGTGTCAGCGGCGCAGG	1873	CGCGUUUGCUGCAGCGGCGC	3574
	ACCGTCCCGGCGCAGCTGGCAGG	1874	ACCGUCCCGGCGCAGCUGGC	3575
	GCTCGCCGCGTTTGTGTCAGCGG	1875	GCUCGCGCGUUUGCUGCAG	3576
	GTCCGGAATGCAAAGCTGGGGG	1876	GUCCGGAAGCAAAGCUGG	3577
	GATCCCAAGGTGCCACGCGAGG	1877	GAUCCCAAGGGUGCCACGCG	3578
	GTACCGGTGTGCTGCCGGGGG	1878	GUACCGGGUGUCGCGCCGG	3579
	CTTGCTGCACCTCGCGCGCGG	1879	CUUGCCUGCACCUCGCGCGG	3580
	GGCAGGCTGTTTACTTGTGCGGG	1880	GGCAGGCUUUUACUUGUCG	3581
	ACTTGTGCGGGACCCAGCAGTGG	1881	ACUUGUCGGGGACCCAGCAG	3582
	GAGGCTCCGTCCCGAATAGGGG	1882	GAGGCUCGCGCCGAAUAGG	3583
	CGTACCGGTGTGCTGCCGGGG	1883	CGUACCGGGUGUCGCGCCG	3584
	TCCGTCCCGAATAGGGGGCAGGG	1884	UCCGUCGCGAAUAGGGGGCA	3585
	CGTCCCGAATAGGGGGCAGGGG	1885	CGUCCCGAAUAGGGGGCAGG	3586
	CAGGGGGTTCGTTTCGCGTGGG	1886	CAGGGGGUUGCGUUCGCGGU	3587
	AGGAGGCTCCGTCCCGAATAGGG	1887	AGGAGGCUCCGUCGCGAAUA	3588
	TTCTCCGCTGCCGCCCTTGATGG	1888	UUCUCCGCGCCGCCCUUGA	3589
	CGCGGTGGGATTCTCAGCTATGG	1889	CGCGGUGGGAUUCUCAGCUA	3590
	TCCGTACCGGTGTGCTGCCGG	1890	UCCGUACCGGGUGUCGCGC	3591
	CGCACGAGGACGCGCTGTTCGG	1891	CGCACGAGGACGCGCCUGUU	3592
	AGCGCCCGAGCTCACACGGGCGG	1892	AGCGCCCGAGCUCACACGGG	3593
	CCGCTTGCTGCACCTCGCGCGG	1893	CCGCUUGCCUGCACCUCGCG	3594
	GGAGGCTCCGTCCCGAATAGGGG	1894	GGAGGCUCGCGCCGAAUAG	3595
	CGACCCCGCTGTCTCGCCCGG	1895	CGACCCCGCUGUUCUCGCC	3596
	GGGCCTCCGGGCGAGAACAGCGG	1896	GGGCCUCCGGGCGAGAACAG	3597
	AGGACGCGCCTGTTCGGGGCAGG	1897	AGGACGCGCCUGUUCGGGGC	3598
	CGTCCTCGTGCGAAGCCCGCTGG	1898	CGUCCUGUGCGAAGCCCGC	3599
	TGACCCCGGGGGGCACAAAAGG	1899	UGACCCCGGGGGGCACAAA	3600
	TTGCCTGCACCTCGCGCGGCGGG	1900	UUGCCUGCACCUCGCGCGGC	3601

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 1】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	GCACGAGGACGCGCCTGTTTCGGG	1901	GCACGAGGACGCGCCUGUUC	3602
	CCAGCGTGCGCGCGCCGTCGGGG	1902	CCAGCGUGCGCGCGCCGUCG	3603
	GTAAACAGCCTGCCCCGAACAGG	1903	GUAAACAGCCUGCCCCGAAC	3604
	CGGTACGGAGCCCACCTGTGCGG	1904	CGGUACGGAGCCCACCUGUG	3605
	CCCGGCAGCGACACCCGGTACGG	1905	CCCGGCAGCGACACCCGGUA	3606
	GCGGTGGGATTCTCAGCTATGGG	1906	GCGGUGGGAUUCUCAGCUAU	3607
	CCTCCAGCGGGCTTCGCACGAGG	1907	CCUCCAGCGGGCUUCGCACG	3608
	GATCCCATCAAGGCGGCGAGCGG	1908	GAUCCCAUCAAGGCGGCGAG	3609
	TTTCCGCTCCCCGCTTTGCAAGG	1909	UUUCCGCUCCCCGCUUUGCA	3610
	CTCCGTCGCGAATAGGGGGCAGG	1910	CUCCGUCCCGAAUAGGGGGC	3611
	TCTCCGCTGCCGCCCTTGATGGG	1911	UCUCCGUGCCGCCCUUGAU	3612
	AGCCAGCGTGCGCGCGCCGTCGG	1912	AGCCAGCGUGCGCGCGCCGU	3613
	GCTCAGGGTGCGAACCCCAAGGG	1913	GCUCAGGGUGCGAACCCCAA	3614
	TAGGAGAGGAGAGCGTCGCGCGG	1914	UAGGAGAGGAGAGCGUCGCG	3615
	CGCCCTTGATGGGATCCGTGAGG	1915	CGCCCUUGAUGGGAUCCGUG	3616
	CACCTGTGCGGGCGCTCTCGGGG	1916	CACCUGUGCGGGCGUCUGCG	3617
	TCTGCGGATGCCCTTGCAAAGCGG	1917	UCUGCGGAUGCCUUGCAAAG	3618
	GCGCGAGGTGCAGGCAAGCGGGG	1918	GCGCGAGGUGCAGGCAAGCG	3619
	AGGCATCCGCAGAAAGGGCGGGG	1919	AGGCAUCCGCAGAAAGGGCG	3620
	GCCAGCGTGCGCGCGCCGTCGGG	1920	GCCAGCGUGCGCGCGCCGUC	3621
	CTCACGGATCCCATCAAGGGCGG	1921	CUCACGGAUCCCAUCAAGGG	3622
	CCTCCGGGCGAGAACAGCGGGGG	1922	CCUCCGGGCGAGAACAGCGG	3623
	AAGCGCCACCTGCAAAGCAAGGG	1923	AAGCGCCACCUGCAAAGCAA	3624
	GCCTCCGGGCGAGAACAGCGGGG	1924	GCCUCCGGGCGAGAACAGCG	3625
	AGAAGCGCCCGAGCTCACACGGG	1925	AGAAGCGCCCGAGCUCACAC	3626
	GCTTCCTTTTGTGCCCCCGGGG	1926	GCUUCUUUUUGUGCCCCCGG	3627
	GCGAACGCAACCCCTGCCTCGG	1927	GCGAACGCAACCCCUGCCU	3628
MAP4K1	CACGACCCCGTTCCCGCGGAGG	1928	CACGACCCCGUUCGCGCGG	3629
	CGAGATGAGCACCGGTGAGTGGG	1929	CGAGAUGAGCACCGGUGAGU	3630
	ACGGCATCCCCAAGACTTAGGG	1930	ACGGCAUCCCCAAGACUUA	3631
	CGCTTAGCCTGAGGCACTACGGG	1931	CGCUUAGCCUGAGGCACUAC	3632
	GGGGGTCGTGACCTCCGAGTGGG	1932	GGGGGUCGUGACCUCCGAGU	3633
	ATGCCACCTTGGCGGCAGACGGG	1933	AUGCCACCUUGGCGGCAGAC	3634
	CGGACAGAGGCGTCGGCAGTGGG	1934	CGGACAGAGGCGUCGGCAGU	3635
	CCCGGTCAGCAGCGCAACACGG	1935	CCCGGUCAGCAGCGCAACA	3636
	AGGGCGGGGCTTATCAGATCCGG	1936	AGGGCGGGGCUUAUCAGAUC	3637
	GCGCGCCAAAGCGACCGTGTGG	1937	GCGCGCCAAAGCGACCGUG	3638
	AGCAGCGCGAACACGGACAGAGG	1938	AGCAGCGCGAACACGGACAG	3639
	GGTCACGACCCCGTTCCCGCGG	1939	GGUCACGACCCCGUUCGCG	3640
	CGGGGCTTATCAGATCCGAGGG	1940	CGGGGCUUAUCAGAUCGGA	3641
	CGGGGTCGTGACCTCCGAGTGG	1941	CGGGGUCGUGACCUCCGAG	3642
	CTGGTGCTCCGCGGGAACGGGG	1942	CUGGUGCCUCCGCGGGAACG	3643

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 2】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	GCGGGGCTTATCAGATCCGGAGG	1943	GCGGGGCUUAUCAGAUCCGG	3644
	TCCGTGTTTCGCGCTGCTGACCGG	1944	UCCGUGUUCGCGCUGCUGAC	3645
	GCTTTGGCGCGCTCTCTTGCTGG	1945	GCUUUGGCGCGCUCUCUUGC	3646
	GGCCTGGGACTTCCGAACCAGGG	1946	GGCCUGGGACUCCGAACCA	3647
	TGGTGCCTCCGCGGGAACGGGG	1947	UGGUGCCUCCGCGGGAACGG	3648
	GACGGCATCCCCAAGACTTAGG	1948	GACGGCAUCCCCAAGACUU	3649
	CTCACGCCGATGCACACAGCGGG	1949	CUCACGCCGAUGCACACAGC	3650
	GGATGCCGTCTAGAAATGTCAGG	1950	GGAUGCCGUCUAGAAAUGUC	3651
	TCGCTTAGCCTGAGGCACTACGG	1951	UCGCUUAGCCUGAGGCACUA	3652
	CGAACCAGGGCCCTAAGTCTTGG	1952	CGAACCAGGGCCCUAAGUCU	3653
	ATGCCGTCTAGAAATGTCAGGGG	1953	AUGCCGUCUAGAAAUGUCAG	3654
	GCATCGCGTGAGCCCCGGCGG	1954	GCAUCGGCGUGAGCCCCGGG	3655
	GCGAACACGGACAGAGGCGTCGG	1955	GCGAACACGGACAGAGGCGU	3656
	GGGGCTTATCAGATCCGGAGGGG	1956	GGGGCUUAUCAGAUCCGGAG	3657
	TGGCCTGGGACTTCCGAACCAGG	1957	UGGCCUGGGACUCCGAACC	3658
	AATGGCAGGTTTTAGTTAACTGG	1958	AAUGGCAGGUUUUAGUUAAC	3659
	TGGAAGCCACACCCACTCGGAGG	1959	UGGAAGCCACACCACUCGG	3660
	GCTACAAGCCACGCCCCCTGAGG	1960	GCUACAAGCCACGCCCCUG	3661
	TGGAAGAGCACCGACTTCCCCGG	1961	UGGAAGAGCACCGACUUCCC	3662
	TCGTGACCTCCGAGTGGGTGTGG	1962	UCGUGACCUCGAGUGGGUG	3663
	CTCTTCCACACGGTGCGCTTTGG	1963	CUCUCCACACGGUGCGCUU	3664
	AGGCACTACGGGACTGAGAAAGG	1964	AGGCACUACGGGACUGAGAA	3665
	GGCCCTGGTTCGGAAGTCCAGG	1965	GGCCUGGUUCGGAAGUCCC	3666
	CCTGGTGCCTCCGCGGGAACGGG	1966	CCUGGUGCCUCCGCGGGAAC	3667
	GCGAGATGAGCACCGGTGAGTGG	1967	GCGAGAUGAGCACCGGUGAG	3668
	GTCTCTTTGAGTGTCTAAGCAGG	1968	GUUCUUUGAGUGUCUAAGC	3669
	CTAGGGGTGGTTTACGACGGGG	1969	CUAGGGGUGGUUCAGGACG	3670
	GCCTGGTGCCTCCGCGGGAACGG	1970	GCCUGGUGCCUCCGCGGGAA	3671
	GCTTAGACACTCAAAGAGACAGG	1971	GCUUAGACACUCAAAGAGAC	3672
	GATAAGGCCTGGTGCCTCCGCGG	1972	GAUAAGGCCUGGUGCCUCCG	3673
	ACCTTGGCGGCAGACGGGCAGGG	1973	ACCUUGGCGGCAGACGGGCA	3674
	CAAGGTGGCATGCCCCACATGG	1974	CAAGGUGGCAUGCCCCACA	3675
	CATGCCACCTTGGCGGCAGACGG	1975	CAUGCCACCUUGGCGGCAGA	3676
	GGCGCGCTCTTGTGCTGGCTGGG	1976	GGCGCGCUCUCUUGCUGGCU	3677
	GATGCCGTCTAGAAATGTCAGGG	1977	GAUGCCGUCUAGAAAUGUCA	3678
NR4A1	CGCGGGGTTCATTTGACGACGGG	1978	CGCGGGGUUCCAUGACGCA	3679
	GGCGGAGGCTACGAAACTTGGGG	1979	GGCGGAGGCUACGAAACUUG	3680
	TAAGCGCTCCGTGACGCACGGGG	1980	UAAGCGCUCGUGACGCACG	3681
	ACGCGGGGTTCATTTGACGACGG	1981	ACGCGGGGUUCCAUGACGC	3682
	AAGAACTTCGGGAGCGCACGCGG	1982	AAGAACUUCGGGAGCGCACG	3683
	TTTGGCCATACAAGGGCGCGGGG	1983	UUUGGCCAUACAAGGGCGCG	3684
	GTTTCGTAGCCTCCGCCACTGGG	1984	GUUUCGUAGCCUCCGCCACU	3685

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 3】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	ATCCGCGCTCCCTGCGTCAATGG	1985	AUCCGCGCUCCCUGCGUCAA	3686
	TTAAGCGCTCCGTGACGCACGGG	1986	UUAAGCGCUCCGUGACGCAC	3687
	GTGGCGGAGGCTACGAAACTTGG	1987	GUGGCGGAGGCUACGAAACU	3688
	GCGGAGGCTACGAAACTTGGGGG	1988	GCGGAGGCUACGAAACUUGG	3689
	ACAGATGCACGTTCCCCGAAGGG	1989	ACAGAUGCACGUUCCCCGAA	3690
	AACAGATGCACGTTCCCCGAAGG	1990	AACAGAUGCACGUUCCCCGA	3691
	TTGTATGGCCAAAGCTCGACGGG	1991	UUGUAUGGCCAAAGCUCGAC	3692
	CTGCGCGCGTGACGCACGCGGGG	1992	CUGCGCGCGUGACGCACGCG	3693
	CTTAAGCGCTCCGTGACGCACGG	1993	CUUAAGCGCUCCGUGACGCA	3694
	GTCACGCGCGCAGACATTCAGG	1994	GUCACGCGCGCAGACAUUCC	3695
	TGCGTCACGGAGCGCTTAAGAGG	1995	UGCGUCACGGAGCGCUUAAG	3696
	CGCTCCGTGACGCACGGGGAGGG	1996	CGCUCCGUGACGCACGGGGA	3697
	TGAGACTCGGGGCGCCAGTCCGG	1997	UGAGACUCGGGGCGCCAGUC	3698
	GCGCTGTAGAGACGCGGCCGCGG	1998	GCGCUGUAGAGACGCGGCCG	3699
	TATGGCCAAAGCTCGACGGGCGG	1999	UAUGGCCAAAGCUCGACGGG	3700
	GTCGAGCTTTGGCCATACAAGGG	2000	GUCGAGCUUUGGCCAUACAA	3701
	TCACGGAGCGCTTAAGAGGAGGG	2001	UCACGGAGCGCUUAAGAGGA	3702
	GTCCAGAATAACCAGCGGGAGGG	2002	GUCCAGAAUAACCAGCGGGA	3703
	TGGGACCCGAGTCCGGTGCGGGG	2003	UGGACCCGAGUCCGGUGCG	3704
	TTGGCCATACAAGGGCGCGGGGG	2004	UUGGCCAUACAAGGGCGCGG	3705
	AAGGAGATGGGTGTACGCGCGGG	2005	AAGGAGAUGGGUGUACGCGC	3706
	GCGCTCCGTGACGCACGGGGAGG	2006	GCGCUCCGUGACGCACGGGG	3707
	CGGGCAATTTCGGACACACCCTGG	2007	CGGGCAAUUCGGACACACCC	3708
	CGTCGAGCTTTGGCCATACAAGG	2008	CGUCGAGCUUUGGCCAUACA	3709
	TGGCGGAGGCTACGAAACTTGGG	2009	UGGCGGAGGCUACGAAACUU	3710
	AGTTTCGTAGCCTCCGCCACTGG	2010	AGUUUCGUAGCCUCCGCCAC	3711
	AGGGCTCTAACTGACGTCTCAGG	2011	AGGGCUCUAACUGACGUCUC	3712
	GCAGGCCGCCCCTCGAGCTTTGG	2012	GCAGGCCGCCCUGCGAGCUU	3713
	GCGGGCTGAGGCGGGCAATTCGG	2013	GCGGGCUGAGGCGGGCAAUU	3714
	TCTGCGCGCGTGACGCACGCGGG	2014	UCUGCGCGCGUGACGCACGC	3715
	GTCTGCGCGCGTGACGCACGCGG	2015	GUCUGCGCGCGUGACGCACG	3716
	TAGGCTCCCCGCACCGGACTCGG	2016	UAGGCUCCCCGCACCGGACU	3717
	TTGTAGGGCCGGCATGCAAGAGG	2017	UUGUAGGGCCGGCAUGCAAG	3718
	GCTTTGGCCATACAAGGGCGCGG	2018	GCUUUGGCCAUACAAGGGCG	3719
	GGGCTCTAACTGACGTCTCAGGG	2019	GGGCUCUAACUGACGUCUCA	3720
	CTGTGCACTAGCTGCGCCTAGGG	2020	CUGUGCACUAGCUGCGCCUA	3721
	AGAGTGAGGAGATCCTCATCCGG	2021	AGAGUGAGGAGAUCCUCAUC	3722
	GCTCCGTGACGCACGGGGAGGGG	2022	GCUCCGUGACGCACGGGGAG	3723
	TCGGGGCGCCAGTCCGGGCAGGG	2023	UCGGGGCGCCAGUCCGGGCA	3724
	CGCAGCTAGTGACAGGACGCGG	2024	CGCAGCUAGUGCACAGGACG	3725
	CGGCCGGGTAGGTTCCCTTCGGG	2025	CGGCCGGGUAGGUUCCCUUC	3726
	CTATTTTTAGCGGGCGCGGCGGG	2026	CUAUUUUAGCGGGCGCGGC	3727

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 4】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	CCCGCTGGTTATTCTGGACCTGG	2027	CCCGCUGGUUAUUCUGGACC	3728
NR4A2	CTCGAAACCGAAGAGCCACAGG	2028	CUCGAAACCGAAGAGCCAC	3729
	TCGAGGGCAAACGACCTCTCCGG	2029	UCGAGGGCAAACGACCUCUC	3730
	TAACTATACGACCCATTTGGAGG	2030	UAACUAUACGACCAUUGG	3731
	TCGGAAGCGGGCGCTAACAGGG	2031	UCGGAAGCGGGCGUAACA	3732
	CTCGGAAGCGGGCGCTAACAGG	2032	CUCGGAAGCGGGCGUAAC	3733
	AGCCGGGTTGGAGTCGACATGGG	2033	AGCCGGGUUGGAGUCGACAU	3734
	AGTCGACATGGGCCCTGACGAGG	2034	AGUCGACAUGGGCCUGACG	3735
	AGACTCACCAGGGGGCGAAGGGGG	2035	AGACUACCCAGGGGGCGAAGG	3736
	CTTTAACTATACGACCCATTTGG	2036	CUUUAACUAUACGACCAUU	3737
	GTCGACATGGGCCCTGACGAGGG	2037	GUCGACAUGGGCCUGACGA	3738
	AGCGCCGCTTTTCCGAGCCAGG	2038	AGCGCCGCUUUUCCGAGCCC	3739
	GGCCCATGTCGACTCCAACCCGG	2039	GGCCCAUGUCGACUCCAACC	3740
	ATGTGGACAAACCGACAGATGGG	2040	AUGUGGACAAACCGACAGAU	3741
	TGTGGGCTCTTCGTTTTCGAGGG	2041	UGUGGGCUCUUCGCUUUCGA	3742
	TCAGACTCACCAGGGGGCGAAGGG	2042	UCAGACUACCCAGGGGGCGAA	3743
	GTCTGATCAGTGCCCTCGTCAGG	2043	GUCUGAUCAGUGCCUCGUC	3744
	GCACTGATCAGACTCACCAGGGG	2044	GCACUGAUCAGACUACCCGG	3745
	GACAGTTTAAAAGCCGGAGAGG	2045	GACAGUUAAAAGCCGGAG	3746
	ATCAGACTCACCAGGGGGCGAAGG	2046	AUCAGACUACCCAGGGGGCGA	3747
	CAACCCGGCTATGACCAGCCTGG	2047	CAACCCGGCUAUGACCAGCC	3748
	GGCACTGATCAGACTCACCAGGGG	2048	GGCACUGAUCAGACUACCCG	3749
	CTGAGAGTTAATGACGGATGTGG	2049	CUGAGAGUUAUGACGGAUG	3750
	TCCAGGGTAAGAAGCTGGCGGGG	2050	UCCAGGGUAAGAAGCUGGCG	3751
	GTTCGCACAGACAGTTTAAAAGG	2051	GUUCGCACAGACAGUUAAA	3752
	TACCCTGGAATAGTCCAGGCTGG	2052	UACCCUGGAUAGUCCAGGC	3753
	TGACCAGCCTGGACTATTCCAGG	2053	UGACCAGCCUGACUAUUC	3754
	TTAACTCTCAGATTCAACGGGG	2054	UUAACUCUCAGAUUCAACGG	3755
	ATTAACCTCTCAGATTCAACGGGG	2055	AUUAACUCUCAGAUUCAACG	3756
	GTCTGTGCGAACCCTGCAAAGG	2056	GUCUGUGCGAACCACUGCAA	3757
	TGAGAGTTAATGACGGATGTGGG	2057	UGAGAGUUAUGACGGAUGU	3758
	CAATGGGTCGTATAGTTAAAGG	2058	CAAAUGGGUCGUUAGUUAA	3759
	TAGCCGGGTTGGAGTCGACATGG	2059	UAGCCGGGUUGGAGUCGACA	3760
	TCTGATCAGTGCCCTCGTCAGGG	2060	UCUGAUCAGUGCCUCGUCA	3761
	TTCTTACCTGGAATAGTCCAGG	2061	UUCUUACCCUGGAAUAGUCC	3762
	CCCCCGCCAGCTTCTTACCTTGG	2062	CCCCCGCCAGCUUCUACCC	3763
	CAGACTCACCAGGGGGCGAAGGGG	2063	CAGACUACCCAGGGGGCGAAG	3764
	ACTATTCAGGGTAAGAAGCTGG	2064	ACUAUCCAGGGUAAGAAGC	3765
	GACCAGCCTGGACTATTCCAGGG	2065	GACCAGCCUGGACUAUCCA	3766
	CTGGCGGGGGGATATCATGTGG	2066	CUGGCGGGGGGAUAUCAUG	3767
	GAGAGTTAATGACGGATGTGGGG	2067	GAGAGUUAUGACGGAUGUG	3768
	CAGGCTGGTCATAGCCGGGTGG	2068	CAGGCUGGUCAUAGCCGGGU	3769

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 5】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	TTAATGACGGATGTGGGGAGGGG	2069	UUAUAGACGGAUGUGGGGAG	3770
	CGTATAGTTAAAGGAGAGAAGGG	2070	CGUAUAGUAAAGGAGAGAA	3771
	AGTTAATGACGGATGTGGGGAGG	2071	AGUUAUAGACGGAUGUGGGG	3772
	TTAATGCTTCTAGTCAGTGAAGG	2072	UUAUAGCUUCUAGUCAGUGA	3773
	GAGGGGTCTGCCATCTGTCTGG	2073	GAGGGGUCCUGCCCAUCUGU	3774
	TCGTATAGTTAAAGGAGAGAAGG	2074	UCGUUAUAGUAAAGGAGAGA	3775
	CTGTGGGCTCTTCGGTTTCGAGG	2075	CUGUGGGCUUCUGGUUUCG	3776
	TAGTCCAGGCTGGTCATAGCCGG	2076	UAGUCCAGGCUGGUCAUAGC	3777
	CATTAATCTCAGATTCACCGGG	2077	CAUUAACUCUCAGAUUCAAC	3778
	CTACGCACATGATCGAGCAGAGG	2078	CUACGCACAUGAUCGAGCAG	3779
	GATCCCGGGTCTGCCACATGGG	2079	GAUCCCGGGUCGUCCCAU	3780
	CCGGGTCTGGCTGAATGCGAGGGG	2080	CCGGGUCGGCUGAAUGCGAG	3781
	TGGACGCGGGCTTGCGAATGGGG	2081	UGGACGCGGGCUUGCGAAUG	3782
	AGTTGCCAGATGCGCTTCGACGG	2082	AGUUGCCAGAUCCGUUCGA	3783
	GTGTCAGATGCGCTTCGACGGG	2083	GUUGCCAGAUCCGUUCGAC	3784
	GGGGCCCGTCGAAGCGCATCTGG	2084	GGGGCCCGUCGAAGCGCAUC	3785
	ATTTCGAAGCCCGCGTCCATGGG	2085	AUUCGCAAGCCCGCGUCCAU	3786
	CATGGACGCGGGCTTGCGAATGG	2086	CAUGGACGCGGGCUUGCGAA	3787
	CATTTCGAAGCCCGCGTCCATGG	2087	CAUUCGCAAGCCCGCGUCCA	3788
	CGGGTCTGGCTGAATGCGAGGGG	2088	CGGGUCGGCUGAAUGCGAGG	3789
	GGGCTTGTAGTAACCGACCCGG	2089	GGGCUUGUAGUAAACCGACC	3790
	AGATCCCGGGTCTGCCACATGG	2090	AGAUCGCGGGUCGUCCACA	3791
	AGCCGGGTCTGGCTGAATGCGAGG	2091	AGCCGGGUCGGCUGAAUGCG	3792
	GCCGGGTCTGGCTGAATGCGAGGG	2092	GCCGGGUCGGCUGAAUGCGA	3793
	GAGACGCGTGGCCGATCTGCAGG	2093	GAGACGCGUGGCCGACUUGC	3794
	ATGGACGCGGGCTTGCGAATGGG	2094	AUGGACGCGGGCUUGCGAAU	3795
	GCGTAGTGCCACGTAGTTCTGG	2095	GCGUAGUGGCCACGUAGUUC	3796
	TTCGGCGGACCCCGGAGAGCTGG	2096	UUCGGCGGACCCCGGAGAGC	3797
	TACGGCGTGCGACCTGTGAGGG	2097	UACGGCGUGCGACCUGUGA	3798
	GCGCACGCCGTAGTGTGGCAGG	2098	GCGCACGCCGUAGUGUUGGC	3799
	AGGTCTGCCCCTCCACCACGTGG	2099	AGGUCUGCCCGUCCACCACG	3800
	CGCATCTGGCAACTAGACACCGG	2100	CGCAUCUGGCAACUAGACAC	3801
	ATCCCGGGTCTGCCACATGGGG	2101	AUCCCGGGUCGUCCCAUUG	3802
	ACTAGACACCGGGTGCCAGGGG	2102	ACUAGACACCGGGUGCCAG	3803
	GTGCCCTCACCGCCGTGCGGGG	2103	GUGCCCUACCGCCGUCGCG	3804
	TCGGCGGACCCCGGAGAGCTGGG	2104	UCGGCGGACCCCGGAGAGCU	3805
	CGGACAGCAGTCTCCATTAAGG	2105	CGGACAGCAGUCCUCCAUA	3806
	TGTCGAGCAGCTGAGACGCGTGG	2106	UGUCGAGCAGCUGAGACGCG	3807
	TAGTAAACCGACCCGAGTGCGG	2107	UAGUAAACCGACCCGAGUG	3808
	CTACGGCGTGCGCACCTGTGAGG	2108	CUACGGCGUGCGCACCUGUG	3809
	TCCGAGGTCCCGGGCACTAGGGG	2109	UCCGAGGUCCCGGCACUAG	3810
	CCGGCTCCAGCAACTTCGGGCGG	2110	CCGGCUCCAGCAACUUCGGG	3811

10

20

30

40

【表 2 - 2 6】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	TCGCATTAGCCGACCCGGCTGG	2111	UCGCAUUCAGCCGACCCGGC	3812
	GGCTCCAGCAACTTCGGGCGGGG	2112	GGCUCCAGCAACUUCGGGCG	3813
	AACTTCGGGCGGGGGCCAGCCGG	2113	AACUUCGGGCGGGGGCCAGC	3814
	AGGTGCGCACGCCGTAGTGTGG	2114	AGGUGCGCACGCCGUAGUGU	3815
	CTAGACACCGGGGTGCCAGGGGG	2115	CUAGACACCGGGGUGCCAGG	3816
	TAGTGGCCACGTAGTTCTGGTGG	2116	UAGUGGCCACGUAGUUCUGG	3817
	GATGATGCCGCACTCCGGGTCCG	2117	GAUGAUGCCGCACUCCGGGU	3818
	GCGCACAGCCCCTCGTTGAGGG	2118	GCGCACAGCCCUCGUUGGA	3819
	GCGTGGCCGATCTGCAGGCCCGG	2119	GCGUGGCCGAUCUGCAGGCC	3820
	ATGCGAGGGGATGCGACCCTGG	2120	AUGCGAGGGGAUGCGACCC	3821
	GCTGTCCGACAGGGGCATTGG	2121	GCUGUCCGACAGGGGCAUU	3822
	GCCAGGGGGCGATTGCTTAAAGG	2122	GCCAGGGGGCGAUUGCUUAA	3823
	CGGCATCATCTCCTCAGACTGGG	2123	CGGCAUCAUCUCCUCAGACU	3824
	CCGGGTTTCATGGGGACGTGCAGG	2124	CCGGGUUCAUGGGGACGUGC	3825
	CGCGGGCTTGCGAATGGGGTTGG	2125	CGCGGGCUUGCGAAUGGGGU	3826
	AACGCGGCCTGCCAACACTACGG	2126	AACGCGGCCUGCCAACACUA	3827
	CTGCTCGATCATGTGCGTAGTGG	2127	CUGCUCGAUCAUGGCGUAG	3828
NR4A3	GTACGGGTGGCTCTCAAGCGCGG	2128	GUACGGGUGGCUCUCAAGCG	3829
	CCACCTCGGCTACGACCCGACGG	2129	CCACCUCGGCUACGACCCGA	3830
	CATAACGCCCCCGCTGCGGGGG	2130	CAUAACGCCCCCGCCUGCGG	3831
	CGCTTGAGAGCCACCCGTACGGG	2131	CGCUUGAGAGCCACCCGUAC	3832
	CGGCCGTGCGGTCTGAGCCGAGG	2132	CGGCCGUCGGGUCGUAGCCG	3833
	ACCGTGGGGACCGCCTTCATCGG	2133	ACCGUGGGGACCGCCUUAU	3834
	GACGACGAGCTCCTGCTGGGCGG	2134	GACGACGAGCUCCUGCUGGG	3835
	GTGGGGACCGCCTTCATCGGCGG	2135	GUGGGGACCGCCUUAUCGG	3836
	TCGGGTCGTAGCCGAGGTGGTGG	2136	UCGGGUCGUAGCCGAGGUGG	3837
	ATAACGCCCCCGCTGCGGGGG	2137	AUAACGCCCCCGCCUGCGGG	3838
	GCGCTTGAGAGCCACCCGTACGG	2138	GCGCUUGAGAGCCACCCGUA	3839
	CCCGCAGGCGGGGGCGTTATGGG	2139	CCCGCAGGCGGGGGCGUUAU	3840
	TACGGCGTGCGAACCTGCGAGGG	2140	UACGGCGUGCGAACCCUGCA	3841
	AGGTTGCGACGCCGTAGTGTGG	2141	AGGUUCGCACGCCGUAGUGC	3842
	CAGGAGCTCGTCTGTGCGAGG	2142	CAGGAGCUCGUCGUCUGGCG	3843
	TGGGGACCGCCTTCATCGGCGGG	2143	UGGGGACCGCCUUAUCGGC	3844
	CCCGGTTTGAGAGCTGTAATCGG	2144	CCCGGUUUGAGAGCUGUAAU	3845
	TCATCGGCGGGTCCAGCAGCGGG	2145	UCAUCGGCGGGUCCAGCAGC	3846
	CTACGGCGTGCGAACCTGCGAGG	2146	CUACGGCGUGCGAACCUCCG	3847
	TCGCACGCCGTAGTGTGCGAGG	2147	UCGCACGCCGUAGUCUGGC	3848
	CGGGTGGCTCTCAAGCGCGGCGG	2148	CGGGUGGCUCUCAAGCGCGG	3849
	TTTCATCGGCGGGTCCAGCAGCGG	2149	UUCAUCGGCGGGUCCAGCAG	3850
	GCGCCCGGCTGCATCGCACCCGG	2150	GCGCCCGGUGCAUCGCACC	3851
	TGAGCGCGGCAGCGGCCGTGCGG	2151	UGAGCGCGGCAGCGGCCGUC	3852
	AACGCCGCCTGCCAGCACTACGG	2152	AACGCCCGCUGCCAGCACUA	3853

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 7】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スプーサー配列	SEQ
	GATGAAGGCGGTCCCCACGGTGG	2153	GAUGAAGGCGGUCCCCACGG	3854
	AGGAGCTCGTCGTCTGGCGAGGG	2154	AGGAGCUCGUCGUCUGGCCGA	3855
	GCCGATGAAGGCGGTCCCCACGG	2155	GCCGAUGAAGGCGGUCCCCA	3856
	GCGATGCAGCCGGGCGCCGAGGG	2156	GCGAUGCAGCCGGGCGCCGA	3857
	GCTGCTGGACCCGCCGATGAAGG	2157	GCUGCUGGACCCGCCGAUGA	3858
	GCCGATTACAGTCTCAAACCGG	2158	GCCGAUUAACAGCUCUCAAAC	3859
	GGGCACGTGTGCCGTGTGCGGGG	2159	GGGCACGUGUGCCGUGUGCG	3860
	CCACCCGTACGGGCTGCCGCTGG	2160	CCACCCGUACGGGCUGCCGC	3861
	CCCAGCAGGAGCTCGTCGTCTGG	2161	CCCAGCAGGAGCUCGUCGUC	3862
	CAGCAGGCTGGACGCGGTAGGGG	2162	CAGCAGGCUGGACGCGGUAG	3863
	CCCCGCAGGCGGGGGCGTTATGG	2163	CCCCGCAGGCGGGGGCGUUA	3864
	GGCGGCGTTGTCCCGCACACGG	2164	GGCGGCGUUGUCCCGCACA	3865
	CACGCCGTAGTGTGGCAGGCGG	2165	CACGCCGUAGUGCUGGCAGG	3866
	TCCCATAACGCCCCCGCTGCGG	2166	UCCCAUAACGCCCCCGCCUG	3867
	CCTACCGCGTCCAGCCTGCTGGG	2167	CCUACCGCGUCCAGCCUGCU	3868
	AGGGCACGTGTGCCGTGTGCGGG	2168	AGGGCACGUGCCGUGUGC	3869
	TTAGAAGCTCCCTTCAGTGAGGG	2169	UUAGAAGCUCCCUUCAGUGA	3870
	CTCGCCAGCAGGCTGGACGCGG	2170	CUCGCCAGCAGGCUGGACG	3871
	GGACTGCTTGAAGTACATGGAGG	2171	GGACUGCUUGAAGUACAUGG	3872
	TGGCCAGCGGCAGCCCGTACGGG	2172	UGGCCAGCGGCAGCCCGUAC	3873
	GGCTGGGACTCTCGCCAGCAGG	2173	GGCUGGGACUCUCGCCAGC	3874
	GGCTCTCAAGCGCGGCGGCTGG	2174	GGCUCUCAAGCGGCGGCGC	3875
	GGCGGGGGCGTTATGGGACGAGG	2175	GGCGGGGGCGUUAUGGGACG	3876
	TCCTGTGGGGCGGACGGCAGG	2176	UCCUGCUGGGCGGCGACGGC	3877
	CTTAGAAGCTCCCTTCAGTGAGG	2177	CUUAGAAGCUCCCUUCAGUG	3878
	CGCACCCAGTAAATGATGCGGGG	2178	CGCACCCAGUAAAUAGAUGCG	3879
	CGAGGGGAACCTCTCGTTGGGG	2179	CGAGGGGAACUCCUUCGUUG	3880
	TCTCCATTCAACGCCGCGCGGGG	2180	UCUCCAUAACGCCGCGCG	3881
	AAAAACCTCCGAGGTGCGCGGGG	2181	AAAAACCUCCGAGGUGCGCG	3882
	AGACGTCAATGTGACGCCATGGG	2182	AGACGUCAAUGGACGCCAU	3883
	GTGATTCAAGCGGACCACATGGG	2183	GUGAUUCAAGCGGACCACAU	3884
	ACGAGCTCCGCCGAATACGGGG	2184	ACGAGCUCGCCCGAAUACG	3885
	ATTTCTTTACACGTACGGCGTGG	2185	AUUUCUUUACACGUACGGCG	3886
	GGTCATGCGAGCGCAGCCTGCGG	2186	GGUCAUGCGAGCGCAGCCUG	3887
	CGAGCTCCGCCGAATACGGGGG	2187	CGAGCUCGCCCGAAUACGG	3888
	ATCCGGGCACTGGACTCGCGATGG	2188	AUCCGGCACUGGACUCGCGA	3889
	TAGGTAACCGGCCGCTTGTGGGG	2189	UAGGUAACCGGCCGCUUGUG	3890
	GCGAACGCTGGGCGCTCGAGGGG	2190	GCGAACGCUGGGCGCUCGAG	3891
	CTGGACTCGCGATGGAATGACGG	2191	CUGGACUCGCGAUGGAAUGA	3892
	AGCTTGCGCTCGATGTAGCGCGG	2192	AGCUUGCGCUCGAUGUAGCG	3893
	GGACGGCGTTAGCGGCTGATGGG	2193	GGACGGCGUAGCGGCUGAU	3894
	CTATTAGCCGCGAGTTTCGAGGG	2194	CUAUUAGCCGCGAGUUUCGA	3895

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 8】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	GACGAAGCGGACGGCGTTAGCGG	2195	GACGAAGCGGACGGCGUUAG	3896
	ACCGGCATGTCAGCGACGACAGG	2196	ACCGGCAUGUCAGCGACGAC	3897
	TTTCTTTACACGTACGGCGTGGG	2197	UUUCUUUACACGUACGGCGU	3898
	TTCCATCGCGAGTCCAGTGCCGG	2198	UUCCAUCGCGAGUCCAGUGC	3899
	TGCAGCGGAACCGCTCGCCAGGG	2199	UGCAGCGGAACCGCUCGCCA	3900
	ATGTTACTAAATTCGGCGGTGG	2200	AUGUUACUAAAUCGGCGGU	3901
	GCTTTTCGCCTCTTCGAGTGGG	2201	GCUUUUCGCCUCUUCGAGUG	3902
	ATCAGAACCTACGGGCCGTGGG	2202	AUCAGAACCUACGGGCCGCU	3903
	CCGACTATATTTGGTTCGGCCGG	2203	CCGACUAUAAUUGGUUCGGC	3904
	TCTATTAGCCGCGAGTTTCGAGG	2204	UCUAUUAGCCGCGAGUUUCG	3905
	GGCCCGGGGTTCTACCAACCGG	2205	GGCCCGGGGUUCUACCACC	3906
	AGCTGTCCCGAAATCTGCACTGG	2206	AGCUGUCCCGAAAUUCGCAC	3907
	CTCGAGCGCCAGCGTTCGCGGG	2207	CUCGAGCGCCAGCGUUCGC	3908
	GGACTCGGTTGACACAGGTCTGG	2208	GGACUCGGUUCGACCAGGUC	3909
	CGGACGGCGTTAGCGGCTGATGG	2209	CGGACGGCGUUAGCGGCUGA	3910
	GATTCGAGCTTACGAAGTCAGG	2210	GAUUCGAGCUUACGAAGUC	3911
	GCGTTCCTCGGCCAGTCGCACGG	2211	GCGUUCUUCGGCCAGUCGCA	3912
	CGGCCGAACCAATATAGTCGGG	2212	CGGCCGAACCAAAUUAUAGUC	3913
	TTCTCCATTCAACGCCGCGCGGG	2213	UUCUCCAUAUACGCCGCGC	3914
	TGCGGCCGTGCGACTGGCCGAGG	2214	UGCGGCCGUGCGACUGGCCG	3915
	CTGCCGGGTGGTAGAACGCCCGG	2215	CUGCCGGUGGUAGAACC GC	3916
	ACTCCGCTTGAAAGGCCCTCAGG	2216	ACUCCGUUGAAAGGCCUC	3917
	CGGCTCTCTTCGTCCGGCGCGGG	2217	CGGCUCUCUUCGUCCGGCGC	3918
	AGAGAACGACTCCGCTTGAAGG	2218	AGAGAACGACUCCGUUGAA	3919
	TCGTGCGCGGTACACAGACCTGG	2219	UCGUCGCCGGUCACCAGACC	3920
	AACGAGCTCCGCCGAATACGGG	2220	AACGAGCUCCGCCGAUAC	3921
	TACTAAATTCGGCGGTTGGCCGG	2221	UACUAAAUCGGCGGUUGGC	3922
	CTAGGTAACCGGCCGCTTGTGGG	2222	CUAGGUAACCGGCCGCUUGU	3923
	GGGCGCTATAGGCCGAGTTTGG	2223	GGGCGCUAUAGGCCGGAGUU	3924
	TCGAGGGGAACCTTCGTTGGG	2224	UCGAGGGGAACUCCUUCGUU	3925
	AGCCGCGAGTTTCGAGGGCCAGG	2225	AGCCGCGAGUUUCGAGGGCC	3926
	CCCTCGAAGACACGCCCTCTGG	2226	CCCUCGAAGACACGCCUC	3927
	GAACGAGCTCCGCCGAATACGG	2227	GAACGAGCUCCGCCGAUA	3928
	ACCCTCGACGACCAGGAAATGGG	2228	ACCCUCGACGACCAGGAAU	3929
	GGCGCTATAGGCCGAGTTTGGG	2229	GGCGCUAUAGGCCGGAGUUU	3930
	CCGCACCACCGTGTCTGAATTGG	2230	CCGCACCACCGUGUCUGAAU	3931
	CTCGCACACGCGGAACCGGCTGG	2231	CUCGCACACGCGGAACCGGC	3932
	ATGTGCCCCCGTAGGCCGCTGG	2232	AUGUGCCCCCGCUAGGCCGC	3933
	TAGCCAGGCCCCACTATATTGG	2233	UAGCCAGGCCCCGACUAUAU	3934
	ACTGACCCCCGTATTCGGGCGG	2234	ACUGACCCCCGUUUCGGG	3935
	ATAGCGGAGTAGGTTCCCTCGG	2235	AUAGCGGAGUAGGUUCCCCU	3936
	TGGTCGAACCGAGTCCAAGATGG	2236	UGGUCGAACCGAGUCCAAGA	3937

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 9】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	GATACCCCTTCCCGGACGTCACGG	2237	GAUACCCUCCCGGACGUCA	3938
	GAGCTCCGCCCGAATACGGGGG	2238	GAGCUCCGCCCAGAACGGG	3939
	CGTTGCAAAGTGAGCCCGGAGG	2239	CGUUGCAAAGUGAGCCCGGG	3940
	ACAAGCCCAGCGGCTCCCGAGG	2240	ACAAGCCCAGCGGCUCCCGG	3941
	GCGGTTTGTCTAGTCTCCCTCGG	2241	GCGGUUUGUCUAGUCUCCU	3942
	TCCCGCACACTGACACGTGTGGG	2242	UCCCGCACACUGACACGUGU	3943
	CTGGCTGGGTCAACTTTCGGGG	2243	CUCGGCUGGGUCAACUUUCG	3944
	TGCACCCGTGATGCAAGTGCAGG	2244	UGCACCCGUGAUGCAAGUGC	3945
	CGGCACGTCATTATGCCACAGG	2245	CGGCACGUCAUUUAUGCCAC	3946
	TTTTCGCTCTTCGAGTGGGGG	2246	UUUUCGCCUCUUCGAGUGGG	3947
	ATCTTGGACTCGGTTCGACCAGG	2247	AUCUUGGACUCGGUUCGACC	3948
	GAGACGTCAATGTGACGCCATGG	2248	GAGACGUCAAUGUGACGCCA	3949
	GACCGGGATTTGTGCTATAGCGG	2249	GACCGGGAUUUGUGCUAUAG	3950
	TGCCGGGTGGTAGAACCGCGGG	2250	UGCCGGGUGGUAGAACCGCC	3951
	CGATGTAGCGCGGGTAGAAGCGG	2251	CGAUGUAGCGCGGGUAGAAG	3952
	GAACCGCCGGGCCCTTCCGAGGG	2252	GAACCGCCGGGCCUUCGCA	3953
	CGCGCCGAGATAGCGGAGTAGG	2253	CGCGCCGAGAUAGCGGAGU	3954
	AGCCGGTTCGCGTGTGCGAGGG	2254	AGCCGGUUCGCGUGUGCGA	3955
	GAACCAATATAGTCGGGCTTG	2255	GAACCAAAUAGUCGGGCC	3956
	CTTTCTCGTGGGCAGACGAAAGG	2256	CUUUCUCGUGGGCAGACGAA	3957
	GGAACTCCTTCGTTGGGGAGAGG	2257	GGAACUCCUUCGUUGGGGAG	3958
	CGTAAGCTCGGAATCAATTGTGG	2258	CGUAAGCUCGGAUCAAUUG	3959
	GCAAGAGGGGTGTGAGCGCGCGG	2259	GCAAGAGGGGUGUGAGCGCG	3960
	TATTTCCCGGTCGTGGGAAAAGG	2260	UAUUUCCCGUCGUGGGAAA	3961
	AGTGCCGGGATACCCCTTCCCGG	2261	AGUGCCGGGAUACCCUCC	3962
	TACACCCGATTTACCTCCTAAGG	2262	UACACCCGAUUUACCUCCUA	3963
	CCGCGCACCTCGGAGGTTTGG	2263	CCGCGCACCUCCGAGGUUUU	3964
	TCTCGGCTGGGTCAACTTTCGGG	2264	UCUCGGCUGGGUCAACUUUC	3965
	GGTTCGCGTGTGCGAGGGAGGG	2265	GGUUCGCGUGUGCGAGGGA	3966
	CGCGCGCGTGAATGGAGAAGG	2266	CGCGCGCGUUGAUGGAGA	3967
	CCTAGGTAACCGGCCGCTTGTGG	2267	CCUAGGUAACCGGCCGCUUG	3968
	TGCAGATGGTTCCGGGGATAAGG	2268	UGCAGAUUGGUCCGGGAUA	3969
	GCAACCGAGTCTCTGCACTGCGG	2269	GCAACCGAGUCUCUGCACUG	3970
	CGACAGGCAGACGTGCCTAGTGG	2270	CGACAGGCAGACGUGCCUAG	3971
	GAGTTTGCAGACGCACTCGGAGG	2271	GAGUUUGCAGACGCACUCGG	3972
	TTAGCGGCTGATGGGACGAGCGG	2272	UUAGCGGCUGAUGGACGAG	3973
	GAAACGCACCATTTGTGACCGGG	2273	GAAACGCACCAUUGAGCCG	3974
	TACGTACTTGAGTGTGTGCGCGG	2274	UACGUACUUGAGUGCUGUGG	3975
	GAAGAATTTCTGTGAGCGCACGG	2275	GAAGAAUUCUGUGAGCGCA	3976
	GGCGATGTACTAAATTCGGCGG	2276	GGCGAUGUUAUAAUUCGG	3977
	ACCCTTCCCGGACGTCACGGAGG	2277	ACCCUCCCGGACGUCACGG	3978
JUNB	GGGTAAAGTACTGTCCCGGGGG	2278	GGGUAAAAGUACUGUCCCGG	3979

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 0】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	TCTGCCCAGTGACGCGACGCGG	2279	UCUGCCCAGUGACGCGACCG	3980
	GGACAGTACTTTTACCCCCGCGG	2280	GGACAGUACUUUUACCCCCG	3981
	ACTTCCGTGGCTGACTAGCGCGG	2281	ACUUCGUGGCUGACUAGCG	3982
	GTCCCGTAGGATCCGAGTGACGG	2282	GUCCCGUAGGAUCCGAGUGA	3983
	TAGCGCGGTATAAAGGCGTGTTG	2283	UAGCGCGGUAAAAGGCGUG	3984
	CTGACAGCCGTTGTGACGTGGG	2284	CUGACAGCCGUUGCUGACGU	3985
	GACTAAGAGGTTACCATCGAGGG	2285	GACUAAGAGGUUACCAUCGA	3986
	GTACGAGCTCCCGTCCCGACGG	2286	GUACGAGCUCCCGUCCCGA	3987
	GCGCTTTGAGACTCCGGTAGGGG	2287	GCGCUUUGAGACUCCGGUAG	3988
	TCGCGCCAGAGAGGCGACGGGG	2288	UCGCGCCAGAGAGGCGACG	3989
	ATGCCTGCGCCGAACCGACGAGG	2289	AUGCCUGCGCCGAACCGACG	3990
	TGCGCACTCCAAGTCTCGGCCGG	2290	UGCGCACUCCAAGUCUCGGC	3991
	ATGTGTCCCCCTCGTCGGTTCGG	2291	AUGUGUCCCCCUCGUCGGUU	3992
	CGCCGCCATATTAGGGCACAGG	2292	CGCCGCCCAUAUUAGGGCAC	3993
	ACTCAAGCCCGCGGGGACATTGG	2293	ACUCAAGCCCGCGGGGACAU	3994
	GTCGCGTCACTGGGCAGAAATCGG	2294	GUCGCGUCACUGGGCAGAAU	3995
	TCCCCGCGGGCTTGAGTACCAGG	2295	UCCCCGCGGGCUUGAGUACC	3996
	TGTTCCATTGGCCCCGACGGCGGG	2296	UGUCCAUGGGCCGACGGC	3997
	ATAGTCGGGTTCCCGCTTCTGG	2297	AUAGUCGGGUUCCCGCUUC	3998
	GGTCGCGGTTCTCGGGGCTGG	2298	GGUCGCGGUUCUCGGGGGC	3999
	AACGTGTCCCTGGGCGCTACCGG	2299	AACGUGUCCUGGGCGCUAC	4000
	CTCCGCTCGGTTGACCGGACTGG	2300	CUCCGUGCGGUGACCGGAC	4001
	GGCTGACTAGCGCGGTATAAAGG	2301	GGCUGACUAGCGCGUAAUA	4002
	AGTGACGCGACCGGTTCTCTGG	2302	AGUGACGCGACCGGGUCUC	4003
	CGCCGGGTGGCCACCGGCGAAGG	2303	CGCCGGGUGGCCACCGGCGA	4004
	TGACTAAGAGGTTACCATCGAGG	2304	UGACUAAGAGGUUACCAUCG	4005
	ACAGTACTTTTACCCCCGCGGGG	2305	ACAGUACUUUUACCCCCGCG	4006
	GTGCCCTAATATGGGCGGCGGGG	2306	GUGCCCUAAUAUGGGCGGCG	4007
	CCAATCGGAGCGCACTTCCGTGG	2307	CCAAUCGGAGCGCACUCCG	4008
	GGGGCTTGTAACGTCGAGGTGG	2308	GGGGCUUGUAAACGUCGAGG	4009
	TCAAGCAATGGTTCCGCGCGCGG	2309	UCAAGCAAUGGUUCCGCCCG	4010
	GTGTTCCATTGGCCGACGGCGG	2310	GUGUCCAUGGCCCGACGG	4011
	TATCGCGCCAGAGAGGGCGACGG	2311	UAUCGCGCCAGAGAGGGCGA	4012
	TGCTTGCGCCGAACCGACGAGGG	2312	UGCCUGCGCCGAACCGACGA	4013
	ACACAGCTACGGGATACGGCCCGG	2313	ACACAGCUACGGGAUACGGC	4014
	TATGAGTCGTCTGGTAGAAGGG	2314	UAUGAGUCGUCGUGGUAGAA	4015
	CGACGACTCATACACAGCTACGG	2315	CGACGACUCAUACACAGCUA	4016
	AAAGGACCTCGGGGTACGCATGG	2316	AAAGGACCUCGGGGUACGCA	4017
	ACGCTCAAGGCCGAGAACGCGGG	2317	ACGCUCAAGGCCGAGAACGC	4018
	GCGGGGCTGTGAGTACCGCCGG	2318	GCGGGGCUUCGAGUACCGC	4019
	GACGCTCAAGGCCGAGAACGCGG	2319	GACGCUCAAGGCCGAGAACG	4020
	GAGACGCGGTCGCGTCACTGGG	2320	GAGACGCGGUCGCGUCACU	4021

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 1】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	GGCGCTTTGAGACTCCGGTAGGG	2321	GGCGCUUUGAGACUCCGGUA	4022
	CCACACGCGCCGCCCTTCGCCGG	2322	CCACACGCGCCGCCUUCGC	4023
	GTGCCCAGCCGTCCAAGCAGGG	2323	GUGCCCAGCCGUCCAAGCGA	4024
	GTTCCATTGGCCCCGACGGCGGG	2324	GUUCCAUUGGCCCCGACGGCG	4025
	GGGGTTTCTTCGCACATACTGGG	2325	GGGGUUUCUUCGCACAUACU	4026
	TGCCTGGTCGCGCTTCTCGGGG	2326	UGCCUGGUCGCGCUUCUCG	4027
	CACGACGACGCCTACACCCCGG	2327	CACGACGACGCCUACACCCC	4028
	CGTTGCTGTTGGGGACAATCAGG	2328	CGUUGCUGUUGGGGACAAUC	4029
	CGTGTCCCTGGGCGCTACCGGGG	2329	CGUGUCCUGGGCGCUACCG	4030
	TTCCATTGGCCCCGACGGCGGGG	2330	UUCCAUUGGCCCCGACGGCGG	4031
	TACTTTTACCCCGCGGGGGTGG	2331	UACUUUUACCCCGCGGGGG	4032
	ACTCGACAGCCCCGCGTTCTCGG	2332	ACUCGACAGCCCCGCGUUCU	4033
	TGGCCCCGCTAGAGGGAGTCTGG	2333	UGGCCCCGCCUAGAGGGAGUC	4034
	GTCCCCGCCGTCGGGCCAATGG	2334	GUGCCCCGCCGUCGGGCCAA	4035
	TGTGCCCTAATATGGGCGGCGGG	2335	UGUGCCCUAAUAUGGGCGGC	4036
	TTTACGGACACCCCTCGCTTGG	2336	UUUACGGACACCCCUUCGCU	4037
	TCTCGTATTCTGGGTACCTCAGG	2337	UCUCGUUAUCUGGGUACCUC	4038
	TGGTCGGGACTAGCAGTCTGGGG	2338	UGGUCGGGACUAGCAGUCUG	4039
	CGTGATCAGCCGTGCTGTTGG	2339	CGUGAUCAGCCGUUGCUGU	4040
	TCTCCCCGCCGCCATATTAGGG	2340	UCUCCCCGCCGCCAUUAUA	4041
	AGAGACCGCGGTGCGTCACTGG	2341	AGAGACCGCGGUCGCGUCAC	4042
	ACCCCTCGCTTGGACGGCTGGG	2342	ACCCCUUCGCUUGGACGGCU	4043
	ACACCGCGGGCTGGCGTCCCGG	2343	ACACCGCGGGCGUGGGGUCC	4044
	AGCGAGGGGGTGTCCGTAAAGGG	2344	AGCGAGGGGGUGUCCGUAUA	4045
	GGCAGAAATCGGTCTTGTATGGG	2345	GGCAGAAUCGGUCCUUGUAU	4046
	CTAAGAGGTTACCATCGAGGGGG	2346	CUAAGAGGUUACCAUCGAGG	4047
	TATACCGCGCTAGTCAGCCACGG	2347	UAUACCGCGCUAGUCAGCCA	4048
	GAAAGCTAGTAAGCGGCCTGGGG	2348	GAAAGCUAGUAAGCGGCCUG	4049
	TCCGTCTGACCTGACCGGGCGG	2349	UCCGUCUGACCUGACCGGGG	4050
	ACGCCCAGGTTCTCTTCCGAGG	2350	ACGCCCAGGUUCCUUCUCCG	4051
	GCCTGGTACTCAAGCCCGCGGGG	2351	GCCUGGUACUCAAGCCCGCG	4052
	GCCTGCGCCGAACCGACGAGGGG	2352	GCCUGCGCCGAACCGACGAG	4053
	CAGTACTTTTACCCCGCGGGGG	2353	CAGUACUUUUACCCCGCGG	4054
	GCCCCGGTCAGGTCAGACGGAGG	2354	GCCCCGGUCAGGUCAGACGG	4055
	ACTAAGAGGTTACCATCGAGGGG	2355	ACUAAGAGGUUACCAUCGAG	4056
	ACCCAGTCCGGTCACCGCAGCGG	2356	ACCCAGUCCGGUCACCGCAG	4057
	GACGACTCATACACAGCTACGGG	2357	GACGACUCAUACACAGCUAC	4058
	AGGCTCTCCGTAAGCGGGAAGG	2358	AGGCUCUCCCGUAAGCGGGA	4059
	TCCTTGTAACAGCGGCCACGGG	2359	UCCUUGUAAACAGCGGCCAC	4060
	GGTTCGGCGCAGGCATCTTGTGG	2360	GGUUCGGCGCAGGCAUCUUG	4061
	GGAAAGCTATCGCGCCAGAGAGG	2361	GGAAAGCUAUCGCGCCAGAG	4062
	CGCTCAAGGCCGAGAACGCGGGG	2362	CGCUCAAGGCCGAGAACGCG	4063

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 2】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	CACAGCTACGGGATACGGCCGGG	2363	CACAGCUACGGGAUACGGCC	4064
	TGCCCAGCCGTCCAAGCGAGGG	2364	UGCCCAGCCGUCCAAGCGAG	4065
	TGTGCCCAGCCGTCCAAGCGAGG	2365	UGUGCCCAGCCGUCCAAGCG	4066
	CGGCCAGACTCCCTCTAGGCGGG	2366	CGGCCAGACUCCCUUAGGC	4067
	CGCCTGGTACTCAAGCCCGCGGG	2367	CGCCUGGUACUCAAGCCCGC	4068
	GGGGAACCCGACTATCTGCCAGG	2368	GGGGAACCCGACUAUCUGCC	4069
	CTCGTATTCTGGGTACCTCAGGG	2369	CUCGUAUUCUGGGUACCUC	4070
	GACAGTACTTTTACCCCGCGGG	2370	GACAGUACUUUACCCCGCG	4071
	CGGGGGCGAAGTCCGACCCAGG	2371	CGGGGGCGAAGUCCGACCC	4072
	GGAATTCGCCCCGCGCCGACGG	2372	GGACUUCGCCCCGCGCCGA	4073
	ACTGTAAATCGGGAGGGTTAAGG	2373	ACUGUAAUUCGGGAGGGUUA	4074
	TAGCGCCAGGGACACGTTGGGG	2374	UAGCGCCAGGGACACGUUG	4075
	AGGGTGTCTCCGGCCGAGACTTGG	2375	AGGGUGUCUCCGGCCGAGACU	4076
	TGATCACGCCGTTGCTGTTGGGG	2376	UGAUCACGCCGUUGCUGUUG	4077
	GCCCGTGGCCGCTGTTTACAAGG	2377	GCCCGUGGCCGCGUUUACA	4078
REL	GTGAGCCGCAAACCCAGCGGAGG	2378	GUGAGCCGCAAACCCAGCGG	4079
	CGACGGCCGGGGTTTTCGAGAGG	2379	CGACGGCCGGGGUUUUCGAG	4080
	CGTCGGGCCTACGTACGCCGCGG	2380	CGUCGGGCCUACGUCAGCCG	4081
	CGGCCGGGGTTTTCGAGAGGTGG	2381	CGGCCGGGGUUUUCGAGAGG	4082
	CAGCGTCGCCGTCCACCGTACGG	2382	CAGCGUCGCCGUCCACCGUA	4083
	GGCGGGACGTTGCGCCCTGTAGG	2383	GGCGGGACGUUGCGCCUGU	4084
	CGGGACGTTGCGCCCTGTAGGG	2384	CGGGACGUUGCGCCUGUAG	4085
	GCGGGACGTTGCGCCCTGTAGGG	2385	GCGGGACGUUGCGCCUGUA	4086
	CGTACGGTGGACGGCGACGCTGG	2386	CGUACGGUGGACGGCGACGC	4087
	CGTCCACCGTACGGGAGCCAGGG	2387	CGUCCACCGUACGGGAGCCA	4088
	AGGGCGCAACGTCCCGCCGCTGG	2388	AGGGCGCAACGUCCCGCCGC	4089
	AGCGTCGCCGTCCACCGTACGGG	2389	AGCGUCGCCGUCCACCGUAC	4090
	CGCCGGGGCGTATGCGTGGGGG	2390	CGCCGGGGCGUAUGCGUGG	4091
	GGGTCCCGTATGCAAATACAGG	2391	GGGUCCCGUAUGCAAUAC	4092
	GCGGCCGCAGTCAGTCAGTCAGG	2392	GCGGCCGCAGUCAGUCAGUC	4093
	GCAACGTCCCGCGCTGGCGCGG	2393	GCAACGUCCCGCGCUGGCG	4094
	ACGCAGCAACCCTCACCCGAGG	2394	ACGCAGCAACCCUACCCCGG	4095
	CGCGCCCATGAACACTCACCGG	2395	CGCGCCCAUGAACACUCAC	4096
	GGGACGTTGCGCCCTGTAGGGG	2396	GGGACGUUGCGCCUGUAGG	4097
	GAATTTCCCGCGCTGACGTAGG	2397	GAAUUUCCCGCGCUGACGU	4098
	GTACGGTGGACGGCGACGCTGGG	2398	GUACGGUGGACGGCGACGU	4099
	GCCGCAAACCCAGCGGAGGGCGG	2399	GCCGCAAACCCAGCGGAGGG	4100
	TGACTGACTGCGGCCGCTCCGG	2400	UGACUGACUGCGGCCGCCUC	4101
	CAGTACCCTCGCAATTTAGATGG	2401	CAGUACCCUCGCAUUUAGA	4102
	CGTATGCGTGGGGGCCGCGGGG	2402	CGUAUGCGUGGGGGCCGCG	4103
	AACGTCCCGCGCTGGCGCGGGG	2403	AACGUCCCGCGCUGGCGCG	4104
	AGCGCCGGGGCGTATGCGTGGG	2404	AGCGCCGGGGCGUAUGCGU	4105

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 3】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	GCGTATGCGTGGGGGCCGGCGGG	2405	GCGUAUGCGUGGGGGCCGGC	4106
	CGGCGACGCTGGGTGACCCGGGG	2406	CGGCGACGCGUGGGUGACCCG	4107
	TGACGGCTAGCAGCGTGAGAAGG	2407	UGACGGCUAGCAGCGUGAGA	4108
	GTCGGGCTACGTCAGCCGCGGG	2408	GUCGGGCCUACGUCAGCCGC	4109
	GGCCCCACGCATACGCCCCCGG	2409	GGCCCCACGCAUACGCCCC	4110
	CCCCGCCGGCAGAGGTCCCTCGG	2410	CCCCGCCGGCAGAGGUCCCU	4111
	GAACCACCTCTCGAAAACCCCGG	2411	GAACCACCUCUCGAAAACCC	4112
	CCACACTCGGAAGAACAACCTGG	2412	CCACACUCGGAAGAACAACC	4113
	TTGCGCCCTGTAGGGGAAGTGG	2413	UUGCGCCUGUAGGGGGAAG	4114
	TACCTCGCAATTAGATGGAGG	2414	UACCCUCGCAAUUAGAUGG	4115
	GTCCACCGTACGGGAGCCAGGGG	2415	GUCCACCGUACGGGAGCCAG	4116
	CCTGGCTCCCGTACGGTGGACGG	2416	CCUGGCUCCCGUACGGUGGA	4117
	CAACCCTCACCCGGAGGCGTGGG	2417	CAACCCUCACCCGGAGGCGU	4118
	CGCTGCTAGCCGTCACCTCCCGG	2418	CGCUGCUAGCCGUCACCUCC	4119
	GCGCCGGGGGCGTATGCGTGGGG	2419	GCGCCGGGGGCGUAUGCGUG	4120
	CAACGTCCCGCCGCTGGCGCGGG	2420	CAACGUCCCGCCGCUGGCGC	4121
	CGTAGAGAGGGCGGCCGCTGGG	2421	CGUAGAGAGGGCGGCCGCU	4122
	CCCGGGGTGCAAGAATTACAGGGG	2422	CCCGGGGUGCAAGAAUUCAG	4123
	TGAGCCGCAAACCCAGCGAGGG	2423	UGAGCCGCAAACCCAGCGGA	4124
	GTTTAAAGTTCAGGAGCGGGCGG	2424	GUUUAAAGUUCAGGAGCGGG	4125
	GGCGGGAGGGGAATTTCCGCGG	2425	GGCGGGAGGGGAUUUCCCG	4126
	AGGGTGCGGATGACGTAGAGAGG	2426	AGGGUGCGGAUGACGUAGAG	4127
	CCGCCACGCTCCGGGTGAGGG	2427	CCGCCACGCCUCCGGGUGA	4128
TOX	TTTCCCGTGGAATGCACCGAGGG	2428	UUUCCCGUGGAAUGCACCGA	4129
	GGTGGCGAGTCATCACCAAACGG	2429	GGUGGCGAGUCAUACCAAA	4130
	AGGGACTCGAGCCGATCGAAGGG	2430	AGGGACUCGAGCCGAUCGAA	4131
	ACGTGTCTAAGCAGTCCCGTTGG	2431	ACGUGUCUAAGCAGUCCCGU	4132
	AAACGCCCCCCGGCAAACCTAGG	2432	AAACGCCCCCCGGCAAACCU	4133
	TTGAACGCGACGTGCTCGCCCGG	2433	UUGAACGCGACGUGCUCGCC	4134
	GTCGCGTGGTGGGAGTCCAGGG	2434	GUCGCGUGGGUGCGGAGUCCA	4135
	CGCGGTGTTGGCAAGCCCCCGG	2435	CGCGGUGUUUGGCAAGCCCC	4136
	GATCCTTAGCCGCGAACAGCAGG	2436	GAUCCUAGCCGCGAACAGC	4137
	TTCCGCACAATCGCGGTGTTTGG	2437	UUCCGCACAAUCGCGGUGUU	4138
	TCCGCGCGCACCCCTTAAACAGG	2438	UCCGCGCGCACCCCUUAAAC	4139
	GCGAGAGTTGGGCGTCTAAAGG	2439	GCGAGAGUUGGGCGUCUAAA	4140
	AAGCCGCGGCGCGCACCCGTCGG	2440	AAGCCGCGGCGCGCACCCGU	4141
	ATATTGTGGAGTAGCTCCGGGGG	2441	AUAUUGUGGAGUAGCUCCGG	4142
	TACACTTCGAATCACCCCTGTGG	2442	UACACUUCGAAUACCCCUUG	4143
	AGTCCCAACGATTTTCCCGTGG	2443	AGUCCCAACGAUUUUCCCG	4144
	TTTACTACCCAAGCGCACGCAGG	2444	UUUACUACCCAAGCGCACGC	4145
	CGTCCAAGTACCCCTAGGCGTGG	2445	CGUCCAACUAGCCCUAGGCG	4146
	GTCCAAGTACCCCTAGGCGTGGG	2446	GUCCAACUAGCCCUAGGCGU	4147

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 4】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	AGTGGGGCACGAATCTCGGAGGG	2447	AGUGGGGCACGAUUCUCGGA	4148
	GCCTTCGCAAACCGTCCAGTGGG	2448	GCCUUCGCAAACCGUCCAGU	4149
	TCAGCACACAATCCGGCTAAAGG	2449	UCAGCACACAUCCGGCUAA	4150
	TGAAGTTACCTGCCCCGGCGGG	2450	UGAAGUUACCUGCCCCGGCGG	4151
	TGCGACTCGGTTCGCTGGTGCGG	2451	UGCGACUCGGUCGCGUGGUG	4152
	TTAGACGCCCAACTCTCGCTTGG	2452	UUAGACGCCCAACUCUCGCU	4153
	TAGAGCCCGAGCGCGTGTGCCGG	2453	UAGAGCCCGAGCGCGUGUGC	4154
	TTCGATCGGCTCGAGTCCCTCGG	2454	UUCGAUCGGCUCGAGUCCCU	4155
	GCGCTCGGGCTCTAGGTACTGGG	2455	GCGCUCGGGCUCUAGGUACU	4156
	TCCACTACGGGCGGGAGTAGGG	2456	UCCACUACGGGCGGGAGUA	4157
	CGAGTCGCAGTCCGAGTCTTGG	2457	CGAGUCGCAGUCCGAGUCU	4158
	GGCCGGACGCGGGCTCGTCAAGG	2458	GGCCGGACGCGGGCUCGUCA	4159
	CGCGGAAATTGCAAGTTTGTGG	2459	CGCGGAAAUUGCAAGUUUGU	4160
	GCATGAAGTTACCTGCCCGGGCGG	2460	GCAUGAAGUUACCUGCCCCGG	4161
	TGTCACCTTTCGCGACAATCGCGG	2461	UGUCACUUUCCGCACAAUCG	4162
	CAGTCCCCTTGGATGAACGTTGG	2462	CAGUCCCGUUGGAUGAACGU	4163
	CCAGCGCGTCGCACACAAAGGGG	2463	CCAGCGCGUCGCACACAAAG	4164
	GGAGCTCGGACTCGGTTCGCTGG	2464	GGAGCUGCGACUCGGUCGCG	4165
	GACCAGCGCGTCGCACACAAAGG	2465	GACCAGCGCGUCGCACACAA	4166
	CAAGACTCGGAGCTGCGACTCGG	2466	CAAGACUCGGAGCUGCGACU	4167
	CTAACTGCCTAAACACCATCGG	2467	CUAACUUGCCUAAACACCAU	4168
	CCTTTGAGTGGGTCTCAGACTGG	2468	CCUUUGAGUGGGUCUCACAC	4169
	ATTCCACGGGAAAAATCGTTGGG	2469	AUUCCACGGGAAAAAUCGUU	4170
	GAATGCACCGAGGGTCGCCATGG	2470	GAAUGCACCGAGGGUCGCCA	4171
	GGGTTTCGGACACAGGTCCGCGGG	2471	GGGUUCGGACACAGGUCCGC	4172
	GAGGGACTCGAGCCGATCGAAGG	2472	GAGGGACUCGAGCCGAUCGA	4173
	TGGACGGTTTGCGAAGGTGAGG	2473	UGGACGGUUUGCGAAGGCUG	4174
	CTCGAGCCGATCGAAGGGTGAGG	2474	CUCGAGCCGAUCGAAGGGUG	4175
	ATTTATACCAAGCGAGAGTTGG	2475	AUUUAUCACCAAGCGAGAGU	4176
	GTTCGGCTGGGTCCACCTATAGG	2476	GUUCGGCUGGGUCCACCUAU	4177
	CAGCACACAATCCGGCTAAAGGG	2477	CAGCACACAUCCGGCUAAA	4178
	GGCACGACTGCCACGCCTAGGG	2478	GGCACGACUGCCACGCCUA	4179
	AGAGCCCAGCGCGTGTGCCGGG	2479	AGAGCCCAGCGCGUGUGCC	4180
	CACGAATCTCGGAGGGGTGCGGG	2480	CACGAUUCUCGGAGGGGUGC	4181
	GCCCCCGGCAAACCTAGGCAGG	2481	GCCCCCGGCAAACCUAGGC	4182
	GAGAAAACCGTGGAATACTTTGG	2482	GAGAAAACCGUGGAUACUU	4183
	CTCCGCGAGTGCGGGAGCTTTGG	2483	CUCCGCGAGUGCGGGAGCUU	4184
	CGCGGACCTGTGTCCGAACCCGG	2484	CGCGGACCUUGUCCGAACC	4185
	AGCTCCCGCACTCGCGGAGCAGG	2485	AGCUCCCGCACUCGCGGAGC	4186
	CGCGCTCGGGCTCTAGGTACTGG	2486	CGCGCUCGGGCUCUAGGUAC	4187
	ACGGGTGCGCGCCGCGGCTTGGG	2487	ACGGGUGCGCGCCGCGGCUU	4188
	AATATTGTGGAGTAGCTCCGGGG	2488	AAUAUUGUGGAGUAGCUCCG	4189

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 5】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	TTCTCCGGATTAGTTGCCAGGGG	2489	UUCUCCGGAUUAGUUGCCAG	4190
	AGACACGTCCAAC TAGCCCTAGG	2490	AGACACGUCCAACUAGCCCU	4191
	TCCCTGCCTAGGTTTGCCGGGGG	2491	UCCUGCCUAGGUUUGCCGG	4192
	TGTGCGACGCGCTGGTCCGAGG	2492	UGUGCGACGCGUGGUCCCG	4193
	AAAGGGGTCGCACTCCCTGTGGG	2493	AAAGGGGUCGCACUCCUGU	4194
	GCGACCCCTCGGTGCATTCCACGG	2494	GCGACCCUCGGUGCAUUGCA	4195
	CGCTTGGGTAGTAAATATTGTGG	2495	CGCUUGGGUAGUAAAUUUG	4196
	CGGGTTCGGACACAGGTCCGCGG	2496	CGGGUUCGGACACAGGUCCG	4197
	CATTCCACGGGAAAAATCGTTGG	2497	CAUUCCACGGGAAAAAUUGU	4198
	GTCCAAAGCTCCCGCACTCGCGG	2498	GUCCAAAGCUCCCGCACUCG	4199
	AGCGCATGAAGTTACCTGCCCGG	2499	AGCGCAUGAAGUUACCUGCC	4200
	CGCGCTGTTCCCGAGGAGCGCGG	2500	CGCGCUGGUCCCGAGGAGCG	4201
	ACAGTCAGGGGGTACGAGGAGG	2501	ACAGUCAGGGGGUACGAGGG	4202
	CCCCACTGGACGGTTTGCGAAGG	2502	CCCCACUGGACGGUUUUGCA	4203
	CCTGTGTCCGAACCCGGGCTCGG	2503	CCUGUGUCCGAACCCGGGCU	4204
	GTACCCCTGACTGTCCTATAGG	2504	GUACCCCUAGACUGUCCUAU	4205
	TCTGCCAACGTTTATCCAACGGG	2505	UCUGCCAACGUUCAUCCAAC	4206
	ACCCGAGGTCAGCGGGCCGTGGG	2506	ACCCGAGGUCAGCGGGCCGU	4207
	ACTACGGGCCGGGAGTAGGAGG	2507	ACUACGGGCCGGGAGUAGGG	4208
	GTCGCCATGGATGTGCCTGCAGG	2508	GUCGCCAUGGAUGUGCCUGC	4209
	GGCCTTGACGAGCCCGCGTCCGG	2509	GGCCUUGACGAGCCCGCGUC	4210
	TGCCACGCTAGGGCTAGTTGG	2510	UGCCACGCCUAGGGCUAGU	4211
	ACCAGCGCGTCGCACACAAAGGG	2511	ACCAGCGCGUCGCACACAAA	4212
	TGGTCCCGAGGAGCGCGCACGG	2512	UGGUCCCGAGGAGCGCGCA	4213
	TGTGCCCCGTGCCGCGCTCCTCGG	2513	UGUGCCCGUGCCGCGCUCCU	4214
	CCGGGCTCGGCTGCCGGAACCGG	2514	CCGGGCUCCGCGUCCGGAAC	4215
	CGCAGCCCGGCACACGCGCTCGG	2515	CGCAGCCCGGCACACGCGCU	4216
	TTTTCCTCGTGAATGCACCGAGG	2516	UUUUCCCGUGGAAUGCACCG	4217
	CGACCCTCGGTGCATTCCACGGG	2517	CGACCCUCGGUGCAUCCAC	4218
	CTCCACTACGGGCCGGGAGTAGG	2518	CUCCACUACGGGCCGGGAGU	4219
	GGTGATTGGAAGTGTAATAGGG	2519	GGUGAUUCGAAGUGUAAUA	4220
	TGCGCCCGACGCTCCCTGTCTGG	2520	UGCGCCCGACGCUCCUGUC	4221
	CTTAGCCCGCAACAGCAGGAAGG	2521	CUUAGCCCGCAACAGCAGGA	4222
	TCCTGTTTAAGGGGTGCGCGCGG	2522	UCCUGUUUAAAGGGUGCGCG	4223
	CCCCCGGCAAACCTAGGCAGGG	2523	CCCCCGGCAAACCUAGGCA	4224
	TAGGACAGTCAGGGGTACGAGG	2524	UAGGACAGUCAGGGGUACG	4225
	AAGTCACCTCCACTACGGGCCGG	2525	AAGUCACCUCCACUACGGGC	4226
	CCCCCTGACTGTCTATAGGTGG	2526	CCCCCUGACUGUCCUAUAGG	4227
	GCGGGCTCGTCAAGGCCCAATGG	2527	GCGGGCUCGUCAAGGCCCAA	4228
TOX2	CCACCCGTGCGACGACACAGTGG	2528	CCACCCGUGCGACGACACAG	4229
	TCATCCACACTCGCGCGTCGAGG	2529	UCAUCCACACUCGCGCGUCG	4230
	GTGACTCGTCTGTGGCGGTGAGG	2530	GUGACUCGUCUGUGGCGGUG	4231

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 6】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	CGCAGCCTACTCGGAATCCGAGG	2531	CGCAGCCUACUCGGAAUCCG	4232
	TAAACCTCGACGCGCAGTGTGG	2532	UAAACCUCGACGCGCAGUG	4233
	AAGCGCGGGTTTTCTCACTCGG	2533	AAGCGCGGGUUUUCGUCACU	4234
	CTGTCCGCGCGTCCGCCAGTCCG	2534	CUGUCCGCGCGUCCGCCAGU	4235
	GGTCTCGCGAAGAGTGGCGGTGG	2535	GGUCUCGCGAAGAGUGGCGG	4236
	TGTGAGCCGCCCGTGCCGTCGG	2536	UGUGAGCCGCCCGUGCCCGU	4237
	TGCCGCCGTGGTAATAGTCCAGG	2537	UGCCGCCGUGGUAUAGUCC	4238
	AGGGGACGCGGACTGCTTAGAGG	2538	AGGGGACGCGGACUGCUUAG	4239
	TACAGGCGGACGTCCATGGCGGG	2539	UACAGGCGGACGUCCAUGGC	4240
	TCGTCCGACGGGTGGCTGTCGGG	2540	UCGUCGACGGGUGGCGUGUC	4241
	TCGCAGTCCCGCTCGCACACTGG	2541	UCGCAGUCCCGCUCGCACAC	4242
	TAAGCAGTCCCGCTCCCTTTCGG	2542	UAAGCAGUCCCGGUCCCUU	4243
	GGCCGGAACAATAGCGCGCGCGG	2543	GGCCGGAACAAUAGCGCGCG	4244
	GCCGGAACAATAGCGCGCGCGGG	2544	GCCGGAACAAUAGCGCGCGC	4245
	CTGTGAGGGGACGCGAGTGAGG	2545	CUGUCAGGGGACGCGAGUG	4246
	TCGATTGGCCGCGAGCTACTCGG	2546	UCGAUUGGCGCGAGCCUACU	4247
	GTCGTGCGACGGGTGGCTGTCGG	2547	GUCGUCGCGCGGUGGCGUGU	4248
	CGGGACGGAAGCGCCGTCTGG	2548	CGGGACGGAAGCGCCGUC	4249
	AGCGCCGCGACACACTAATTGGG	2549	AGCGCCGCGACACUAAUU	4250
	GGAACAATAGCGCGCGCGGGCGG	2550	GGAACAUAAGCGCGCGGGG	4251
	CGCGCGAGTGTGGATGACCGAGG	2551	CGCGCGAGUGUGGAUGACCG	4252
	GTACAGGCGGACGTCCATGGCGG	2552	GUACAGGCGGACGUCCAUGG	4253
	GGACTATTACCACGGCGGCAAGG	2553	GGACUAUUACCACGGCGGCA	4254
	TCCCTCTCCGGCGACCGAAGGGG	2554	UCCCUUCCGGCGACCGAAG	4255
	GCGTCCGCCAGTGGTGCGTCGG	2555	GCGUCCGCCAGUCGUGCGU	4256
	AACAACCTAGGGCGTGAGCGTGG	2556	AACAACUCAGGGCGUGAGCG	4257
	GCCTTTCGCCACCCACGGTGAGG	2557	GCCUUUCGCCACCCACGGUG	4258
	CTCGGATTCCGAGTAGGCTGCGG	2558	CUCGGAUUCGAGUAGGCUG	4259
	GGACGTCCGCCTGTACCCCTCGG	2559	GGACGUCCGCCUGUACCCU	4260
	TCCGGCGACCGAAGGGGACGCGG	2560	UCCGGCGACCGAAGGGGACG	4261
	TTCCCTCTCCGGCGACCGAAGGG	2561	UUCCCUUCCGGCGACCGAA	4262
	GGTTTTCGTCACTCGGAGCCCGG	2562	GGUUUUCGUCACUCGGAGCC	4263
	AACCTCGCAGGCTTTTCGTCAGG	2563	AACCUCGCGAGCUUUUCGUC	4264
	CCCGGATTGAACAGCGCGCGTGG	2564	CCCGGAUUGAACAGCGCGCG	4265
	ACGCTCACGCCCTGAGTTGTTGG	2565	ACGCUACGCCCUAGAUUGU	4266
	TTCGTCAGGCCCTGGTAGTGGG	2566	UUCGUCAGGCCCUUGGUAGU	4267
	GCGCGCTATTGTTCCGGCTCGG	2567	GCGCGCUAUUGUCCGGCCU	4268
	GCCCGCGCGCGCTATTGTTCCGG	2568	GCCCGCGCGCGCUAUUGUUC	4269
	AGCGCCGCTCAAATATTTAGGG	2569	AGCGCCGCUCAAUAUUUA	4270
	AACAATAGCGCGCGGGCGGGG	2570	AACAUAAGCGCGCGGGCG	4271
	CAGCGCCGCGACACACTAATTGG	2571	CAGCGCCGCGACACUAUU	4272
	TAGCGCCGCTCAAATATTTAGG	2572	UAGCGCCGCUCAAUAUUU	4273

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 7】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	GTGGGCTCCGTGGCGATGCGGGG	2573	GUGGGCUCCGUGGCGAUGC	4274
	CCGGATTGAACAGCGCGCTGGG	2574	CCGGAUUGAACAGCGCGCU	4275
	GAGTAGGCTGCGGCCAATCGAGG	2575	GAGUAGGUCGCGGCCAUCG	4276
	GCGTGGGCTCCGTGGCGATGCGG	2576	GCGUGGGCUCCGUGGCGAUG	4277
	TATTACCACGGCGGCAAGGTAGG	2577	UAUUACCACGGCGGCAAGGU	4278
	GACCTGACGCTCGGGTTCGGGG	2578	GACCUGACGCCUCGGGUUCG	4279
	ACCACCGCCCCACATCGCGCAGG	2579	ACCACCGCCCCACAUCGCGC	4280
	GAGTGACGAAAACCGCGCTTGG	2580	GAGUGACGAAAACCGCGCU	4281
	CGGGCGCCGAGGGGTACAGGCGG	2581	CGGGCGCCGAGGGGUACAGG	4282
	GTTCCCTCTCCGGCGACCGAAGG	2582	GUUCCUCUCCGGCGACCGA	4283
	CGGAAAAGCGCCGTCTGGACAGG	2583	CGGAAAAGCGCCGUCUGGAC	4284
	TGACGAAAAGCCTGCGAGGTTGG	2584	UGACGAAAAGCCUGCGAGGU	4285
	GGGGTACAGGCGGACGTCCATGG	2585	GGGGUACAGGCGGACGUCCA	4286
	TCCCCTTCGGTCGCCGAGAGGG	2586	UCCCCUUCGGUCGCCGAGA	4287
	CGCACATCAGCCCCGCCGACGGG	2587	CGCACAUACGCCCCGCCGAC	4288
	GTGAGTGCGCGTCCAGTGGCTGG	2588	GUGAGUGCGCGUCCAGUGGC	4289
	TTTCGTCAGGCCCTTGGTAGTGG	2589	UUUCGUCAGGCCCTUGGUAG	4290
	AACCCCGAACCGAGGCGTCAGG	2590	AACCCCGAACCGAGGCGUC	4291
	CACCTGGACTATTACCACGCGG	2591	CACCUGGACUAUUACCACGG	4292
	ACGGCTTGTGAATGACTGCGAGG	2592	ACGGCUUGUGAAUGACUGCG	4293
	TGAGGTCTCGCGAAGAGTGGCGG	2593	UGAGGUCUCGCGAAGAGUGG	4294
	AAGTGAGGTCTCGCGAAGAGTGG	2594	AAGUGAGGUCUCGCGAAGAG	4295
	TGCCTGGAACCCCGAACCCGAGG	2595	UGCCUGGAACCCCGAACCCG	4296
	GCACTACCCCGCATCGCCACGG	2596	GCACUACCCCGCAUCGCCA	4297
	GCGCACCTGGACTATTACCACGG	2597	GCGCACCGGACUAUUACCA	4298
	GCTGCGAGAGTGTGACTGTCGGG	2598	GCUGCGAGAGUGUGACUGUC	4299
	GTCCCCTTCGGTCGCCGAGAGG	2599	GUCCCCUUCGGUCGCCGAG	4300
	CGGGGCCTCGGATTCGAGTAGG	2600	CGGGGCCUCGGAUUCGAGU	4301
	TACCACGGCGGCAAGGTAGGCGG	2601	UACCACGGCGGCAAGGUAGG	4302
	TCGGTGCGTCGGTCCCGGGCCGG	2602	UCGGUGCGUCGGUCCCGGGC	4303
	GGTAATAGTCCAGGTGCGCCAGG	2603	GGUAAUAGUCCAGGUGCGCC	4304
	GGGTGACTTGCGTGGGACGGCGG	2604	GGGUGACUUGCGUGGGACGG	4305
	CAGCCCTGGCGCAGACGCGTGGG	2605	CAGCCCUGGCGCAGACGCGU	4306
	TGGCGGACGCGCGGACAGTCTGG	2606	UGGCGGACGCGCGGACAGUC	4307
	GCGGACGTCCATGGCGGGCGCGG	2607	GCGGACGUCCAUGGCGGGCG	4308
	GCGCACATCAGCCCCGCCGACGG	2608	GCGCACAUACGCCCCGCCGA	4309
	TGGACAGGCGCGCCCCCTCAGG	2609	UGGACAGGCGCGCCCCCUC	4310
	GCCAGTCGGTGCGTTCGGTCCCGG	2610	GCCAGUCGGUGCGUGCGUCC	4311
	GACGAAAAGCCTGCGAGGTTGGG	2611	GACGAAAAGCCUGCGAGGUU	4312
	CGCTCACGCCCTGAGTTGTGGG	2612	CGCUCACGCCCUAGAUUGUU	4313
	TCCTCACCGTGGGTGGCGAAAGG	2613	UCCUCACCGUGGGUGGCGAA	4314
	TCAGACACAGATCGTCCTGACGG	2614	UCAGACACAGAUCCUGUGA	4315

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 8】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スプーサー配列	SEQ
	CAAAGTTAGAAGCCGATGAGGGG	2615	CAAAGUUAGAAGCCGAUGAG	4316
	CCACGGCGGCAAGGTAGCGGGG	2616	CCACGGCGGCAAGGUAGGCG	4317
	TGTCAGGGGGACGCGAGTGAGGG	2617	UGUCAGGGGGACGCGAGUGA	4318
	TCGTAGGCCCCCTGGTAGTGGGG	2618	UCGUCAGGCCCCUGGUAGUG	4319
	AGGCTACCATCCCCCTCATCGG	2619	AGGCUACCAUCCCCCUCAU	4320
	GGGCCACTGTGTGTCGTCGACGGG	2620	GGGCCACUGUGUCGUCGCAC	4321
	ACGAAAAGCCTGCGAGGTTGGGG	2621	ACGAAAAGCCUGCGAGGUUG	4322
	GGTGACTTGCGTGGGACGCGGG	2622	GGUGACUUGCGUGGGACGGC	4323
	CCAGTCGGTGCCTCGGTCCCGGG	2623	CCAGUCGGUGCGUCGGUCCC	4324
	TCCGCGTCCCCTTCGGTCCCGG	2624	UCCGCGUCCCCUUCGGUCGC	4325
	TGCGCGGCCCCGTGTGACCCCGG	2625	UGCGCGGCCCCGUGUGACCC	4326
	CACTAGGGCCTGCGCGATGTGGG	2626	CACUAGGGCCUGCGCGAUGU	4327
	TACCCCTCGGCGCCCGCGGTGGG	2627	UACCCUCUGGCGCCCGCGGU	4328
IRF4	ATGAGCTAACCGACTGTCTGGGG	2628	AUGAGCUAACCGACUGUCG	4329
	ACGCGGGGCATGAACCTGGAGGG	2629	ACGCGGGGAUGAACCUUGGA	4330
	GCCGGAGACCTTGAAGAGCGCGG	2630	GCCGGAGACCUUGAAGAGCG	4331
	GGGGTCTATTCTGGGGCGAAGGG	2631	GGGGUCCUAUUCGGGGCGAA	4332
	GCGCGGAATCCCCCGTACTGGGG	2632	GCGCGGAUCCCCCGUACUG	4333
	AACGACAAGTGGCGCAGACGCGG	2633	AACGACAAGUGGCGCAGACG	4334
	GTCGCTCCGAGCCTTGCCTGCGG	2634	GUCGCUCCGAGCCUUGCGUG	4335
	ACAGGCGCGGACGCACGAGAGG	2635	ACAGGCGCGGACGCACGAG	4336
	GCAGAGCGTGTAAACGAAGACGG	2636	GCAGAGCGUGUAACGAAGA	4337
	TGCGGTGCCTCGTGGCTGAAGGG	2637	UGCGGUGCCUCUGGCGUGAA	4338
	CGTCTGCCGCCTCCGTCCGTGGG	2638	CGUCUGCCGCCUCCGUCCGU	4339
	GCGAATCTCGCCTTTCGCCAGG	2639	GCGAAUCUGCCCUUUGCGCC	4340
	CCCGGTGATGGCCTTGCCGAGGG	2640	CCCGGUGAUGGCCUUGCCGA	4341
	CAAGACGAGCGGCGCGTGTCTGGG	2641	CAAGACGAGCGGCGCGUGUC	4342
	GCGCGCGGAATCCCCCGTACTGG	2642	GCGCGCGGAUCCCCCGUAC	4343
	CGCGCGGAATCCCCCGTACTGGG	2643	CGCGCGGAUCCCCCGUACU	4344
	TTAGTGCGCGTAGCTGGGCAGG	2644	UUAGUGCGCGUAGCUGGGC	4345
	CCCCTTAGTGCGCGTAGCTGG	2645	CCCACUUAGUGCGCGUAGC	4346
	CCACTTAGTGCGCGTAGCTGGG	2646	CCACUUAGUGCGCGUAGCU	4347
	GCGATGTTCTCTAAACACCGCGG	2647	GCGAUGUUCUUAACACCG	4348
	GAGCGTGTAAACGAAGACGGAGG	2648	GAGCGUGUAACGAAGACGG	4349
	CGGTGGGTCCCAAGATCGAGCGG	2649	CGGUGGGUCCCAAGAUAGG	4350
	AGAGCGGGCGTCTCTCGCGG	2650	AGAGCGGGCGUCCUCCUG	4351
	GCGAAGGTGCCTTCTTCCGGGGG	2651	GCGAAGGUGCCUUCUCCGG	4352
	CTAAACACCGCGGAGAGGAGGG	2652	CUAAACACCGCGGAGAGGCA	4353
	GCGAGGTCTCTCCGCGGTGGAGG	2653	GCGAGGUCCUCCGCGGUGG	4354
	ATCGACAGCGGCAAGTACCCCGG	2654	AUCGACAGCGGCAAGUACCC	4355
	CGACAAGTGGCGCAGACGCGGGG	2655	CGACAAGUGGCGCAGACGCG	4356
	AGTACCCGCAGAGAGCTAGCAGG	2656	AGUACCCGCAGAGAGCUAGC	4357

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 9】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	AATGGGGGGCGTGTAGTAGCGGG	2657	AAUGGGGGGCGUGUAGUAGC	4358
	ACGACAAGTGGCGCAGACGCGGG	2658	ACGACAAGUGGCGCAGACGC	4359
	GATGAGCTAACCGGACTGTGCGG	2659	GAUGAGCUAACCGGACUGUC	4360
	AGGGGTCTATTCTGGGGCGAAGG	2660	AGGGGUCCUAUUCGGGGCGA	4361
	CGAACCTCTGGTTCGCGCTCCGG	2661	CGAACCUUGGUUCGCGCUC	4362
	CAGTTTCACCGCTCGATCTTGGG	2662	CAGUUUCACCGCUCGAUCUU	4363
	ACCTCGCCTTCGCGGGAAACGG	2663	ACCUCGCCCUCGCGGGAAA	4364
	AAGCGCGCGCGTGCCTGTACAGG	2664	AAGCGCGCGCGUGCCGUGUC	4365
	TTGGGCTGCGGGTGCCTTACAGG	2665	UUGGGCUGCGGGUGCGUAC	4366
	GCGACCCCGTCGAGGAGCGCGG	2666	GCGACCCGUCGCGAGGAGCG	4367
	TAAGGGGCCAAGCTCACGGCGG	2667	UAAGGGGCCAAGCUCACGG	4368
	CTGATCGACCAGATCGACAGCGG	2668	CUGAUCGACCAGAUCCAGAG	4369
	CAAGCAGGACTACAACCGCGAGG	2669	CAAGCAGGACUACAACCGCG	4370
	GTTCTCTAAACACCGCGGAGAGG	2670	GUUCUCUAAACACCGCGGAG	4371
	CGGAGAGTTCGGCATGAGCGCGG	2671	CGGAGAGUUCGGCAUGAGCG	4372
	TGCGTGGAACGAGAACGCACGG	2672	UGCGUGGAACGAGAACGCA	4373
	GTAACGCACCCGCAGCCCAAAGG	2673	GUAACGCACCCGCAGCCCAA	4374
	GGACCCGAGCGCGAACCAGAGG	2674	GGACCCGAGCGCGAACCAG	4375
	TAGCGGGAATCTGTTGCGAAGGG	2675	UAGCGGGAUCUGUGCGGAA	4376
	GGGGTCGCCACAAGCTGGACGGG	2676	GGGGUCGCCACAAGCUGGAC	4377
	CTGGGGCGTTTCCCGCGAAGGG	2677	CUGGGGCCGUUCCCGCGAA	4378
	TCCGCGCGCAGAGCGTCCGCCGG	2678	UCCGCGCGCAGAGCGUCCGC	4379
	AGCTCATCCCGTCCAGCTTGTGG	2679	AGCUCAUCCCGUCCAGCUUG	4380
	TCCCGGTGATGGCCTTGCCGAGG	2680	UCCCGGUGAUGGCCUUGCCG	4381
	GCCGTTTCCCGCGAAGGGCGAGG	2681	GCCGUUCCCGCGAAGGGCG	4382
	GCGACGGGGTCGCCACAAGCTGG	2682	GCGACGGGGUCGCCACAAGC	4383
	TTTCGCACCTCGCCCTTCGCGGG	2683	UUUCGCACCUCGCCCUCGCG	4384
	ACCCTCGGCAAGGCCATCACCGG	2684	ACCUCGCGCAAGGCCAUCAC	4385
	GGTACTTGCCGCTGTCGATCTGG	2685	GGUACUUGCCGCUUGCGAUC	4386
	TGCGTCCGCGCTGTGCCGCGG	2686	UGCGUCCGCGCCUGGCCGG	4387
	CACGGACGGAGGCGGCAGACGGG	2687	CACGGACGGAGGCGGCAGAC	4388
	GGCGCGTGTGCGGAGCCTTTGGG	2688	GGCGCGUGUCGGGAGCCUUU	4389
	GCTTGTGGGACCCCGTCGAGG	2689	GCUUGUGGCGACCCCGUCGC	4390
	GCCTGCGGCCGGCGGTTCAGGG	2690	GCCUGCGGCCGGCGGUCCA	4391
	CGTGCCGTGTACGGGTCGTCCGG	2691	CGUGCCGUGUCAGGGUCGUC	4392
	ACGAAAACAGCCGCCGGCACAGG	2692	ACGAAAACAGCCGCCGGCAC	4393
	TTGCGCGTCCGGGTCTCTCTGG	2693	UUCGCGCUCCGGGUCCUCUC	4394
	AGCCGTCCGCCTTCCGAGCTCGG	2694	AGCCGUCCGCCUUCGAGCU	4395
	CGGCGCGTGTGCGGAGCCTTTGG	2695	CGGCGCGUGUCGGGAGCCUU	4396
	AGGCACCTTCGCGGCCGGCCCGG	2696	AGGCACCUUCGCGGCCGGCC	4397
	GCGGTGAACTGAGAGTGCAGAG	2697	GCGGUGAAACUGAGAGUGCG	4398
	CCTCGTGGTCACTGGCGCAGGGG	2698	CCUCGUGGUCACUGGCGCAG	4399

10

20

30

40

50

【表 2 - 4 0】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スパーサー配列	SEQ
	AGGGTACCCCGGCTTCGGAGCGG	2699	AGGGUACCCCGGUUCGGAG	4400
	TCGACAGCGGCAAGTACCCCGGG	2700	UCGACAGCGGCAAGUACCCC	4401
	CGCGAAGGTGCCTTCTCCGGGG	2701	CGCGAAGGUGCCUUCUCCG	4402
	GCTCCGAGCCTTGCCTGCGGTGG	2702	GCUCCGAGCCUUGCGUGCGG	4403
	GCCGCGCTCTTCAAGGTCTCCGG	2703	GCCGCGCUCUUCAGGUCUC	4404
	TCGCTTTGCAGAGCGTGTAAACGG	2704	UCGCUUUGCAGAGCGUGUAA	4405
	CTCGGCTCTCAGCGGGACCGCGG	2705	CUCGGCUCUCAGCGGGACCG	4406
	GTGCCGTGTCAGGGTCGTCCGGG	2706	GUGCCGUGUCAGGUCGUCC	4407
	GCAAGACGAGCGGCGCGTGTCCG	2707	GCAAGACGAGCGGCGCGUGU	4408
	AACTGACAGAGTCGCGGGGAAGG	2708	AACUGACAGAGUCGCGGGGA	4409
	CAGGCGGGTAGGAGCCTTCGCGG	2709	CAGGCGGGUAGGAGCCUUCG	4410
	GGGTACCCCGGCTTCGGAGCGGG	2710	GGGUACCCCGGUUCGGAGC	4411
	GAGGCATCAGGTGGCGTCGCCGG	2711	GAGGCAUCAGGUGGCGUCGC	4412
	CCGTCTGCCGCCTCCGTCCGTGG	2712	CCGUCUGCCGCCUCCGUCCG	4413
	GCCGTCTTGTGTGGGTGCCTTGG	2713	GCCGUCUUGUGUGGGUGCCU	4414
	GAACCTCTGGTTCGCGCTCCGGG	2714	GAACCUCUGGUUCGCGCUCC	4415
	GCGCGGTGAGCTGCGGCAACGGG	2715	GCGCGGUGAGCUGCGGCAAC	4416
	GCCTCCGGCTCAGCGCAGATGGG	2716	GCCUCCGGCUCAGCGCAGAU	4417
	GGCGTGTAGTAGCGGGAATCTGG	2717	GGCGUGUAGUAGCGGGAUUC	4418
	GGAGGACGCGCGCTCTTCAAGG	2718	GGAGGACGCGCGCUCUUCA	4419
	CGGCACGCGGGGCATGAACCTGG	2719	CGGCACGCGGGCAUGAACC	4420
	CCGCGAAGGTGCCTTCTTCGGG	2720	CCGCGAAGGUGCCUUCUCC	4421
	CGGGGTGCGCACAAAGTGGACGG	2721	CGGGGUCGCGACAAGCUGGA	4422
	TCCGGCGGACGCTCTGCGCGCGG	2722	UCCGGCGGACGUCUGCGCG	4423
	AGCGCAGGGTACCCCGGCTTCGG	2723	AGCGCAGGGUACCCCGGCUU	4424
	CCTATTCGGGGCGAAGGTCTGG	2724	CCUAUUCGGGGCGAAGGGUC	4425
	CTCTTCAAGGTCTCCGGCTCGG	2725	CUCUUAAGGUCUCCGGCCU	4426
	TCGGCTCTCAGCGGGACCGCGGG	2726	UCGGCUCUCAGCGGGACCGC	4427
	TGGAAACTGACAGAGTCGCGGGG	2727	UGGAAACUGACAGAGUCGCG	4428
TET2	TGCGCGGGACCTCGAAGTGGTGG	2728	UGCGCGGGACCUCGAAGUGG	4429
	GCACCGGGCGTCCAGCACAAAGG	2729	GCACCGGGCGUCCAGCACAA	4430
	AGGGAATTAGCCCCCGCACCGG	2730	AGGGAAUAGCCCCCGCAC	4431
	ACTTGCATGCGAGCGGGACCCGG	2731	ACUUGCAUGCGAGCGGGACC	4432
	TCACGCCGTGCAGTGGCGCGGGG	2732	UCACGCCGUGCAGUGGCGCG	4433
	CGCGGGCAACGGGATCTAAAGGG	2733	CGCGGGCAACGGGAUCUAAA	4434
	GCGCGGGCAACGGGATCTAAAGG	2734	GCGCGGGCAACGGGAUCUAA	4435
	GACGTGACTTGCATGCGAGCGGG	2735	GACGUGACUUGCAUGCGAGC	4436
	ATAGAGACGCGGGCCTCTGAGGG	2736	AUAGAGACGCGGGCCUCUGA	4437
	GTGCGGGTACACTCCGAGGAGG	2737	GUGCGGGUACACUCCGAGG	4438
	CACGCCGTGCAGTGGCGCGGGG	2738	CACGCCGUGCAGUGGCGCGG	4439
	GGCATGCCCTCGGTGAAACAGGG	2739	GGCAUGCCCUCCGUGAAACA	4440
	GGGAATTAGCCCCCGCACCGGG	2740	GGGAAUAGCCCCCGCACACC	4441

10

20

30

40

50

【表 2 - 4 1】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	GGTGCCGCCGGCCTTTGTGCTGG	2741	GGUGCCGCCGGCCUUUGUGC	4442
	AGCGCTCCCCTGTTTCACCGAGG	2742	AGCGCUCCCCUGUUUACCG	4443
	GCGCTCCCCTGTTTCACCGAGGG	2743	GCGCUCCCCUGUUUACCGA	4444
	GTGTGCGCGGGACCTCGAAGTGG	2744	GUGUGCGCGGGACCUCGAAG	4445
	GTGCGGGGGGCTAATTCCTCGGG	2745	GUGCGGGGGGCUAAUUGCCU	4446
	ACCCGCGACGTGCCTCGCTCTGG	2746	ACCCGCGACGUGCCUCGUC	4447
	CTCAGCGCGTGCAGTGGCGCGGG	2747	CUCACGCGUGCAGUGGCGC	4448
	GTGGTGCGCCCGGACCGCGCGG	2748	GUGGUGCGCCCGGACCGG	4449
	CACGTGCGGGTACACTCCGGAGG	2749	CACGUGCGGGUACACUCCGG	4450
	GCGTCCAGCACAAAGGCCGCGG	2750	GCGUCCAGCACAAAGGCCGG	4451
	TTTGTGCTGGACGCCCGGTGCGG	2751	UUUGUGCUGGACGCCCGGUG	4452
	TGTACGGCCCCAGGTGCCGCGG	2752	UGUACGGCCCCAGGUGCCGC	4453
	CCGCGCCACTGCACGGCGTGAGG	2753	CCGCGCCACUGCACGGCGUG	4454
	GGGCATGCCCTCGGTGAAACAGG	2754	GGGCAUGCCUCGGUGAAAC	4455
	TTGTGCTGGACGCCCGGTGCGGG	2755	UUGUGCUGGACGCCCGGUGC	4456
	GGGCACGTGCGGGTACACTCCGG	2756	GGGCACGUGCGGGUACACUC	4457
	GGACGTGACTTGATGCGAGCGG	2757	GGACGUGACUUGCAUGCGAG	4458
	TCACGTCCGCCCCCTCGGCGCGG	2758	UCACGUGCGCCCCUCGCGG	4459
	ACGCCGTGCAGTGGCGCGGGGG	2759	ACGCCGUGCAGUGGCGCGGG	4460
	GCACCTGGGGCCGTACAGCGGG	2760	GCACCGGGGCCGUACAGCG	4461
	CGCGCCACTGCACGGCGTGAGGG	2761	CGCGCCACUGCACGGCGUGA	4462
	GGTAAGGTGGGCGCAAGCGGAGG	2762	GGUAAGGUGGGCGCAAGCGG	4463
	CTTGATGCGAGCGGGACCCGGG	2763	CUUGCAUGCGAGCGGGACCC	4464
	GGAGACCCGCCGAGGTCCCCGGG	2764	GGAGACCCGCCGAGGUCCCC	4465
	CGCAAGCGGAGGTGTGGTGCGGG	2765	CGCAAGCGGAGGUGUGGUGC	4466
	GGTGCGGGGGGCTAATTCCTGG	2766	GGUGCGGGGGGCUAAUUGCC	4467
	TAGATGTACGTCTTTGTCCAGG	2767	UAGAUGUCACGUCUUUGUCC	4468
	AGCAGAGCAAGCGCGAAGGTTGG	2768	AGCAGAGCAAGCGCGAAGGU	4469
	GCAATGCCCTCGGTGAAACAGGG	2769	GCAUGCCUCGUGAAACAG	4470
	CTAAAGGGAGATAGAGACGCGG	2770	CUAAAGGGAGAUAGAGACGC	4471
	CCACTGCGCGCCCCGCTGTACGG	2771	CCACUGCGCGCCCCGUGUA	4472
	GACGCGGGCCTCTGAGGGTAAGG	2772	GACGCGGGCCUCUGAGGGUA	4473
	AGTGGCAGCGGCGAGAGCTTGG	2773	AGUGGCAGCGGCGAGAGCUU	4474
	GCAGAGCAAGCGCGAAGGTTGG	2774	GCAGAGCAAGCGCGAAGGUU	4475
	AAGCACTAAGGGCATGCCCTCGG	2775	AAGCACUAAGGGCAUGCCCU	4476
	TACAGGCCCCCTAAGCACTAAGG	2776	UACAGGCCCCUAAAGCACUA	4477
	CCTTATGAATATGATGCGGAGG	2777	CCUUAUGAAUUAUGAUGCGG	4478
	GGAATTAGCTCTGTATCGGTGCG	4547	GGAAUAGCUCUGUAUCGGU	4560
	AAAGTAAGGGCTTTACGAGAGG	4548	AAAGUAAGGGCUCUACGAG	4561
	GGCGTCTCACAGATTGAAATAGG	4549	GGCGUCUCACAGAUUGAAAU	4562
	CGGTCAATTTCCAGTTTGTGCG	4550	CGGUCAAUUGCCAGUUUGU	4563
	TGCAGCCCTCGGGAACCCGGGG	4551	UGCAGCCUCGGGAACCCCG	4564

10

20

30

40

【表 2 - 4 2】

標的遺伝子 (CGIあり)	例示的な標的領域 (PAMを含む)	SEQ	例示的なgRNA スペーサー配列	SEQ
	ACTCAGCGGGGCCGCGTCTCGG	4552	ACUCAGCGGGGCCGCGUCU	4565

【0299】

ある種の標的の発現を増大させることが有益であることが認識されよう。例えば、c-junは、活性化されたときに有益な遺伝子であり、例えばT細胞内の発現の増大は細胞の

50

生存率を増大させる可能性がある。

【0300】

細胞

一態様では、本発明は、本発明によるETM(例えばETR)を含む細胞、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、又は本発明によるポリヌクレオチドのキットを提供する。

【0301】

細胞は、本発明の産生物を発現するために用いることができる任意の細胞であってよい。

10

【0302】

細胞は、免疫エフェクター細胞であってよい。「免疫エフェクター細胞」は、特定の免疫応答を調節又は達成することができる形態に分化した細胞である。免疫エフェクター細胞には、アルファ/ベータT細胞、ガンマ/デルタT細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、好塩基球、好酸球、及びマクロファージが含まれ得る。好適には、細胞はアルファ/ベータT細胞であってよい。好適には、細胞はB細胞であってよい。好適には、細胞はガンマ/デルタT細胞であってよい。好適には、細胞はT細胞、例えば細胞傷害性T細胞、例えばCD8⁺ T細胞であってよい。好適には、細胞はNK細胞、例えば細胞傷害性NK細胞であってよい。好適には、細胞はマクロファージであってよい。

【0303】

一態様では、細胞は幹細胞であってよい。「幹細胞」は、同じ型のより多くの幹細胞を無限に生じることができ、それから他の特化した細胞が分化によって生じる未分化の細胞を意味する。成体の幹細胞は通常、多能性であり、誘起された又は胚から誘導された幹細胞は万能性である。

20

【0304】

別の態様では、細胞は前駆細胞であってよい。「前駆細胞」は、分化して1つ以上の細胞の型を形成することができるが、インビトロ及びインビボで自己更新が限定されている細胞を意味する。

【0305】

好適には、細胞はT細胞に分化することができる。好適には、細胞はNK細胞に分化することができる。好適には、細胞はマクロファージに分化することができる。好適には、細胞は胚性幹細胞(ESC)であってよい。好適には、細胞は造血幹細胞又は造血前駆細胞であってよい。好適には、細胞は誘導された万能性幹細胞(iPSC)であってよい。好適には、細胞は臍帯血から得てよい。好適には、細胞は成体末梢血から得ても又は骨髄から動員してもよい。

30

【0306】

「造血幹細胞及び造血前駆細胞」又は「HSPC」は、抗原マーカーCD34を発現する細胞(CD34⁺)及びそのような細胞の集団を意味する。特定の実施形態では、用語「HSPC」は、抗原マーカーCD34の存在(CD34⁺)及びリニエージ(lin)マーカーの非存在によって特定される細胞を意味する。CD34⁺及び/又はLin(-)細胞を含む細胞の集団には、造血幹細胞及び造血前駆細胞が含まれる。

40

【0307】

HSPCは、大腿骨、寛骨、肋骨、胸骨、及びその他の骨を含む成体の骨髄から得るか単離することができる。HSPCを含む骨髄吸引物は、針及びシリンジを用いて寛骨から直接得るか単離することができる。HSPCのその他の供給源には、臍帯血、胎盤血、動員された末梢血、Whartonのゼリー、胎盤、胎児血、胎児肝、又は胎児脾が含まれる。特定の実施形態では、治療用途における使用のために十分な量のHSPCを収穫するためには、対象中の幹細胞及び前駆細胞を動員する必要がある。

【0308】

本明細書で使用される場合、用語「誘起された万能性幹細胞」又は「iPSC」は、万能

50

性状態に再プログラムされた非万能性細胞を意味する。対象の細胞がいったん万能性状態に再プログラムされれば、細胞は所望の細胞型、例えば造血幹細胞又は造血前駆細胞(それぞれHSC及びHPC)にプログラムすることができる。

【0309】

本明細書で使用される場合、用語「再プログラミング(リプログラミング)」は、低分化状態への細胞の潜在力を増大させる方法进行意味し、「プログラミング」は、細胞の潜在力を低下させ又は高分化状態へ細胞を分化させる方法进行意味する。

【0310】

好適には、細胞は対象に適合しているか、対象にとって自己であってよい。細胞は患者自身の末梢血から、又はドナーの末梢血から、エキスピボで生成してよい。

10

【0311】

好適には、細胞は対象にとって自己であってよい。一部の態様では、細胞は誘起可能な前駆細胞又は胚性前駆細胞の免疫細胞へのエキスピボ分化から誘導してよい。

【0312】

これらの例では、細胞は、ウイルスベクターによる形質導入又はDNA若しくはRNAによるトランスフェクションを含む任意の手段の1つによって本発明のETM(例えばETR)をコードするDNA又はRNAを導入することによって生成される。

【0313】

一部の態様では、細胞は、

i)細胞、例えばポリヌクレオチドを含む細胞又はポリヌクレオチドを含まない細胞の生存、増殖、及び/若しくは活性を促進する薬剤、並びに/又は

20

ii)細胞、例えばポリヌクレオチドを含む細胞又はポリヌクレオチドを含まない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害な薬剤、並びに/又は

iii)細胞、例えばポリヌクレオチドを含む細胞又はポリヌクレオチドを含まない細胞の選択を可能にする薬剤

をコードするポリヌクレオチド、例えば一体化ベクターをさらに含む。

【0314】

組合せ

一態様では、本発明は、本発明によるETM(例えばETR)及びETM(例えばETR)のエンドヌクレアーゼに標的遺伝子を標的とさせる少なくとも1つのgRNAを含む組合せ(例えばシステム)を提供する。

30

【0315】

組合せは、少なくとも2つのgRNA(例えば少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又は少なくとも8つのgRNA)を含んでよい。

【0316】

組合せは、エンドヌクレアーゼに少なくとも2つの異なる標的遺伝子を標的とさせるgRNAを含んでよい。

【0317】

一部の実施形態では、1つの標的遺伝子が2つ以上のgRNAによって標的とされてよい。例えば、最適の後成的改変、例えば後成的サイレンシングのために、同一の遺伝子をいくつかのgRNAの標的とすることが有益な場合がある。

40

【0318】

組合せは、異なる長さのスペーサー配列を含む少なくとも2つのgRNAを含んでよい。好適には、少なくとも1つのgRNAは、長さ15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドのスペーサー配列を含む。好適には、少なくとも2つのgRNAの少なくとも1つは、長さ17ヌクレオチド以下(例えば16ヌクレオチド以下)のスペーサー配列を含む。好適には、少なくとも2つのgRNAの少なくとも1つは、長さ17ヌクレオチド以下(例えば16ヌクレオチド以下)のスペーサー配列を含み、少なくとも2つのgRNAの少なくとも1つは、長さ17ヌクレオチドを超えるスペーサー配列を含む。

【0319】

50

理論に縛られることは望まないが、異なる長さのスペーサー配列を含むgRNAは、ETM(例えばETR)に異なる標的遺伝子を標的とさせてよく、第1の標的遺伝子は遺伝子編集によって改変され、少なくとも第2の標的遺伝子は後成的編集によって改変される。

【0320】

一態様では、組合せは、本発明による少なくとも1つのgRNAを含む。好適には、組合せは、少なくとも2つの本発明によるgRNAを含んでよい。

【0321】

好適には、組合せは、それぞれC8及びF4の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはH8、H10、H11、又はH12の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

10

【0322】

好適には、組合せは、それぞれC8及びH8の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはF4、H10、H11、又はH12の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

【0323】

好適には、組合せは、それぞれC8及びH10の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはF4、H8、H11、又はH12の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

【0324】

好適には、組合せは、それぞれC8及びH11の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはF4、H8、H10、又はH12の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

20

【0325】

好適には、組合せは、それぞれC8及びH12の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはF4、H8、H10、又はH11の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

【0326】

好適には、組合せは、それぞれF4及びH8の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはC8、H10、H11、又はH12の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

30

【0327】

好適には、組合せは、それぞれF4及びH10の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはC8、H8、H11、又はH12の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

【0328】

好適には、組合せは、それぞれF4及びH11の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはC8、H8、H10、又はH12の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

【0329】

好適には、組合せは、それぞれF4及びH12の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはC8、H8、H10、又はH11の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

40

【0330】

好適には、組合せは、それぞれH8及びH10の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはC8、F4、H11、又はH12の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

【0331】

好適には、組合せは、それぞれH10及びH11の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはC8、F4、H8、又はH12の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

50

【0332】

好適には、組合せは、それぞれH10及びH12の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはC8、F4、H8、又はH11の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

【0333】

好適には、組合せは、それぞれH11及びH12の配列を有する第1のgRNA及び第2のgRNAを含んでよく、場合により、組合せはC8、F4、H8、又はH10の配列を有する第3のgRNAをさらに含む。

【0334】

組合せは、例えばH8+F4、H8+H10、C8+H10、F4+H10、F4+H8+H10、又はC8+F4+H10を含むか、それらからなるgRNAを有してよい。特定の場合には、gRNAは、F4+H8+H10を含むか、それからなつてよい。

【0335】

一態様では、組合せは、

i)細胞、例えば組合せを含む細胞又は組合せを含まない細胞の生存、増殖、及び/若しくは活性を促進する薬剤、並びに/又は

ii)細胞、例えば組合せを含む細胞又は組合せを含まない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害な薬剤、並びに/又は

iii)細胞、例えば組合せを含む細胞又は組合せを含まない細胞の選択を可能にする薬剤をさらに含む。

【0336】

組合せは、組織の微小環境を改変する薬剤をさらに含んでよい。

【0337】

薬剤は、本発明による細胞の生存、増殖、及び/又は活性を促進するタンパク質、例えばサイトカイン又はケモカインであつてよい。

【0338】

本明細書で使用される場合、「細胞の生存、増殖、及び/又は活性を促進する薬剤」は、その薬剤の存在下で、本発明による産生物を含む細胞の生存、増殖、及び/又は活性が増大されることを意味する。

【0339】

薬剤は、例えばある種の細胞に有益で他の細胞に有害であつてよい。

【0340】

薬剤は、ホメオスタシスにおける役割、例えば血液凝固を果たしてよい。好適な薬剤の例には、凝固第IX因子又はFVIIIがあつてよい。

【0341】

薬剤は、例えば細胞の選択を可能にし得る。好適な薬剤の例には、デルタ低親和性神経成長因子(LNGFR)がある。

【0342】

薬剤は、例えば細胞に有害であつてよい。薬剤は、チミジンキナーゼ(TK)又はカスパーゼ、例えばCASP9であつてよい。これらの薬剤の活性化は、例えば操作されたT細胞を対象から除去することが望ましい場合には、この薬剤を含む細胞をインビボで除去するために用いることができる。

【0343】

好適には、薬剤の存在下で、本発明による産生物を含む細胞(例えば本発明による細胞)の生存、増殖、及び/又は活性は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%、増加し得る。

【0344】

組合せは、細胞、例えば腫瘍細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/又は走化性に

対して有害である薬剤を含んでよい。

【0345】

本明細書で使用される場合、「～に対して有害な薬剤」は、その薬剤の存在下で、本発明による産生物を含まない細胞(例えば腫瘍細胞)の生存、増殖、又は活性が損なわれ、低減され、又は完全に無効化されることを意味する。

【0346】

好適には、有害な薬剤の存在下で、本発明による産生物を含まない細胞(例えば腫瘍細胞)の生存、増殖、又は活性は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%、低減され得る。

10

【0347】

細胞の生存及び増殖は、当技術で既知の方法によって測定してよい。好適な方法には、細胞集団の大きさの測定(例えば細胞集団に特異的なマーカー、即ち腫瘍特異的なマーカー又は操作された細胞に特異的なマーカー、例えばCAR又はトランスジェニックTCRを用いる細胞の計数による)、新たに作製されたDNAに組み込まれる5-ブロモ-2'-デオキシウリジン(BrdU)及び/若しくはヨウ化プロピジウム(PI)を用い、細胞集団特異的なマーカーと組み合わせたフローサイトメトリーによって解析することによる細胞サイクル解析の実施、並びに/又は例えばフローサイトメトリーを用いる7AAD及び/若しくはアネキシンV染色によってアポトーシスを測定することによる生存細胞数の測定が含まれる。

20

【0348】

一態様では、組合せはCARをさらに含む。一態様では、組合せはトランスジェニックCARをさらに含む。

【0349】

例えばETM(例えばETR)を発現する細胞(又は細胞の集団)等の細胞(又は細胞の集団)の生存、増殖、及び/若しくは活性を促進するか、又は細胞の選択を可能にする薬剤、並びに/或いはETM(例えばETR)を発現しない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害な薬剤は、任意の方法によって細胞のゲノムに導入してよい。方法には、例えば一体化ベクターを用いること(本発明によるETM(例えばETR)によって実施される多重化戦略とは独立の手順)、又はヌクレアーゼによって認識される部位の中の薬剤(例えばCAR又はトランスジェニックTCR)を標的とすること(本発明によるETM(例えばETR)のヌクレアーゼ活性による手順)が含まれ得る。

30

【0350】

即ち一部の態様では、組合せは、細胞(又は細胞の集団)、例えばポリヌクレオチドを含む細胞(又は細胞の集団)の選択を可能にするか又はその生存、増殖、及び/若しくは活性を促進する薬剤、並びに/又はポリヌクレオチドを含まない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害な薬剤、並びに/又は細胞、組織、若しくは臓器、例えば組合せを含まない細胞、組織、若しくは臓器の生存、増殖、及び/若しくは活性に有益な薬剤をコードするポリヌクレオチド、例えば一体化ベクターをさらに含む。

【0351】

ポリヌクレオチド

一態様では、本発明は、本発明による少なくとも1つのETM(例えばETR)をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0352】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA又はRNAを含んでよい。これらは一本鎖でもよく、二本鎖でもよい。遺伝子コードの縮重の結果として、数多くの異なるポリヌクレオチドが同一のポリペプチドをコードできることが、当業者には理解されよう。さらに、当業者であれば、日常の手法を用いて、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの配列に影響を及ぼすことなく、本発明のポリペプチドが発現される任意の特定の宿主生命体のコドン利用を反映するヌクレオチド置換を行なうことができることを理解さ

40

50

れたい。

【0353】

ポリヌクレオチドは、当技術で利用可能な任意の方法によって改変してよい。そのような改変は、本発明のポリヌクレオチドのインビボ活性又は寿命を増強するために行なうよい。

【0354】

ポリヌクレオチド、例えばDNAポリヌクレオチドは、組換え、合成、又は当業者に利用可能な任意の手段によって産生してよい。これらは標準的な手法によってクローニングしてもよい。

【0355】

長いポリヌクレオチドは一般に、組換え手段を用いて、例えばPCRクローニング手法を用いて、産生される。これには、クローニングしたい標的配列に隣接するプライマーのペア(例えば約15〜30ヌクレオチドの)を作製すること、動物又はヒトの細胞から得たmRNA又はcDNAとプライマーを接触させること、所望の領域の増幅をもたらす条件下でポリメラーゼ連鎖反応を実施すること、増幅された断片を(例えば反応混合物をアガロースゲルで精製することによって)単離すること、及び増幅されたDNAを回収することが含まれる。プライマーは、好適な制限酵素認識部位を含み、それにより、増幅されたDNAが好適なベクターの中にクローニングされ得るように設計してよい。

【0356】

構築物

一態様では、本発明は、本発明による少なくとも1つのETM(例えばETR)をコードする核酸配列を含む核酸構築物を提供する。

【0357】

核酸構築物は、

- i)細胞、例えば前記核酸構築物を発現する細胞又は前記核酸構築物を発現しない細胞の生存、増殖、及び/若しくは活性を促進する薬剤、並びに/又は
- ii)細胞、例えば前記核酸構築物を発現する細胞又は前記核酸構築物を発現しない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害な薬剤、並びに/又は
- iii)細胞、例えば核酸構築物を含む細胞又は構築物を含まない細胞の選択を可能にする薬剤

をコードする核酸配列をさらに含んでよい。

【0358】

タンパク質

本明細書で使用される場合、用語「タンパク質」は、一本鎖のポリペプチド分子、並びに個別の成分ポリペプチドが共有又は非共有の手段で連結された多重ポリペプチド複合体を含む。本明細書で使用される場合、用語「ポリペプチド」及び「ペプチド」は、モノマーがアミノ酸で、ペプチド結合又はジスルフィド結合によって連結されているポリマーを意味する。

【0359】

バリエーション、誘導体、アナログ、ホモログ、及び断片

本明細書で述べた特定のタンパク質及びヌクレオチドに加えて、本発明は、そのバリエーション、誘導体、アナログ、ホモログ、及び断片の使用も包含する。

【0360】

本発明の文脈において、任意の所与の配列のバリエーションは、問題のポリペプチド又はポリヌクレオチドがその内因性機能の少なくとも1つを実質的に保持している様式で、残基(アミノ酸残基であっても核酸残基であっても)の特定の配列が改変された配列である。バリエーション配列は、天然に存在するタンパク質に存在する少なくとも1つの残基の付加、欠失、置換、改変、置換え、及び/又は変形によって得ることができる。

【0361】

本発明のタンパク質又はポリペプチドに関して本明細書で使用される用語「誘導体」は

10

20

30

40

50

、得られるタンパク質又はポリペプチドがその内因性機能の少なくとも1つを実質的に保持しているという前提での、その配列からの、又はその配列への、1つ(又はそれ以上)のアミノ酸残基の任意の置換、変形、改変、置換え、欠失、及び/又は付加を含む。

【0362】

ポリペプチド又はポリヌクレオチドに関して本明細書で使用される用語「アナログ」は、任意の模倣体、即ちそれが模倣するポリペプチド又はポリヌクレオチドの内因性機能の少なくとも1つを保有している化学化合物を含む。

【0363】

典型的には、アミノ酸置換は、改変された配列が必要な活性又は能力を実質的に保持しているという前提で、例えば1、2、又は3から10又は20置換まで行なってよい。アミノ酸置換には、天然に存在しないアナログの使用が含まれ得る。

【0364】

本発明で使用されるタンパク質は、サイレントな変化を生じ、機能的に等価のタンパク質をもたらすアミノ酸残基の欠失、挿入、又は置換を有してもよい。意図的なアミノ酸の置換は、内因性機能が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、及び/又は両親媒性の性質における類似性に基づいて行なってよい。例えば、陰性荷電のアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれ、陽性荷電のアミノ酸にはリシン及びアルギニンが含まれ、類似の親水性価を有する非荷電極性ヘッドグループを有するアミノ酸にはアスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、及びチロシンが含まれる。

【0365】

保存的置換は、例えば以下の表に従って行なってよい。2番目のカラムの同じブロック、特定の例では3番目のカラムの同じ線の中のアミノ酸は、互いに置換してよい。

【0366】

【表3A】

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性-非荷電	CSTM
		NQ
	極性-荷電	DE
		KRH
芳香族		FWY

【0367】

本明細書で使用される用語「ホモログ」は、野生型のアミノ酸配列又は野生型のヌクレオチド配列とある種の相同性を有する実体を意味する。用語「相同性」は、「同一性」と同等であってよい。

【0368】

相同配列は、対象配列と少なくとも50%、55%、65%、75%、85%、又は90%同一、例えば少なくとも95%又は97%又は99%同一であってよいアミノ酸配列を含み得る。典型的には、ホモログは、対象アミノ酸配列と同一の活性部位等を含むことになる。相同性は類似性(即ち類似の化学的特性/機能を有するアミノ酸残基)に関連して考慮することもできるが、本発明の文脈では、配列同一性に関連して相同性を表す方が好ましい。

【0369】

相同配列は、対象配列と少なくとも50%、55%、65%、75%、85%、又は90%同一、例えば少なくとも95%又は97%又は99%同一であるヌクレオチド配列を含み得る。相同性は類似性に関連して考慮することもできるが、本発明の文脈では、配列同一性に関連して相同性を表す方が好ましい。

【0370】

本明細書で詳細を述べた配列番号のいずれか1つとの同一性パーセントを有する配列へ

の言及は、例えば言及した配列番号の全長にわたる規定された同一性パーセントを有する配列を意味し得る。

【0371】

相同性の比較は目視によって、又はより通常には容易に利用可能な配列比較プログラムの助けを借りて、行なうことができる。これらの市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列の間の相同性パーセント又は同一性を計算することができる。

【0372】

相同性パーセントは、連続した配列にわたって計算してよい。即ち、1つの配列を他の配列と整列させ、1つの配列の中のそれぞれのアミノ酸を一度に1残基ずつ、他の配列の中の対応するアミノ酸と直接比較する。これは「ギャップなし」アラインメントと称される。典型的には、そのようなギャップなしアラインメントは、比較的短い数の残基にわたってのみ実施される。

【0373】

これは極めて単純で一貫性のある方法であるが、例えば他では同一の配列のペアにおいて、ヌクレオチド配列における1つの挿入又は欠失がそれ以降のコドンのアラインメントから排除し、それにより、全体のアラインメントを実施した場合に相同性パーセントの大きな低減をもたらす可能性があることを考慮に入れることができない。その結果、大部分の配列比較法は、全体の相同性スコアを過度に不利にすることなく、可能な挿入及び欠失を考慮に入れる最適のアラインメントを生じるように設計されている。これは、局所の相同性を最大化することを試みるように配列アラインメントに「ギャップ」を挿入することによって達成される。

【0374】

しかし、これらのより複雑な方法は、アラインメント中に生じるそれぞれのギャップに「ギャップペナルティ」を割り当て、したがって、同じ数の同一のアミノ酸について、比較する2つの配列の間の高い関連性を反映するできるだけ少ないギャップを有する配列アラインメントは、多くのギャップを有するアラインメントよりも高いスコアを達成することになる。典型的には、ギャップの存在に比較的高いコストを課し、ギャップ中の引き続くそれぞれの残基については小さなペナルティを課す「アフィンギャップコスト」が用いられる。これは、最も一般的に用いられているギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティはもちろんギャップが少ない最適化されたアラインメントを生じることになる。大部分のアラインメントプログラムでは、ギャップペナルティを改変することが可能である。しかし、配列の比較にそのようなソフトウェアを用いる場合には、デフォルト値を用いる方が好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージを用いる場合には、アミノ酸配列に対するデフォルトギャップペナルティは1ギャップあたり-12であり、それぞれの延長ごとに-4である。

【0375】

したがって、最大相同性パーセントの計算には、ギャップペナルティを考慮に入れた最適アラインメントの産生が最初に必要である。そのようなアラインメントを行なうための好適なコンピュータプログラムが、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ(University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 387)である。配列比較を実施することができる他のソフトウェアの例には、それだけに限らないが、BLASTパッケージ(Ausubel et al. (1999) 上記-Ch. 18を参照)、FASTA(Atschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 403-410)、及びGENEWORKS比較ツールの組が含まれる。BLASTとFASTAの両方はオフライン及びオンラインの検索で利用可能である(Ausubel et al. (1999) 上記、7-58~7-60を参照)。しかし、一部の応用では、GCG Bestfitプログラムを用いる方が好ましい。BLAST 2 Sequencesと称される別のツールも、タンパク質及びヌクレオチドの配列を比較するために入手可能である(FEMS Microbiol. Lett. (1999) 174: 247-50; FEMS Microbiol. Lett. (1999) 177: 187-8を参照)。

【0376】

最終の相同性パーセントは同一性に関連して測定できるが、アラインメントプロセスそれ自体は、典型的にはオールオアナッシングのペアの比較に基づいていない。その代わりに、化学的類似性又は進化論的な距離に基づいてそれぞれのペアワイズ比較にスコアを割り当てる尺度付き類似性スコアマトリックスが一般に用いられている。一般に用いられるそのようなマトリックスの例としては、BLOSUM62マトリックス、即ちBLASTプログラムの組のためのデフォルトマトリックスがある。GCG Wisconsinプログラムは一般に、公衆デフォルト値又は供給される場合には特製のシンボル比較表のいずれかを用いている(さらなる詳細についてはユーザーマニュアルを参照)。一部の応用のため、GCGパッケージ用の公衆デフォルト値、又は他のソフトウェアの場合にはBLOSUM62等のデフォルトマトリックスを用いる方が好ましい。

10

【0377】

ソフトウェアがいったん最適のアラインメントを生成すれば、相同性パーセンテージ、例えば配列同一性パーセンテージを計算することが可能である。ソフトウェアは、典型的には配列比較の一部としてこれを行ない、数値結果を生成する。

【0378】

「断片」はバリエーションでもあり、この用語は典型的には機能的に又は例えばアッセイにおいて、目的であるポリペプチド又はポリヌクレオチドの選択された領域を意味する。即ち「断片」は、完全長のポリペプチド又はポリヌクレオチドの一部であるアミノ酸又は核酸の配列を意味する。

20

【0379】

そのようなバリエーションは、標準的な組換えDNA手法、例えば部位指向性変異誘発を用いて調製してよい。挿入を行なう場合には、挿入をコードする合成DNAが、挿入部位のいずれかの側の天然に存在する配列に対応する5'及び3'隣接領域とともに作製され得る。隣接領域は、天然に存在する配列中の部位に対応する便利な制限部位を含むことになり、それにより、その配列が適切な酵素によって切断され、合成DNAが切断部位にライゲートされる。次いで本発明によってDNAが発現され、コードされたタンパク質が作製される。これらの方法はDNA配列を操作するための当技術で既知の数多くの標準的な手法を説明しているのみであり、他の既知の手法も使用してよい。

【0380】

コドン最適化

30

本発明で用いるポリヌクレオチドはコドン最適化してよい。コドン最適化は既にWO1999/41397及びWO2001/79518に記載されている。異なる細胞はその特定のコードンの使用において異なっている。このコードンの偏りは、細胞型における特定のtRNAの相対的存在量の偏りに対応している。配列中のコードンを変更し、対応するtRNAの相対的存在量に適合するようにコードンを調整することによって、発現を増大させることが可能である。同様に、対応するtRNAが特定の細胞型において稀であることが知られているコードンを意図的に選択することによって、発現を減少させることが可能である。即ち、さらなる程度の翻訳制御が利用可能である。

【0381】

ベクター

40

一態様では、本発明は、本発明によるポリヌクレオチド又は本発明による核酸構築物を含むベクターを提供する。

【0382】

ベクターは、1つの環境から別の環境への実体の移送を可能にし、又は容易にするツールである。本発明によれば、また例として、組換え核酸手法において用いられるいくつかのベクターは、実体、例えば核酸のセグメント(例えば異種DNAセグメント、例えば異種cDNAセグメント)を標的細胞内に移送することを可能にする。ベクターは、異種核酸(DNA又はRNA)を細胞内に維持し、核酸のセグメントを含むベクターの複製を容易にし、又は核酸のセグメントによってコードされるタンパク質の発現を容易にするという目的を果たし得る。ベクターは非ウイルス性又はウイルス性であってよい。組換え核酸手法にお

50

いて用いられるベクターの例には、それだけに限らないが、プラスミド、mRNA分子(例えばインビトロ転写されたmRNA)、クロモソーム、人工クロモソーム、及びウイルスが含まれる。ベクターは、例えば裸の核酸(例えばDNA)であってもよい。その最も単純な形態では、ベクターはそれ自体、目的のヌクレオチドであってもよい。

【0383】

本発明で用いられるベクターは、例えばプラスミド、mRNA、又はウイルスベクターであってもよく、ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーター及び場合によりプロモーターのレギュレーターを含んでよい。

【0384】

本発明において用いられるポリヌクレオチドを含むベクターは、当技術で既知の種々の手法、例えばトランスフェクション、形質転換、及び形質導入を用いて細胞内に導入してよい。いくつかのそのような手法、例えば組換えウイルスベクター類、例えばレトロウイルス、レンチウイルス(例えば一体化欠陥レンチウイルス)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、バキュロウイルス、及び単純疱疹ウイルスのベクター類による感染、核酸の直接注射、並びにバイオリスティック形質転換は当技術で既知である。

【0385】

非ウイルス系送達システムには、それだけに限らないが、DNA又はRNAトランスフェクション法が含まれる。ここで、トランスフェクションは、遺伝子を標的細胞に送達するために非ウイルスベクターを用いるプロセスを含む。典型的なトランスフェクション法には、電気穿孔、DNAバイオリスティックス、脂質媒介トランスフェクション、圧縮DNA媒介トランスフェクション、リポソーム、イムノリポソーム、リポフェクション、カチオン剤媒介トランスフェクション、カチオン性表面両親媒性物質(CFA)(Nat. Biotechnol. (1996) 14: 556)、及びそれらの組合せが含まれる。

【0386】

用語「トランスフェクション」は、ウイルス性及び非ウイルス性の送達の両方による細胞へのポリヌクレオチドの送達を包含すると理解されたい。

【0387】

タンパク質の形質導入

細胞へのポリヌクレオチドの送達の代替として、本発明の産生物及びETM(例えばETR)は、タンパク質の形質導入によって細胞に送達してよい。

【0388】

タンパク質の形質導入はベクター送達を介してよい(Cai, Y. et al. (2014) Elife 3: e01911; Maetzig, T. et al. (2012) Curr. Gene Ther. 12: 389-409)。ベクター送達には、細胞に送達されるタンパク質を含むようにウイルス粒子(例えばレンチウイルス粒子)を操作することが含まれる。したがって、操作されたウイルス粒子がその天然のライフサイクルの一部として細胞に進入すれば、粒子中に含まれるタンパク質が細胞内に持ち込まれる。

【0389】

タンパク質の形質導入はタンパク質の送達を介してよい(Gaj, T. et al. (2012) Nat. Methods 9: 805-7)。タンパク質の送達は、例えばビヒクル(例えばリポソーム)を利用することによって、又はタンパク質それ自体を直接細胞に投与することによってさえ、達成してよい。

【0390】

組成物

本発明の産生物、例えばETM(例えばETR)、gRNA、組合せ、ポリヌクレオチド、核酸構築物、ベクター、細胞、及び本発明のポリヌクレオチドのキットは、組成物中で提供してよい。

【0391】

本発明の産生物、例えば組合せ、ETM(例えばETR)、gRNA、ポリヌクレオチド、核酸構築物、ベクター、組成物、及び本発明の細胞は、薬学的に許容される担体、希釈剤、

10

20

30

40

50

又は賦形剤とともに対象に投与するために製剤化してよい。好適な担体及び希釈剤には等張食塩溶液、例えばリン酸塩緩衝食塩水が含まれ、おそらくヒト血清アルブミンが含まれる。

【0392】

細胞療法産生物の取り扱い、Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy and the Joint Accreditation Committee-International Society Cell & Gene Therapy (ISCT)及びEuropean Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) (FACT-JACIE)の細胞療法のための国際標準に従って実施してよい。

【0393】

一態様では、ETM又はETRをコードする化学改変されたmRNAと化学改変されたgRNAの組合せが提供される。

【0394】

別の態様では、化学改変されたgRNAに結合したETRタンパク質を含むタンパク質-RNAのリボ核酸複合体が提供される。

【0395】

キット

一態様では、本発明は、

a)本発明による少なくとも1つのETM(例えばETR)をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド、及び

b)本明細書に記載した少なくとも1つのgRNAを提供するポリヌクレオチドを含み、場合により

c)i)細胞、例えばポリヌクレオチドを含む細胞又はポリヌクレオチドを含まない細胞の生存、増殖、及び/若しくは活性を促進する薬剤、並びに/又は

ii)細胞、例えば前記ポリヌクレオチドを含む細胞又は前記ポリヌクレオチドを含まない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害な薬剤、並びに/又は

iii)細胞、例えばポリヌクレオチドを含む細胞又はポリヌクレオチドを含まない細胞の選択を可能にする薬剤

をコードする核酸配列をさらに含む、ポリヌクレオチドのキットを提供する。

【0396】

キットは、使用説明書、例えば少なくとも1つのETM(例えばETR)及び少なくとも2つのgRNAのそれを必要とする対象への同時、逐次、又は個別の投与のための説明書を含んでもよい。

【0397】

使用

一態様では、本発明は、少なくとも1つの標的遺伝子の活性及び/又は発現を改変するための、本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、又は本発明によりポリヌクレオチドのキットの使用を提供し、例えば使用はインビトロ又はエクスピボの使用である。

【0398】

好適には、使用は、少なくとも1つの標的遺伝子における転写及び/又は発現を抑制(例えばサイレンシング)し得る。好適には、使用は、少なくとも2つの標的遺伝子における転写及び/又は発現を抑制(例えばサイレンシング)し得る。例えば、第1の遺伝子の転写及び/又は発現は遺伝子編集によって抑制(例えばサイレンシング)され、第2の標的遺伝子の転写及び/又は発現は後成的編集によって抑制(例えばサイレンシング)され得る。

【0399】

好適には、使用は少なくとも1つの標的遺伝子を増強し得る。

【0400】

別の態様では、本発明は、本発明によるETM(例えばETR)、本発明による少なくとも1つのgRNA、本発明による組合せ、本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明によるベクター、又は本発明によりポリヌクレオチドのキットを細胞に投与するステップを含む、細胞内の少なくとも1つの標的遺伝子の転写及び/又は発現を抑制(例えばサイレンシング)する方法を提供する。

【0401】

好適には、少なくとも2つの標的遺伝子の転写及び/又は発現が抑制(例えばサイレンシング)され、少なくとも2つの標的遺伝子の少なくとも1つは後成的に抑制(例えばサイレンシング)され、少なくとも2つの標的遺伝子の少なくとも1つは遺伝子編集によって抑制(例えばサイレンシング)され、少なくとも1つのETM(例えばETR)及び少なくとも2つのgRNAは同時、逐次、又は個別に前記細胞に投与される。

10

【0402】

別の態様では、本発明は、治療における使用のための、本発明の産生物、ETM(例えばETR)、gRNA、組合せ、ポリヌクレオチド、核酸構築物、ベクター、ポリヌクレオチドのキット、細胞、及び医薬組成物を提供する。

【0403】

治療における使用は、例えば「普遍的に」同種移植可能な細胞(例えば $\beta 2$ -ミクログロブリン、B2Mのサイレンシングによる)の調製のための使用であってよい。この使用は、例えば造血幹細胞及び/又は造血前駆細胞(HSPC)の調製、全臓器移植、及びがんの免疫療法に適用してよい。

20

【0404】

ETM(例えばETR)(又はこれをコードするポリヌクレオチド、核酸構築物、又はベクター)とgRNAは、同時に、組み合わせて、逐次に、又は個別に(投薬レジメンの一部として)投与してよい。

【0405】

「同時に」は、2つ以上の薬剤が同じ時に投与され、用語「組み合わせて」は、同時でなければそれらが同じ時間枠の中で治療的に作用するために利用可能である時間枠の中で「逐次に」投与されることを意味するために使用されることを理解されたい。即ち、「逐次」投与は、最初に投与された薬剤の循環半減期が、2つ以上の薬剤が治療有効量で同時に存在するものであるという前提で、1つの薬剤が他方の薬剤の後、5分以内、10分以内、又は数時間の問題で投与されることを可能にし得る。成分の投与の間の時間遅れは、成分の正確な性質、それらの間の相互作用、及びそれらのそれぞれの半減期に応じて変動することになる。

30

【0406】

「組み合わせて」又は「逐次に」とは対照的に、「個別に」は、1つの薬剤と他の薬剤の投与の間のギャップが顕著であることを意味すると理解されたい。即ち、最初に投与された薬剤は、第2の薬剤が投与されるときには血流中に治療有効量でもはや存在しない可能性がある。

【0407】

別の態様では、本発明は、本発明の産生物のいずれか(例えば本発明によるETM(例えばETR)、gRNA、組合せ、ポリヌクレオチド、核酸構築物、ベクター、ポリヌクレオチドのキット、細胞、又は医薬組成物)を、それを必要とする対象に投与するステップを含む、疾患又は状態を処置及び/又は防止する方法を提供する。

40

【0408】

好適には、ETM(例えばETR)及びgRNAは、同時、逐次、又は個別に対象に投与してよい。

【0409】

一態様では、本発明は、

(i)細胞を含む試料の単離、

(ii)本発明によるポリヌクレオチド、本発明による核酸構築物、本発明による少なくとも

50

1つのgRNA、本発明によるETM(例えばETR)、本発明によるベクター、又は本発明によるポリヌクレオチドのキットの細胞への導入、及び

(iii)ステップ(ii)の細胞の対象への投与

のステップを含む、遺伝子療法の方法を提供する。

【0410】

核酸構築物又はベクターは、形質導入又はトランスフェクションによって導入してよい。

【0411】

細胞は、例えば自己であってよい。細胞は、例えば同種であってよい。

【0412】

本明細書における処置への全ての言及は、治療、緩和、及び予防のための処置を含むが、本発明の文脈において防止への言及は予防的処置により一般的に関連していることを認識されたい。哺乳動物、特にヒトの処置が好ましい。ヒト及び獣医学の処置の両方が、本発明の範囲内である。

【0413】

疾患及び状態

例として、本発明の産生物、ETM(例えばETR)、ポリヌクレオチド、及び細胞は、例えばハンチントン病、脊髄小脳失調、コラーゲン症、ヘモグロビン異常症、及びトリヌクレオチドの伸長によって惹起される疾患の処置において用いてよい。さらに、本発明の産生物は、病原体関連遺伝子産物又は病原体のライフサイクルに必要な宿主遺伝子を不活化することによる、ある種の感染疾患(例えばCCR5向性HIV感染)の処置又は防止において用いてよい。

【0414】

さらに又はその代わりに、本発明の産生物、ETM(例えばETR)、ポリヌクレオチド、及び細胞は、WO1998/005635に列挙された障害の処置に有用である。参照を容易にするために、そのリストの一部をここで提供する。がん、炎症又は炎症性疾患、皮膚障害、発熱、心血管影響、出血、凝血及び急性相応答、悪液質、拒食症、急性感染、HIV感染、ショック状態、グラフト対宿主反応、自己免疫疾患、再灌流傷害、髄膜炎、片頭痛及びアスピリン依存性抗血栓症、腫瘍成長、侵襲及び拡散、血管形成、転移、悪性、腹水及び悪性胸膜滲出、脳虚血、虚血性心疾患、骨関節炎、リウマチ性関節炎、骨粗鬆症、喘息、多発性硬化症、神経変性、アルツハイマー病、アテローム性動脈硬化症、発作、血管炎、クローン病及び潰瘍性大腸炎、歯周炎、歯肉炎、乾癬、アトピー性皮膚炎、慢性潰瘍、表皮水疱症、角膜潰瘍、網膜症及び手術創の治癒、鼻炎、アレルギー性結膜炎、湿疹、アナフィラキシー、再狭窄、うっ血性心不全、内膜症、アテローム性動脈硬化症、又は内硬化症。

【0415】

さらに又はその代わりに、本発明の産生物、ETM(例えばETR)、ポリヌクレオチド、及び細胞は、WO1998/007859に列挙された障害の処置に有用であり得る。参照を容易にするために、そのリストの一部をここで提供する。例えばヒト又は獣医の医学における、サイトカイン及び細胞増殖/分化活性、免疫抑制又は免疫刺激の活性(例えばヒト免疫不全ウイルスによる感染を含む免疫不全を処置するため)、リンパ球増殖の制御、がん及び多くの自己免疫疾患の処置、並びに移植拒絶の防止及び腫瘍免疫の誘導)、造血の制御、例えば骨髄又はリンパの疾患の処置、骨、軟骨、腱、靱帯、及び神経の組織の成長の促進、例えば創傷の治癒、熱傷、潰瘍、及び歯周疾患の処置及び神経再生、濾胞刺激ホルモンの阻害又は活性化(受胎の調節)、化学向性/ケモキネティクス活性(例えば傷害又は感染の部位に特定の細胞型を動員するため)、止血及び血栓溶解の活性(例えば血友病及び発作を処置するため)、抗炎症活性(例えば敗血症ショック又はクローン病を処置するため)、抗微生物剤として、例えば代謝又は行動の調節剤、鎮痛薬として、特定の欠乏障害の処置、例えば乾癬の処置。

【0416】

さらに又はその代わりに、本発明の産生物、ETM(例えばETR)、ポリヌクレオチド、及び細胞は、WO1998/009985に列挙された障害の処置に有用である。参照を容易にするために、そのリストの一部をここで提供する。マクロファージ阻害及び/又はT細胞阻害の活性、及びしたがって抗炎症活性、抗免疫活性、即ち炎症に関連しない応答を含む細胞性及び/又は体液性の免疫応答に対する阻害効果、細胞外マトリックス成分及びフィブロネクチンに接着するマクロファージ及びT細胞の能力並びにT細胞内の上方制御されたfas受容体の発現の阻害、リウマチ性関節炎を含む関節炎を含む望ましくない免疫反応及び炎症、過敏症、アレルギー反応、喘息、全身性ループスエリテマトーデス、コラーゲン症、及びその他の自己免疫疾患に関連する炎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、アテローム硬化性心疾患、再灌流傷害、心不全、心筋梗塞、血管炎症障害、呼吸窮迫症候群、又はその他の心肺疾患に関連する炎症、消化性潰瘍、潰瘍性大腸炎、及びその他の胃腸管の疾患、肝線維症、肝硬変及びその他の肝疾患、甲状腺炎又はその他の腺疾患、糸球体腎炎又はその他の腎及び泌尿器疾患、耳炎又はその他の耳鼻咽喉疾患、皮膚炎又はその他の皮膚疾患、歯周病又はその他の歯科疾患、精巣炎又は精巣上体炎、不妊症、睾丸外傷又はその他の免疫関連睾丸疾患、胎盤機能不全(dysfunction)、胎盤機能不全(insufficiency)、習慣性流産、子癇、前子癇及びその他の免疫及び/又は炎症に関連する婦人科疾患、後部ブドウ膜炎、中間部ブドウ膜炎、前部ブドウ膜炎、結膜炎、脈絡網膜炎、ブドウ膜網膜炎、視神経炎、眼内炎症、例えば網膜炎又は類囊胞黄斑浮腫、交感性眼炎、強膜炎、網膜色素変性症に関連する炎症、退行性胃底疾患の免疫及び炎症性の成分、眼外傷、感染によって惹起される眼の炎症、増殖性硝子体網膜炎、急性虚血性視神経症、例えば緑内障の濾過手術後の過剰瘢痕の炎症性成分、眼インプラントに対する免疫及び/又は炎症性の反応及び/又はその他の免疫及び炎症に関連する眼科疾患に関連する炎症、中枢神経系(CNS)又はその他の任意の臓器における自己免疫疾患又は状態又は障害に関連する炎症(免疫及び/又は炎症性の抑制が有益であろう)、パーキンソン病、パーキンソン病の処置からの合併症及び/又は副作用、AIDS関連認知症複合HIV関連脳症、デビック病、シデナムコレア、アルツハイマー病及びその他の退行性疾患、CNSの状態又は障害、脳卒中の炎症性成分、ポリオ後症候群、精神障害の免疫及び炎症性の成分、脊髄炎、脳炎、亜急性硬化性汎脳炎、脳脊髄炎、急性神経炎、亜急性神経炎、慢性神経炎、ギランバレー症候群、シデナムコレア、重症筋無力症、仮性脳腫瘍、ダウン症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、CNS圧迫又はCNS外傷又はCNSの感染の炎症性成分、筋萎縮及びジストロフィーの炎症性成分、並びに中枢及び末梢の神経系の免疫及び炎症に関連する疾患、状態、又は障害、外傷後炎症、敗血症ショック、炎症性疾患、手術、骨髄移植の炎症性合併症又は副作用又はその他の移植合併症及び/若しくは副作用、例えばウイルスキャリアによる感染による遺伝子療法の炎症性及び/又は免疫性の合併症及び副作用、AIDSに関連する炎症の阻害、液性及び/又は細胞性の免疫応答の抑制又は阻害、単球又はリンパ球の量を低減することによる単球又は白血球の増殖性疾患、例えば白血病の処置又は改善、天然又は合成の細胞、組織、及び臓器、例えば角膜、骨髄、臓器、レンズ、ペースメーカー、天然若しくは人工の皮膚組織の移植の場合のグラフト拒絶の防止及び/又は処置のため。

10

20

30

40

【0417】

例えば、本発明は、ヘモグロビンF(HBF)又はヘモグロビンサブユニットベータ(HBB)を標的とすることによる遺伝疾患、例えばβ-ヘモグロビン症の処置、又は重症複合型免疫不全症(SCID)、ウィスコット・アルドリッチ症候群タンパク質(WASP)、鎌状赤血球病(SCD)、又はアデノシンデアミナーゼ欠乏症(ADA)の処置のために用いてよい。

【0418】

当業者であれば、開示した本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書で開示した発明の任意の又は全ての特徴を組み合わせることができることを理解することになる。

【0419】

さらなる態様

本発明は、以下に番号付けしたパラグラフで定義したさらなる態様も提供する。

50

1. (b)エンドヌクレアーゼに作動可能に連結された(a)少なくとも1つの後成的エフェクタードメインを含む操作された転写モジュレーター(ETM)。
2. 少なくとも1つの後成的エフェクタードメインが、Kruppel関連ボックス(KRAB)ドメイン、DNAメチルトランスフェラーゼ(DNMT)ドメイン、DNMT様ドメイン、及び/又はヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)ドメインを含む、パラグラフ1に記載のETM。
3. 少なくとも1つの後成的エフェクタードメインが、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L、及びSETDB1からなる群から選択される、パラグラフ1又はパラグラフ2に記載のETM。
4. エンドヌクレアーゼがRNA結合ドメインを含む、パラグラフ1から3のいずれか一項に記載のETM。
5. エンドヌクレアーゼがクラスター化され規則的な間隔で配置された短い回文反復(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR))/Casシステムである、パラグラフ1から4のいずれか一項に記載のETM。
6. エンドヌクレアーゼがCas9エンドヌクレアーゼである、パラグラフ1から5のいずれか一項に記載のETM。
7. Cas9-KRAB、Cas9-DNMT3A、又はCas9-DNMT3Lの融合タンパク質を含むか、これらからなる、パラグラフ1から6のいずれか一項に記載のETM。
8. 二分割又は三分割の融合タンパク質である、パラグラフ1から7のいずれか一項に記載のETM。
9. 配列番号23~46、562~1076、2778~4478、及び4553~4565、又はそれらの断片のいずれか1つの配列を含むか、これらからなるスペーサー配列を含むgRNA。
10. パラグラフ1~8のいずれか1つによるETM及び少なくとも1つのガイドRNA(gRNA)を含む組合せ。
11. 1つ以上のETMを含み、それぞれのETMが触媒的に活性なCRISPR/Casエンドヌクレアーゼドメインを含む融合タンパク質である、パラグラフ10に記載の組合せ。
12. 1つから3つのETMを含む、パラグラフ10又はパラグラフ11に記載の組合せ。
13. 少なくとも1つの後成的エフェクタードメインが転写リプレッサードメインであり、及び/又は少なくとも1つの後成的エフェクタードメインがDNMT3Lドメインである、パラグラフ10から12のいずれか一項に記載の組合せ。
14. 1つ以上のETMが集合的に転写リプレッサードメイン及びDNMT3Lドメインを含む、パラグラフ10から13のいずれか一項に記載の組合せ。
15. 少なくとも2つのgRNAを含む、パラグラフ10から14のいずれか一項に記載の組合せ。
16. gRNAが、ETMに少なくとも2つの異なる標的遺伝子を標的とさせる、パラグラフ15に記載の組合せ。
17. 少なくとも2つのgRNAが異なる長さのスペーサー配列を含む、パラグラフ15又はパラグラフ16に記載の組合せ。
18. 少なくとも1つのgRNAが、長さ15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチドのスペーサー配列を含む、パラグラフ10から13のいずれか一項に記載の組合せ。
19. 少なくとも2つのgRNAの1つが、長さ17ヌクレオチド以下(例えば16以下)のスペーサー配列を含む、パラグラフ15から18のいずれか一項に記載の組合せ。
20. 少なくとも1つの標的遺伝子が、CpGアイランド(CGI)を有しない遺伝子、例えばTRAC、TRBC、PDCD1、TIM-3、TIGIT、LAG3、CTLA4、AAVS1、及びCCR5、並びに/又はCGIを有する遺伝子、例えばB2M、TET2、TGFB2、A2AR、CISH、PTPN11、PTPN6、PTPA、PTPN2、JUNB、TOX、TOX2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、MAP4K1、REL、IRF4、DGKA、PIK3CD、HLA-A、USP16、DCK、及びFASから選択される、パラグラフ10から19のいずれか一項に記載の組合せ。
21. 細胞内の第1の遺伝子の後成的編集を可能にし、遺伝子編集を可能にしない長さを有するスペーサー配列を有する1つ以上のガイドRNA(gRNA)であって、場合により第1の

10

20

30

40

50

遺伝子がCpGアイランド(CPI)を含む、1つ以上のgRNA、及び細胞内の第2の遺伝子の遺伝子編集を可能にする長さを有するスペーサー配列を有する1つ以上のgRNAを含む、パラグラフ10から20のいずれか一項に記載の組合せ。

22. 細胞内の第1の遺伝子の後成的編集を可能にし、遺伝子編集を可能にしない長さを有するスペーサー配列を有する1つ以上のガイドRNA (gRNA)が、

(a) 17ヌクレオチド以下(例えば16ヌクレオチド以下)、又は

(b) 11~17ヌクレオチド(例えば11~16ヌクレオチド)

のスペーサー配列を有する、パラグラフ21に記載の組合せ。

23. 細胞内の第2の遺伝子の遺伝子編集を可能にする長さを有するスペーサー配列を有する1つ以上のgRNAが、

(a) 17以上のヌクレオチド(例えば18以上のヌクレオチド)、又は

(b) 17~30ヌクレオチド、場合により18~25ヌクレオチド(例えば18~21ヌクレオチド)

のスペーサー配列を有する、パラグラフ21又はパラグラフ22に記載の組合せ。

24. パラグラフ10から23のいずれか一項で定義したETM(例えば融合タンパク質)及び/又はgRNAをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む組合せ。

25. 第2の遺伝子中の配列と相同である5'及び3'のアームを含むドナーDNAをさらに含む、パラグラフ21から24のいずれか一項に記載の組合せ。

26. エンドヌクレアーゼドメインがCas9タンパク質、場合によりSpCas9から誘導される、パラグラフ10から25のいずれか一項に記載の組合せ。

27. 第1の遺伝子が、B2M、TET2、TGFB2、A2AR、CISH、PTPN11、PTPN6、PTPA、PTPN2、JUNB、TOX、TOX2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、MAP4K1、REL、IRF4、DGKA、PIK3CD、HLA-A、USP16、DCK、及びFASから選択され、並びに/又は

第2の遺伝子がTRAC、TRBC、PDCD1、TIM-3、TIGIT、LAG3、CTLA4、AAVS1、及びCCR5から選択される、パラグラフ21から26のいずれか一項に記載の組合せ。

28. 第2の遺伝子がTRAC遺伝子であり、場合により、TRAC遺伝子を標的とする1つ以上のgRNAが配列番号562~611の1つ、場合により配列番号604の配列を有するスペーサーを含む、パラグラフ21から27のいずれか一項に記載の組合せ。

29. 第1の遺伝子がB2M遺伝子であり、場合により、B2M遺伝子を標的とする1つ以上のgRNAがそれぞれ、配列番号28~33及び39~44の1つの配列、又は5'末端の3~9ヌクレオチドが短縮化された配列番号2778~2878の1つの配列、場合により5'末端の3~9ヌクレオチドが短縮化された配列番号2778、2780、2801、及び2863の1つの配列を有し、配列番号4486~4492、4497~4503、4508~4514、及び4519~4525から選択されるスペーサーを含む、パラグラフ21から28のいずれか一項に記載の組合せ。

30. 第1の遺伝子がTGFB2遺伝子であり、場合により、TGFB2遺伝子を標的とする1つ以上のgRNAがそれぞれ、5'末端の3~9ヌクレオチドが短縮化された配列番号2929~2978及び4553~4559の1つの配列を有するスペーサーを含む、パラグラフ21から28のいずれか一項に記載の組合せ。

31. 第1の遺伝子がTET2遺伝子であり、場合により、TET2遺伝子を標的とする1つ以上のgRNAがそれぞれ、5'末端の3~9ヌクレオチドが短縮化された配列番号4429~4478及び4560~4565の1つの配列を有するスペーサーを含む、パラグラフ21から28のいずれか一項に記載の組合せ。

32. 細胞内の1つ以上(例えば2つ以上)の遺伝子の転写、発現、及び/又は活性を改変するためのものであり、細胞が哺乳動物細胞、場合によりヒト細胞であり、場合により細胞がヒト免疫細胞又はヒトT細胞である、パラグラフ10から31のいずれか一項に記載の組合せ。

33. i) 細胞、例えば組合せを含む細胞若しくは組合せを含まない細胞の生存、増殖、及び/若しくは活性を促進する薬剤、並びに/又は

10

20

30

40

50

ii)細胞、例えば組合せを含む細胞若しくは組合せを含まない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害である薬剤、並びに/又は
iii)細胞、例えば組合せを含む細胞若しくは組合せを含まない細胞の選択を可能にする薬剤

をさらに含む、パラグラフ10から32のいずれか一項に記載の組合せ。

34. パラグラフ9に記載の少なくとも1つのgRNAを含む、パラグラフ10から33のいずれか一項に記載の組合せ。

35. CGIを含む遺伝子がB2M遺伝子であり、これを標的とするgRNAが、場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化された、

C8(配列番号35)、

F4(配列番号24)、

H8(配列番号2780)、

H10(配列番号2863)、

H11(配列番号2778)、又は

H12(配列番号2801)

の配列を有するスペーサーをそれぞれ独立に含む2つ又は3つのgRNAである、パラグラフ20から34のいずれか一項に記載の組合せ。

36. B2Mを標的とするgRNAが、

(i)場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたF4の配列を有するスペーサーを含むgRNA、

場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたH8の配列を有するスペーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたH10の配列を有するスペーサーを含むgRNA、

(ii)場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたC8の配列を有するスペーサーを含むgRNA、

場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたH8の配列を有するスペーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたH10の配列を有するスペーサーを含むgRNA、

(iii)場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたF4の配列を有するスペーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたH8の配列を有するスペーサーを含むgRNA、

(iv)場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたF4の配列を有するスペーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたH10の配列を有するスペーサーを含むgRNA、又は

(v)場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたH8の配列を有するスペーサーを含むgRNA、及び

場合により5'末端の1~9ヌクレオチド、場合により3~9ヌクレオチドが短縮化されたH10の配列を有するスペーサーを含むgRNA

を含む、パラグラフ35に記載の組合せ。

37. ETM(例えば1つ以上の融合タンパク質)が集合的に、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、又はSETDB1ドメイン、場合によりDNMT3Aをさらに含む、パラグラフ21から36のいずれか一項に記載の組合せ。

38. (i)転写リプレッサードメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第1の融合タンパク質、並びにDNMT3Lドメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第2の融合タンパク質、又は

(ii)場合によりN末端からC末端へ、転写リプレッサードメイン、Casエンドヌクレアー

10

20

30

40

50

ゼドメイン、及びDNMT3Lドメインを含む融合タンパク質を含む、パラグラフ10から37のいずれか一項に記載の組合せ。

39. (i) 転写リプレッサードメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第1の融合タンパク質、DNMT3Lドメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第2の融合タンパク質、並びにDNMT3Aドメイン及びCasエンドヌクレアーゼドメインを含む第3の融合タンパク質、又は

(ii) 転写リプレッサードメイン、Casエンドヌクレアーゼドメイン、DNMT3Lドメイン、及びDNMT3Aドメインを含む融合タンパク質を含む、パラグラフ10から37のいずれか一項に記載の組合せ。

40. 後成的エフェクタードメイン(例えば転写リプレッサードメイン)が、場合によりヒトKox1又はZIM3から誘導されるKruppel関連ボックス(KRAB)ドメインである、パラグラフ10から39のいずれか一項に記載の組合せ。

41. 場合によりN末端からC末端へ、ZIM3から誘導されるKRABドメイン、触媒的に活性なCas9ドメイン、及びDNMT3Lドメインを含む融合タンパク質を含み、場合により配列番号4482のアミノ酸配列を含む、パラグラフ10から40のいずれか一項に記載の組合せ。

42. 細胞内の1つ以上のさらなる遺伝子を標的とするためのgRNAをさらに含む、パラグラフ10から41のいずれか一項に記載の組合せ。

43. gRNAが化学的に改変され、場合により、化学的に改変されたgRNAが、5'末端及び/若しくは3'末端にホスホロチオエートのヌクレオシド間リンケージ、並びに/又は2'-O-メチルヌクレオチドを含む、パラグラフ10から42のいずれか一項に記載の組合せ。

44. パラグラフ1から8のいずれか一項に記載の又はパラグラフ10から43のいずれか一項で定義した少なくとも1つのETMをコードするポリヌクレオチド。

45. パラグラフ1から8のいずれか一項に記載の又はパラグラフ10から43のいずれか一項で定義した少なくとも1つのETMをコードする核酸配列を含む核酸構築物。

46. i) 細胞、例えば前記核酸構築物を発現する細胞又は前記核酸構築物を発現しない細胞の生存、増殖、及び/若しくは活性を促進する核酸配列、並びに/又は

ii) 細胞、例えば前記核酸構築物を発現する細胞又は前記核酸構築物を発現しない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害な核酸配列、並びに/又は

iii) 細胞、例えば核酸構築物を含む細胞若しくは構築物を含まない細胞の選択を可能にする核酸配列をさらに含む、パラグラフ45に記載の核酸構築物。

47. パラグラフ44に記載のポリヌクレオチド又はパラグラフ45若しくは46に記載の核酸構築物を含むベクター。

48. a) パラグラフ1から8のいずれか一項に記載の又はパラグラフ10から43のいずれか一項で定義した少なくとも1つのETMをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド、及び

b) パラグラフ9又は10から32又は35から43のいずれか一項に記載の少なくとも1つのgRNAを提供するポリヌクレオチド、及び場合により、

c) i) 細胞、例えばポリヌクレオチドを含む細胞又はポリヌクレオチドを含まない細胞の生存、増殖、及び/若しくは活性を促進する薬剤、並びに/又は

ii) 細胞、例えば前記ポリヌクレオチドを含む細胞又は前記ポリヌクレオチドを含まない細胞の生存、増殖、活性、化学耐性、及び/若しくは走化性に対して有害な薬剤、並びに/又は

iii) 細胞、例えばポリヌクレオチドを含む細胞又はポリヌクレオチドを含まない細胞の選択を可能にする薬剤

をコードする核酸配列を含むさらなるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのキット。

49. パラグラフ1から8のいずれか一項に記載のETMを含む細胞、パラグラフ9に記載の少なくとも1つのgRNA、パラグラフ10から43のいずれか一項に記載の組合せ、パラグ

10

20

30

40

50

ラフ44に記載のポリヌクレオチド、パラグラフ45若しくはパラグラフ46に記載の核酸構築物、パラグラフ47に記載のベクター、又はパラグラフ48に記載のポリヌクレオチドのキット。

50. パラグラフ49の細胞の子孫である細胞。

51. パラグラフ1から8のいずれか一項に記載のETM、パラグラフ9に記載の少なくとも1つのgRNA、パラグラフ10から43のいずれか一項に記載の組合せ、パラグラフ44に記載のポリヌクレオチド、パラグラフ45若しくはパラグラフ46に記載の核酸構築物、パラグラフ47に記載のベクター、パラグラフ48に記載のポリヌクレオチドのキット、又はパラグラフ49若しくはパラグラフ50に記載の細胞を含む組成物。

52. パラグラフ1から8のいずれか一項に記載のETM、パラグラフ9に記載の少なくとも1つのgRNA、パラグラフ10から43のいずれか一項に記載の組合せ、パラグラフ44に記載のポリヌクレオチド、パラグラフ45若しくはパラグラフ46に記載の核酸構築物、パラグラフ47に記載のベクター、パラグラフ48に記載のポリヌクレオチドのキット、又はパラグラフ49若しくはパラグラフ50に記載の細胞を含む医薬組成物。

53. 細胞内の少なくとも1つの標的遺伝子の転写、発現、及び/又は活性を改変する(例えば抑制又はサイレンシングする)ための、パラグラフ1から8のいずれか一項に記載のETM、パラグラフ9に記載の少なくとも1つのgRNA、パラグラフ10から43のいずれか一項に記載の組合せ、パラグラフ44に記載のポリヌクレオチド、パラグラフ45若しくはパラグラフ46に記載の核酸構築物、パラグラフ47に記載のベクター、パラグラフ48に記載のポリヌクレオチドのキット、又はパラグラフ49若しくはパラグラフ50に記載の細胞の使用。

54. パラグラフ1から8のいずれか一項に記載のETM、パラグラフ9に記載の少なくとも1つのgRNA、パラグラフ10から43のいずれか一項に記載の組合せ、パラグラフ44に記載のポリヌクレオチド、パラグラフ45若しくはパラグラフ46に記載の核酸構築物、パラグラフ47に記載のベクター、又はパラグラフ48に記載のポリヌクレオチドのキットを細胞に投与するステップを含む、細胞内の少なくとも1つの標的遺伝子の転写、発現、及び/又は活性を改変する(例えば抑制又はサイレンシングする)方法。

55. 細胞がT細胞である、パラグラフ53又は54に記載の使用又は方法。

56. ETM、少なくとも1つのgRNA、組合せ、ポリヌクレオチド、核酸構築物、ベクター、又はポリヌクレオチドのキットが、インビトロ又はエクスピボで細胞内に導入される、パラグラフ53から55のいずれか一項に記載の使用又は方法。

57. 少なくとも2つの標的遺伝子がサイレンシングされ、少なくとも2つの標的遺伝子の少なくとも1つが後成的にサイレンシングされ、少なくとも2つの標的遺伝子の少なくとも1つが遺伝子編集によってサイレンシングされ、少なくとも1つのETM及び少なくとも2つのgRNAが同時、逐次、又は個別に前記細胞に投与される、パラグラフ54から56のいずれか一項に記載の方法。

58. パラグラフ53から57のいずれか一項に記載の使用又は方法によって得られる細胞又は細胞の子孫。

59. 場合により組換えT細胞受容体(TCR)又はキメラ抗原受容体(CAR)から選択される組換え抗原受容体を発現するように場合により操作されたヒトT細胞である、パラグラフ49、50、又は58のいずれか一項に記載の細胞。

60. 治療における使用のための(例えばそれを必要とするヒトの処置における使用のための)、パラグラフ1から8のいずれか一項に記載のETM、パラグラフ9に記載の少なくとも1つのgRNA、パラグラフ10から43のいずれか一項に記載の組合せ、パラグラフ44に記載のポリヌクレオチド、パラグラフ45若しくはパラグラフ46に記載の核酸構築物、パラグラフ47に記載のベクター、パラグラフ48に記載のポリヌクレオチドのキット、パラグラフ49、50、58、若しくは59に記載の細胞、又はパラグラフ52に記載の医薬組成物。

61. それを必要とするヒトを処置するための医薬の製造における、パラグラフ1から8のいずれか一項に記載のETM、パラグラフ9に記載の少なくとも1つのgRNA、パラグラフ10から43のいずれか一項に記載の組合せ、パラグラフ44に記載のポリヌクレオチド、

10

20

30

40

50

パラグラフ45若しくはパラグラフ46に記載の核酸構築物、パラグラフ47に記載のベクター、パラグラフ48に記載のポリヌクレオチドのキット、パラグラフ49、50、58、若しくは59に記載の細胞、又はパラグラフ52に記載の医薬組成物の使用。

62. 少なくとも1つのETM(例えば融合タンパク質)及び少なくとも2つのgRNAが同時、逐次、又は個別に細胞又は対象に投与される、パラグラフ60に記載の使用又はパラグラフ61に記載の使用のためのETM、組合せ、ポリヌクレオチド、核酸構築物、ベクター、ポリヌクレオチドのキット、細胞、又は医薬組成物。

63. パラグラフ1から8のいずれか一項に記載のETM、パラグラフ9に記載の少なくとも1つのgRNA、パラグラフ10から43のいずれか一項に記載の組合せ、パラグラフ44に記載のポリヌクレオチド、パラグラフ45若しくはパラグラフ46に記載の核酸構築物、パラグラフ47に記載のベクター、パラグラフ48に記載のポリヌクレオチドのキット、パラグラフ49、50、58、若しくは59に記載の細胞、又はパラグラフ52に記載の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む、(例えばそれを必要とするヒトにおける)疾患を処置及び/又は防止する方法。

64. 少なくとも1つのETM(例えば融合タンパク質)及び少なくとも2つのgRNAが同時、逐次、又は個別に細胞又は対象に投与される、パラグラフ63に記載の疾患を処置及び/又は防止する方法。

65. (i)細胞を含む使用の単離、

(ii)パラグラフ1から8のいずれか一項に記載のETM、パラグラフ9に記載の少なくとも1つのgRNA、パラグラフ10から43のいずれか一項に記載の組合せ、パラグラフ44で定義したポリヌクレオチド、パラグラフ45若しくはパラグラフ46に記載の核酸構築物、パラグラフ47に記載のベクター、及び/又はパラグラフ48に記載のポリヌクレオチドのキットの細胞への導入、並びに

(iii)ステップ(ii)の細胞の対象への投与

のステップを含む、遺伝子治療の方法。

66. ポリヌクレオチド、核酸構築物、及び/又はベクターが、形質導入又はトランスフェクションによって導入される、パラグラフ65に記載の方法。

67. 細胞が自己である、パラグラフ60若しくは62に記載の使用、パラグラフ61若しくは62に記載の使用、又はパラグラフ63から66のいずれか一項に記載の方法のための、ETM、組合せ、ポリヌクレオチド、核酸構築物、ベクター、ポリヌクレオチドのキット、細胞、又は医薬組成物。

68. 細胞が同種である、パラグラフ60若しくは62に記載の使用、パラグラフ61若しくは62に記載の使用、又はパラグラフ63から66のいずれか一項に記載の方法のための、ETM、組合せ、ポリヌクレオチド、核酸構築物、ベクター、ポリヌクレオチドのキット、細胞、又は医薬組成物。

【0420】

本明細書で他に定義しなければ、本開示に関連して用いる科学用語及び技術用語は、当業者によって共通に理解される意味を有するものとする。例示的な方法及び材料を以下に述べるが、本明細書で述べるものと同様又は等価の方法及び材料も、本開示の実施又は試験において用いることができる。矛盾が生じた場合には、定義を含む本明細書が優先する。一般に、本明細書に記載した医学、医化学、及び薬化学、並びに細胞生物学に関連して用いられる命名法及びその手法は、当技術において周知で一般に用いられているものである。酵素反応及び精製手法は、当技術で一般に確立され又は本明細書に記載しているように、メーカーの説明書に従って実施している。さらに、文脈によって他に要求されなければ、単数の用語は複数を含み、複数の用語は単数を含むものとする。本明細書及び実施形態を通して、単語「有する(have)」及び「含む(comprise)」又は「有する(has、having)」、「含む(comprises、comprising)」等の変形は、記載した整数又は整数の群を包含することを意味するが、その他の整数又は整数の群のいずれも排除することを意味しないことが理解されよう。用語「又は」は一般に、内容が明らかに他を指示しない限り、その意味の中に「及び/又は」を含んで採用されることにも留意されたい。本明細書で

10

20

30

40

50

使用される場合、用語「約」は、特定の使用の文脈内で、記載した数値から10%、5%、又は1%のプラス又はマイナスである数値範囲を意味する。さらに、本明細書で提供する見出しは便利さのためのみであり、特許を請求する実施形態の範囲又は意味を説明するものではない。

【0421】

本発明の実施には、他に指示しなければ、当業者の能力の範囲内にある化学、生化学、分子生物学、微生物学、及び免疫学の従来手法を採用することになる。そのような手法は文献で説明されている。例えばSambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al. (1995及び定期的な付録) *Current Protocols in Molecular Biology*, Ch. 9, 13 and 16, John Wiley & Sons; Roe, B., Crabtree, J. and Kahn, A. (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; Polak, J.M. and McGee, J.O'D. (1990) *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press; Gait, M.J. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press;及びLilley, D.M. and Dahlberg, J.E. (1992) *Methods in Enzymology: DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*, Academic Pressを参照されたい。

10

【0422】

本明細書で述べた全ての出版物及びその他の参考文献は、参照により全体として組み込まれる。本明細書でいくつかの文献を引用するが、この引用は、これらの文献のいずれかが当技術における共通の一般的知識の一部を形成していることの承認を構成するものではない。

20

【0423】

本発明がより良く理解されるように、以下の実施例を説明する。これらの実施例は説明の目的のためのみであって、いかなる様式でも本発明の範囲を限定するものと解釈すべきでない。

【0424】

[実施例]

【0425】

30

[実施例1]

切り取られたスペーサー配列を含むgRNAは変異生成を惹起することなく後成的サイレンシングを促進する。

切り取られたスペーサー配列を含むgRNAを用いて、遺伝子を変異生成から保護しながらB2MのETR媒介エピサイレンシングを促進することの実施可能性を評価するため、本発明者らは最初にB2Mに対する20nt長さのgRNA (F4と命名;配列番号24)及び様々な長さのスペーサー配列を有する5'末端が短縮化されたB2M gRNAの対応するパネルを設計し、これらをB2M^{tdTomato} K-562細胞系(Amabileら、上掲)で試験した。

【0426】

特に、長さ21~10ntにわたるスペーサー配列を含み、同じシード及びPAM配列を含むgRNA(図1)を、Cas9又はKRAB、DNMT3A、若しくはDNMT3Lを含むdCas9系ETR組合せとともに、個別に細胞内に送達した。次いで細胞を、B2M遺伝子におけるCas9の活性の遺伝子痕跡又はtdTomatoの発現について解析した。後者は、B2Mの後成的サイレンシングの代理として用いた。

40

【0427】

標準の20nt長さのB2Mスペーサー配列及びCas9又はdCas9-ETRを含むgRNAを、それぞれ遺伝子破壊又は後成的サイレンシングの陽性対照として含ませた。Cas9処理細胞のB2M標的部位の分子解析は閾値効果を示した。長さ17nt以上のスペーサー配列を含むgRNAは、高く比較できるB2M編集レベル(約30%)を媒介した一方、16nt以下のスペーサー配列を含むgRNAは、検出不能の遺伝子編集をもたらした(図2)。ETR処理した細胞

50

のフローサイトメトリー解析は異なる傾向を示した。10nt長さのスペーサー配列を含むgRNAを除く全てのgRNAは、異なるレベル(tdTomato陰性細胞の30~48%、図3)であったが、B2Mの効率的な後成的サイレンシングを誘導することができた。重要なことに、Cas9による遺伝子編集の促進において無効であった切り取られたスペーサー配列(即ち16nt以下)を含むgRNAは、dCas9-ETRによる後成的サイレンシングの媒介においては極めて有効であった。これらの知見が他のgRNAにも適用できるかを評価するため、他の3つのgRNA(H8_20と命名(スペーサー配列番号2780; gRNA配列番号4570)、C8_20(スペーサー配列番号2813; gRNA配列番号4569)、及びH10_20(スペーサー配列番号2863; gRNA配列番号4571)を用いて同様の短縮化実験を実施し、Cas9がその活性を失うスペーサー長さが、長さ15nt以下及び17nt以下の範囲で、用いた特定のgRNAに依存することを見出した(図4、左パネル)。上で示した結果に一致して、ETRは、切り取られたgRNAによっても、B2Mのエピサイレンシングを誘起することができた(図4、右パネル)。

10

【0428】

全体として、これらのデータは、17nt以下の切り取られたスペーサー配列を含むgRNAがB2Mの後成的サイレンシングを促進する一方、Cas9系ETRによって誘起される変異生成からこの遺伝子を保護していることを示している。さらに、これらのデータは、切り取られたスペーサー配列を含むgRNAを用いたときにもエピサイレンシングが実施できることの最初の実証を提供している。これらの実験と並行して、TRAC遺伝子座において遺伝子編集を誘起することができる20ntのスペーサー配列を含むgRNAも産生した(図5)。

20

【0429】

[実施例2]

ETRとgRNAの組合せは、染色体の転座を誘起せずに2つの遺伝子の同時不活化を可能にする。

これらのデータに基づいて、触媒的に活性なCas9を備えるETR(今後KRAB、DNMT3A、又はDNMT3Lを含むCas9-ETRと称する)を構築し、B2M^{tdTomato} K-562細胞における切り取られた又は完全長のスペーサー配列を含むgRNAによるそれらの多重化効率を評価した。特に、三重Cas9-ETR組合せと、16nt長さのスペーサー配列を含むF4誘導B2M gRNA(図2及び3参照)及び20nt長さのスペーサーを有するTRAC gRNAを、細胞に共トランスフェクトした。以下の対照も実験に含ませた。(i)それぞれTRACの遺伝子破壊又はB2Mのエピサイレンシング及びTRACの破壊の陽性対照として用いる、上述のgRNA組合せとCas9又は標準の三重dCas9-ETRを共トランスフェクトした細胞、(ii)1つはB2Mに対し、他はTRACに対する、20nt長さのスペーサー配列を含む2つのgRNAと、Cas9又はCas9-ETRを共トランスフェクトした細胞を、B2M及びTRACの共破壊のための陽性対照としてここで用いた。後者の条件も、2つの遺伝子座の同時の遺伝子編集が相互染色体転座をもたらすか否かを評価するために含ませた。トランスフェクションに際して、tdTomatoの発現についてフローサイトメトリーによって細胞を25日まで長期にモニタリングした。

30

【0430】

図6及び図7に示すように、16ntのスペーサー配列を含むgRNAとともに送達した場合、Cas9及びdCas9系ETRは、B2Mのエピサイレンシングに関して等しく機能した(それぞれ14%対21%)。Cas9は、長さ20ntのスペーサー配列を含むgRNAに連結された場合にのみB2Mの不活化を促進し、その切り取られた対応物の場合には不活化を促進せず(tdTomato陰性細胞の24%対1.7%)、図2及び図3の結果がさらに確認された。長さ20ntのB2Mスペーサー配列を含むgRNAをCas9-ETRとともに用いると、この遺伝子座における遺伝子編集及び後成的編集の相加効果を考慮して予想される知見である他の全ての条件で見出されるパーセンテージよりも高いパーセンテージ(44%まで)のtdTomato陰性細胞がもたらされた。注目すべきことに、サイレンシングは解析した全ての条件で長期に安定であり(図8)、16ntのスペーサー配列を含むgRNAを有するCas9-ETRも、分裂期に受け継がれる後成的改変を指示することができることを示している。

40

50

【0431】

次に、遺伝子編集について細胞を解析し(図9)、Cas9とCas9-ETRの両方がTRACの効率的な編集を誘起する(37%まで)ことを見出した。他方、B2Mの遺伝子編集は、Cas9又はCas9-ETRが長さ20ntのB2Mスペーサー配列を含むgRNAとともに共送達される条件に限られていた。最後に、B2M及びTRACの間の相互染色体転座に特異的なプライマーを用いるPCR解析を実施し、長さ20ntのスペーサー配列を含む2つのgRNAによって共処理した条件においてのみこれらの事象の出現が見出されたが、16ntのスペーサー配列を含むgRNAを用いた場合には見出されなかった(図10)。

【0432】

全体として、これらのデータは、Cas9-ETRがサイレンシングの効率及び安定性に関して、それらのdCas9系対応物と同様に機能することを示している。さらに、切り取られた及び完全長のスペーサー配列を含むgRNAと組み合わせたCas9-ETRの採用は、染色体転座を誘起せずに2つの遺伝子を同時に不活化するために安全に用いることができる。

【0433】

[実施例3]

ヒト初代Tリンパ球におけるB2Mエピサイレンシング手順の最適化

B2Mの不活化は、同種T細胞産生物を生成するための有望なアプローチとして出現している。ヒト初代T細胞におけるB2Mエピサイレンシングの実施可能性を評価するため、最初にこの遺伝子に対するgRNAのレパートリーを、他の2つのガイド: H11_20 (スペーサー配列番号2778; gRNA配列番号4572)及びH12_20 (スペーサー配列番号2801; gRNA配列番号4573)(図11)を含むように拡張した。次いで、これらの6つのgRNAのそれぞれを、三重ETR組合せをコードするmRNAとともにT細胞に送達した。次いで、処理した細胞の時間経過フローサイトメトリー解析を用いて、B2Mエピサイレンシングの効率及び安定性を評価した。予期しないことに、処理後12日目に、試験したgRNAの1つを除く全てで、B2Mのエピサイレンシングを誘起することができなかった(図12)。作動した唯一のgRNA(即ちgRNA C8)は2%までのB2M陰性細胞をもたらしたが、これはT細胞の再刺激で失われた(25日目に解析)。

【0434】

次いで、gRNAの組合せ送達がエピサイレンシングの効率を改善するか否かを試験した。この目的のため、gRNA C8又はH8を他の全てのgRNAと組み合わせ、これらの二重gRNA組合せを三重ETR組合せとともにT細胞に送達した。処理後12日目のフローサイトメトリー解析により、異なるレベルではあるが、全てのgRNA組合せがB2Mのエピサイレンシングを誘起できることが明らかになった(図12)。例えば、gRNA組合せH12+H8は限定されたサイレンシングを誘起した一方、F4+H8の組合せは28%までのB2M陰性細胞をもたらした。重要なことに、これらのgRNA組合せのいくつかについて、エピサイレンシングはT細胞の再刺激プロセスに抵抗し、長期に安定なB2M陰性細胞は11%~20%の範囲となった(図12及び13)。37日の時間枠の間、2ラウンドのT細胞の再刺激にわたる延長された時間経過フローサイトメトリー解析によって、試験したgRNA組合せの大部分がB2Mエピサイレンシングの初期の波を誘起し、これが次に最初のT細胞の再刺激(12日目)の後で減衰して、T細胞の再刺激の第2ラウンド(25日目)まで安定に近づくことが示された(図14)。次いで、B2Mのパーセンテージは実験の終了(37日目)まで増大した。注目すべきことに、エピサイレンシングの効率は用いたgRNAの組合せに依存し、H8+F4が長期に最も有効であり(30%までのB2M陰性細胞)、一方H8+H11及びH8+H12は、エピサイレンシングがあったとしても殆ど検出不能であった。

【0435】

エピサイレンシングの安定性は、gRNAの組合せにも依存した(図15)。まさに、B2M陰性細胞のパーセンテージを25日目(T細胞の再刺激の第2ラウンドの直前)と12日目(T細胞の再刺激の第1ラウンドの直前)とで比較することによって、いずれも完全に安定な遺伝子サイレンシングをもたらすことはできなかったが、いくつかのgRNAの組合せの耐性が低く(B2M陰性細胞の倍数低下が0.5未満)、一方、他はより耐性が大きい(B2M陰性

10

20

30

40

50

細胞の倍数低下が0.5以上)ことが見出された。最も安定な組合せの中で、組合せH8+F4及びH8+H10が最も良く機能した組合せであった。

【0436】

次に同様の実験を実施し、その中で無効なgRNAの組合せであるH8+H11及びH8+H12を除外し、新たな二重gRNAの組合せF4+H10を含ませた。さらに、三重のgRNA組合せ(即ちC8+F4+H8、C8+F4+H10、C8+H8+H10、及びF4+H8+H10)を含ませ、これらがエピサイレンシングの有効性及び安定性をさらに改善することができるか否かを評価した。試験した二重gRNAの組合せの中で、長期(32日)に最も有効であったのはF4+H10であり、B2M陰性細胞が36.5%に達した。試験した三重gRNAの組合せの中では、F4+H8+H10が他より1.6倍優れており、実験の終了時にB2M陰性細胞が66%までに達した(図16)。以前の実験で観察されたように、T細胞の再刺激の第1ラウンドは、gRNAの組合せの大部分でB2M陰性細胞のパーセンテージの顕著な低減を惹起した(図16)。これに対する顕著な例外はF4+H10を含むgRNAの組合せ(三重C8+F4+H10及びF4+H8+H10を含む)であり、これらについて28日目及び14日目におけるB2M陰性細胞のパーセンテージはほぼ同程度であった(B2M陰性細胞の倍数減少は約1;図17)。同様の知見が、二重C8+H10 gRNA組合せ(図17)で得られた。全体として、これらのデータは、B2Mのエピサイレンシングの効率及び持続性はどのgRNA組合せを用いるかに依存し、F4+H8+H10に基づく三重組合せが最も機能性の良い組合せであった。

10

【0437】

技術の分子的複雑性を低減することを目的として、B2Mのエピサイレンシングのために三重ETR組合せの全ての成分が必要か否かを検討した。この目的のため、C8及びF4を含む二重gRNA組合せを、(i)B2Mのエピサイレンシング効率の参照としてここで取り上げた三重ETR組合せ、(ii)KRAB及びDNMT3Lエフェクタードメインを含む二重ETR組合せ、(iii)DNMT3A及びDNMT3Lエフェクタードメインを含む二重ETR組合せ、又は(iv)KRAB及びDNMT3Lエフェクタードメインを含む二重ETR組合せをコードするmRNAとともに、T細胞に一過的に送達した。次いでT細胞を、処理後37日目まで、B2Mの発現についてフローサイトメトリーによって解析した(図18A及び18B)。この実験により、試験した全ての二重ETR組合せの中で、KRAB及びDNMT3Lエフェクタードメインに基づく組合せのみが、三重ETR組合せで観察された効率と同程度の効率で、長期のサイレンシング(14%までのB2M陰性細胞)を誘起したことが示された。KRAB及びDNMT3Aに基づく二重ETR組合せは一過的なB2M抑制のみを誘起し、これはT細胞の再刺激の第1ラウンドの後で、未処理のT細胞で観察されたレベルに復帰した。予期しないことに、DNMT3A及びDNMT3Lに基づく二重ETR組合せは、処理後の早期の時点においても、いずれのB2Mサイレンシングも誘起することができなかった。

20

30

【0438】

これらの結果に基づいて、図16に示したものと同様であるが、KRAB及びDNMT3Lを含む二重ETR組合せを用いる実験を実施し、この組合せが試験した全てのgRNA組合せについて三重組合せと同じく効率的に機能することを確認した(図19)。三重ETR組合せに関しては、gRNA F4及びH10が共存する条件が、T細胞の再刺激に対して最も耐性が高かった(図19)。全体として、これらのデータは、KRAB及びDNMT3Lを含む二重ETR組合せが、T細胞内のB2Mのサイレンシングにおいて、カノニカルな三重ETR組合せと同様に効率的に機能することを示している。

40

【0439】

これらの結果に基づいて、KRAB及びDNMT3Lを含む二重ETR組合せと、これ以降ZIM:dCas9:DNMT3L融合体と称する、ジンクフィンガーインプリンテド3 (ZIM3)タンパク質(Alerasool et al., Nat Methods (2020) 17(11):1093-6)のKRABドメインホモログ及びDNMT3Lを備えた一体化二分割ETR (図20A、左概略図)との間のB2Mエピサイレンシングの効率を比較した。この融合タンパク質のアミノ酸配列を以下に示す。ここでSV40核局在化シグナル(NLS)を枠内に、ZIM3 KRABリプレッサードメインを太字で、可撓性リンカーを下線と太字で、dCas9を下線で、DNMT3Lドメインをイタリ

50

ック(のみ)で示す。

【化 5 6】

MPKKKRKVGGGASMGRTVFEDVTVNFTQGEWQRLNPEQRNLYRDVMLENYSNLVSVGQGETTKPDVIL
 RLEQKKEFWLEEEVLGSGRAEKNGDIGGQIWPKPKDVKESLGGGGSGGGSGGGSGGGGSLDKKYS
 IGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTR
 RKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKL
 VDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKA
 ILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNL
 LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK
 YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
 HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVV
 DKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVD
 LLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILED
 IVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDQSGKTILDFLKSD
 GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVDELVKVMGRH
 KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDM
 YVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAK
 LITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITL
 KSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSE
 QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI
 VKKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKE
 LLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPS
 KYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKH
 DKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSTGLYETRIDLSQLG
 GDSMPKKKKRKVGVDGSGGGMAAIPALDPEAEPSMDVILVGSSELSSSVSGTGRDLIAYEVKANQRNIE
 DICICCGSLQVHTQHPLFEGGICAPCKDKFLDALFLYDDDGYSYCSICCSGETLLICGNPDCTRCYC
 FECVDLSLVGPGTSGKVVHMSNWVCYLCLPSSRSGLLQRRRKWRSQKAFYDRESENPLEMFETVPVWR
 RQPVRLSLFEDIKKELTSLGFLESGSDPGQLKHVVVDVTDTVRKDVEEWGPFDLVYGATPPLGHTCDR
 PPSWYLFQFHRLQLYARPKPGSPRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASRFELEMPVTIPDVHGGSLQNAVR
 VWSNIPAIRSRHWALVSEELSLLAQNKQSSKLAAKWPTKLVKNCFLPLREYFKYFSTELTSSL

(配列番号 4481)

【0440】

これらの実験において、T細胞に、ETRをコードするmRNAと、(i)二分割ETRが個別のgRNAのエピサイレンシング効率を回復することができるか否かを評価するために、gRNA F4又はC8、(ii)二重gRNA組合せC8+F4、又は(iii)最も良く機能する三重gRNA組合せF4+H8+H10とを共トランスフェクトした。次いで細胞を55日目までフローサイトメトリーによって解析した。ETRをコードする異なる量のmRNAの送達による交絡効果を避けるために、これらの実験は、二重組合せについて1.5 µgのそれぞれのETR、及び1.5 µgのZIM:dCas9:DNMT3L融合体を用いることによって実施した。したがって、一致する量の後成的エフェクターを用いた。本発明者らの以前のデータと一致して、個別のgRNAは二重ETR組合せでは効果がなく、ZIM:dCas9:DNMT3L融合体の採用は、gRNA C8についてのみ、B2Mのエピサイレンシング効率を僅かに増大させたのみであった(図20A、右のグラフ)。他方、二重gRNA組合せC8+F4について二重ETR組合せとZIM:dCas9:DNMT3L融合体を比較すると、B2Mのエピサイレンシングに顕著な増大が見出された(それぞれ11%から70%、図20A-B)。三重gRNA組合せF4+H8+H10についても同様の結果が得られたが、二重ETR組合せとZIM:dCas9:DNMT3L融合体との間の差異はあまり顕著でなかった(二重ETR組合せとZIM:dCas9:DNMT3L融合体についてB2M陰性細胞がそれぞれ86%及び95%、図20A-B)。この効果は、二重ETR組合せの既に高いエピサイレンシング効率によるものである。三重gRNA組合せの全ての条件について

、B2Mのエピサイレンシングは持続性があり、2ラウンドのT細胞再刺激に耐えた。ZIM:dCas9:DNMT3L融合体及び三重gRNA組合せで観察された、処理後8日でB2M陰性細胞が95%に達し、55日目まで安定なままである安定性は注目に値する。最後に、ZIM:dCas9:DNMT3L融合体のmRNAの用量が飽和であったか否かを評価するため、T細胞における用量力価測定実験を実施し、標準用量の3分の1(1対1.5 µg)がB2Mの効率的なエピサイレンシングを得るために既に十分であることを見出した(図21)。

【0441】

全体として、これらのデータは、融合タンパク質ZIM:dCas9:DNMT3Lの採用によってT細胞におけるエピサイレンシングが改善され、95%までのB2M陰性細胞が達成されることを示している。この融合タンパク質の興味ある特徴には、三重又は二重のETR組合せと比較した生産コストの低減及び二重ETR組合せの用量の3分の1の用量で効率的なサイレンシングを示すことができるという事実が含まれる。

【0442】

[実施例4]

相互染色体転座を誘起しないヒト初代T細胞におけるB2M及びTRACの直交編集

上記のデータに基づいて、Cas9系ETRと、B2Mに対する切り取られたgRNA及びTRACに対する完全長のgRNA(配列番号4575)との共送達で、相互染色体転座を惹起せずにヒト初代T細胞における直交編集(即ち、B2Mのエピサイレンシング及びTRAC遺伝子への標的一体化)を誘起できるか否かを試験した。B2Mのエピサイレンシングを媒介するため、上記の切り取られたgRNAのいくつか(図2~4を参照)、即ち切り取られたC8(C8_16;長さ16ntのスペーサー;gRNA 配列番号4578)、切り取られたF4(F4_16;長さ16ntのスペーサー;gRNA 配列番号4579)、及び切り取られたH8(H8_15;長さ15ntのスペーサー;gRNA 配列番号4577)を用い、これらを三重組合せとしてT細胞に共送達した。ここで全ての短縮化は完全長の配列の5'末端から開始している。これらの実験において、上で同定した切り詰められたETR組合せ/アーキテクチャー、即ちKRAB及びDNMT3Lを含む二重ETR、又はZIM3 KRABドメイン及びDNMT3Lを含む関連する一体化融合タンパク質も用いた。これらはいずれも、触媒的に活性なCas9を含むように改変した。ZIM3 KRAB、活性Cas9、及びDNMT3Lドメインを含む一体化融合体は以下のアミノ酸配列を有する。ここでSV40 NLSを枠内に、ZIM3 KRABリプレッサードメインを太字で、可撓性リンカーを下線と太字で、Cas9を下線で、DNMT3Lドメインをイタリック(のみ)で示す。

【化57-1】

MPKKKRKVGGGASMGRVTFEDVTVNFTQGEWQRLNPEQRNLYRDVMLENYSNLVSVGQGETTKPDVIL
RLEQGKEPWLEEEVLGSGRAEKNGDIGGQIWKPDKVKESLGGGGSGGGSGGGSGGGGSLEDKKYS
IGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTR
RKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLVESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKL
VDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKA
ILSARLSKSRLENLIAQLPGKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLL
LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK
YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEVV
DKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEFYTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVD
LLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILED
IVLTTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD
GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDLVKVMGRH

10

20

30

40

50

【化 5 7 - 2】

KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDM
 YVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAK
 LITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITL
 KSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIASE
 QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNI
 VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKE
 LLGITIMERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDIIKLPKYSLEFLENKRKMLASAGELQKGNELALPS
 KYVNFYLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH
 DKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKY FDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLG
 GDS PKKKRKV GVD SGSGGMAAIPALDPEAEPSMDVILVGSSELSSSVSPGTGRDLIAYEVKANQORNI
 DICICCGSLQVHTQHPLFEGGICAPCKDKFLDALFLYDDDGYSYCSICCSGETLLICGNPDCTRCYC
 FECVDSL VGPGTSGKVHAMSNNWCYLCLPSSRSGLLQRRRKWRSQ LKAFYDRESENPLEMFETVPVWR
 RQPVRLSLFEDIKKELTSLGFLSGSDPGQLKHVVVDVTDTVRKDVVEWGPFDLVYGATPPLGHTCDR
 PPSWYLFQFHRLQLYARPKPGSPRPFFWMFVDNLVLNKEDLDVASR FLEMEPV TPDVHGGSLQNAVR
 VWSNIPAIRSRHWALVSEELSLLAQNKQSSKLA AKWPTKL VKNCFLPLREYFKYFSTELTSSL
 (配列番号 4482)

10

【0 4 4 3】

TRAC 遺伝子座への Cas9 媒介標的一体化のため、TRAC 相同性アームの中に埋め込まれた、腫瘍抗原 NY-ESO に対するトランスジェニック TCR をコードする配列を含む、既

に開発された AAV6 系ドナーテンプレートを利用した (Roth et al., Nature (2018) 559(7714):405-9)。標的一体化に際して、トランスジェニック TCR は内因性 TRAC 遺

伝子座から発現され、特定のペンタマーを用いるフローサイトメトリーによって測定することが

できる (図 22)。二重 Cas9 系 ETR 組合せをトランスフェクトした T 細胞に関しては、この処置は予期しないことに B2M のエピサイレンシングをあったとしても殆どもたら

さなかった一方、TRAC の編集は極めて効率が良く、70% までの NY-ESO 陽性細胞及び 6

% までの内因性 TCR 破壊細胞がもたらされた (図 23)。注目すべきことに、ZIM3:Cas9:D

NMT3L 融合タンパク質の使用により B2M のエピサイレンシングが効率的に回復され、7

0% までの B2M 陰性 T 細胞がもたらされた (図 24)。これらの条件でまた、高レベルの TRA

C 遺伝子座の編集が測定された。NY-ESO 陽性 T 細胞のさらなる解析により、それらの 65

% も B2M 陰性であることが示された。TCR が破壊された細胞に焦点をあてた同様の解析

は、同様の共編集の効率を示した。処理後 34 日目の解析は、直交編集が T 細胞の再刺激

に耐えることを示した。

20

30

【0 4 4 4】

次いで、B2M と TRAC との間の相互染色体転座の存在を、PCR 解析によって評価した。注目すべきことに、相互転座の兆候は見出されず (図 25)、(i) B2M 遺伝子は遺伝子不活

化によるよりむしろ、後成的機構によってサイレンシングされたこと、及び (ii) 切り取ら

れた gRNA は Cas9 切断を無効化することが示され、B2M^{tdTomato} K-562 細胞系にお

ける本発明者らの以前の知見 (実施例 2 を参照) が確認された。これらのデータに反して、Ca

s9 系 ETR と B2M 及び TRAC の両方に対する完全長の gRNA を共トランスフェクトした T 細胞

は、高レベルの共編集及び相互染色体転座の明らかな兆候を呈した (図 25)。

40

【0 4 4 5】

全体として、これらのデータは、異なる長さの gRNA と Cas9 系 ETR をともに採用することにより、相互染色体転座を誘起せずに、ヒト初代 T 細胞において高い効率で直交編集 (即ちエピサイレンシング及び標的一体化又はエピサイレンシング及び遺伝子破壊) を促進

できることを示している。

【0 4 4 6】

[実施例 5]

ヒト初代 T リンパ球における TET2 及び TGFBR2 の高レベルのエピサイレンシングを媒介

50

するgRNAの同定

直交編集アプローチを3つ以上の遺伝子に拡張するため、TET2及びTGFR2を標的とするgRNAのパネルを設計した。これらの遺伝子の不活化は、腫瘍微小環境に起源する免疫減弱化シグナルからのT細胞産生物の持続性を増大するかそれらを保護する可能な治療アプローチを表す(例えばFraietta et al., Nature (2018) 558(7709):307-12; Nobles et al., J Clin Invest (2020) 130(2):673-85; Li et al., Nature (2020) 587(7832):121-5; Alishah et al., J Transl Med (2021) 19(1):482を参照)。これらの遺伝子のそれぞれについて、それらの転写開始部位付近の1Kbのゲノムウィンドウにおいて20個のgRNAを設計した(図26)。次いで、KRAB、DNMT3A、及びDNMT3Lエフェクタードメインを含む標準の三重ETR組合せを用い、T細胞において直接、これらのgRNAのエピサイレンシングの有効性の試験を立案した。連続的なgRNAをプールし、これらのペアのそれぞれを他と連結して、可能なペアの組合せがあればそれを得た。試験したペアを以下の表3に示す(SEQ:配列番号)。この実験に用いたgRNAは、20ヌクレオチド(完全長)のスペーサー配列を含んでいた。

【0447】

【表3B-1】

表3. TGFR2及びTET2 gRNAのペア

gRNA スペーサー ID	ペア 番号	gRNA 標的配列	標的配列 SEQ	スペーサー配列 SEQ	gRNA SEQ
TGFR2 gRNAs					
TG1	P1	TTCTTTAGGTCG AAGTCTAGAGG	4539	4553	4608

10

20

30

40

50

【表 3 B - 2】

gRNA スペーサー ID	ペア 番号	gRNA 標的配列	標的配列 SEQ	スペーサー配列 SEQ	gRNA SEQ
TG2		GTGCTCGCGACT CAATAGATTGG	4540	4554	4609
TG3	P2	AACGCATCTCTA AAGCACCTAGG	4541	4555	4610
TG4		CTGATCTACTAG GGAAAACGTGG	4542	4556	4611
TG5	P3	TTGAGTAAATAC TTGGAGCGAGG	4543	4557	4612
TG6		AGTCGGCCAAAG CTCTCGGAGGG	1239	2940	4613
TG7	P4	GAAACTCCTCGC CAACAGCTGGG	1236	2937	4614
TG8		GAGTGAGTCACT CGCGCGCACGG	1229	2930	4615
TG9	P5	CGCGTGCACCCG CTCGGGACAGG	1254	2955	4616
TG10		GGGGCCTCCCCG CGCCTCGCCGG	4544	4558	4617
TG11	P6	TGGCGAGCGGGC GCCACATCTGG	1256	2957	4618
TG12		TCGGTCTATGAC GAGCAGCGGGG	1228	2929	4619
TG13	P7	CCTGAGCAGCCC CCGACCCATGG	4545	4559	4620
TG14		GGACGATGTGCA GCGGCCACAGG	1244	2945	4621
TG15	P8	TGCTGGCGATAC GCGTCCACAGG	1230	2931	4622
TG16		AACGTGCGGTGG GATCGTGCTGG	1241	2942	4623
TG17	P9	GACTGTCAAGCG CAGCGGAGAGG	1238	2939	4624
TG18		CTTTCCTCGTTT CCGCCCGGGG	1234	2935	4625
TG19	P10	GCCCGACTCCCG TAGCTGCAGGG	1237	2938	4626
TG20		CGTTGTGTTGGC CGCGTTCGAGG	1231	2932	4627
TET2 gRNAs					
TE1	P1	GGAATTAGCTCT GTATCGGTCGG	4547	4560	4588
TE2		AAAGTAAGGGCT CTTACGAGAGG	4548	4561	4589
TE3	P2	GGCGTCTCACAG ATTGAAATAGG	4549	4562	4590
TE4		CGGTCAATTTCC CAGTTTGTCGG	4550	4563	4591

10

20

30

40

50

【表 3 B - 3】

gRNA スパーサー ID	ペア 番号	gRNA 標的配列	標的配列 SEQ	スパーサー配列 SEQ	gRNA SEQ
TE5	P3	AGCGCTCCCCTG TTTCACCGAGG	2742	4443	4592
TE6		CGCGGGCAACGG GATCTAAAGGG	2733	4434	4593
TE7	P4	CGCAAGCGGAGG TGTGGTGCGGG	2765	4466	4594
TE8		GTGCGGGTACAC TCCGGAGGAGG	2737	4438	4595
TE9	P5	TGCGCGGGACCT CGAAGTGGTGG	2728	4429	4596
TE10		AGCAGAGCAAGC GCGAAGGTGG	2768	4469	4597
TE11	P6	TGCAGCCCTCGG GAACCCCGGGG	4551	4564	4598
TE12		GTGGTGCGCCCG GACCAGCGCGG	2748	4449	4599
TE13	P7	TCACGCCGTGCA GTGGCGCGGGG	2732	4433	4600
TE14		GGTGCCGCGGGC CTTTGTGCTGG	2741	4442	4601
TE15	P8	GCACCGGGCGTC CAGCACAAAGG	2729	4430	4602
TE16		AGGGAATTAGCC CCCCGCACCGG	2730	4431	4603
TE17	P9	AGTGGCAGCGGC GAGAGCTTGGG	2773	4474	4604
TE18		ACTTGCGATGCGA GCGGGACCCGG	2731	4432	4605
TE19	P10	ACTCAGCGGGGC CGGCGTCTCGG	4552	4565	4606
TE20		CCTTATGAATAT TGATGCGGAGG	2777	4478	4607

【 0 4 4 8 】

次いで、これらの新たなプールを、三重ETR組合せをコードするmRNAとともに、個別にT細胞に送達した。2つの遺伝子は低レベルで発現し、フローサイトメトリーによるそれらのタンパク質産生物の検出は、TET2の核局在化及びTGFB2の誘起性によって複雑になった。即ち、エピサイレンシングの効率を定量するため、デジタル液滴PCR (ddPCR)、即ち選択した遺伝子の発現プロファイルを高い感度で測定するための手法を用いた。最後に、処理後28日目に細胞を解析した。図27に、偽処理細胞におけるTGFB2の発現レベルに正規化したそれぞれのペアの組合せについてのTGFB2のエピサイレンシングのパーセンテージを示す。この解析は、ほぼ全てのペアの組合せが高い効率(60%以上)でTGFB2のエピサイレンシングを誘起できることを示している。他方、TET2について実施した同様の解析は、この遺伝子のエピサイレンシングがより変動しやすく、いくつかのペアの組合せが活性を呈しなかった一方、他は高度に有効であったことを示した(図28)。これに関して、ペア番号7 (P7)又は番号10 (P10)を含む組合せが最も有効な組合せであり、ともに組み合わせた場合に92%までのTET2の低減をもたらした。

【0449】

これらの遺伝子のそれぞれをサイレンシングするために必要なgRNAの数を2まで低減させることを目的として、選択したgRNAペアのエピサイレンシング効率を評価した。これに関し、TGFB2についてペア番号4 (gRNA ID: TG7_20及びTG8_20)及び10 (gRNA ID: TG19_20及びTG20_20)、並びにTET2についてペア番号7 (gRNA: TE13_20及びTE14_20)及び10 (gRNA: TE19_20及びTE20_20)を選択した。これらのペアを三重ETR組合せとともに個別に共送達し、続いて処理後22日目に行なったddPCRによる解析により、ペア番号4及び番号10がそれぞれTGFB2及びTET2のエピサイレンシングの促進において最も効果的であり、2つの転写物の35%及び90%までの低減がもたらされることが示された(図29)。注目すべきことに、それについてペアの組合せが89%の低減をもたらしたTGFB2とは一致せずに、TET2についてはペア番号10のエピサイレンシング効率は、親のペア組合せを送達したときに観察された効率と同程度であった。全体として、これらのデータは、TET2及びTGFB2がETR技術によって効率的にサイレンシングできることを示している。

10

【0450】

次いで、B2M、TET2、及びTGFB2の多重化後成的サイレンシングを試験した。この目的のため、ヒト初代T細胞を、(i)ETR ZIM3:dCas9:DNMT3L融合体をコードするmRNA、(ii)B2Mに対する完全長のgRNAのF4+H8+H10組合せ(即ち、gRNA ID: F4_20、H8_20、及びH10_20)、(iii)TET2に対する完全長gRNAのペア番号10、(iv)TGFB2に対する完全長のgRNAのペア番号4及び10の組合せと共処理した。次いで、これらの遺伝子の発現レベルをddPCRによって測定し、これらが全て顕著に下方制御され、B2M、TET2、及びTGFB2のそれぞれ47%、92%、及び67%までのエピサイレンシングをもたらすことを見出した(図30)。全体として、これらのデータは、B2M、TET2、及びTGFB2がETR技術によって共サイレンシングできることを示している。

20

【0451】

[実施例6]

ヒト初代Tリンパ球における相互染色体転座を惹起しないETMによる多重遺伝子の多機能直交編集

本発明者らは、B2M及びTRACの直交編集と、TGFB2又はTET2のエピサイレンシングとを組み合わせることを決定した。この目的のため、最初に図30のTET2及びTGFB2に対するgRNAを長さ15ntだけ短縮化した。切り取られたスペーサーを有するgRNAを下表に示す。次いで、ヒト初代T細胞に、ETM ZIM3:Cas9:DNMT3L融合体をコードするmRNAを、(i)B2Mに対する切り取られたgRNA、即ちF4 (gRNA ID: F4_16;長さ16ntのスペーサー; gRNA 配列番号4579)、H8 (H8_15;長さ15ntのスペーサー; gRNA 配列番号4577)、及びH10 (H10_14;長さ14ntのスペーサー; gRNA:配列番号4576)、(ii)TRACに対する完全長のgRNA(配列番号4575)、(iii)TET2についてペア番号10 (TE19_15及びTE 20_15)又はTGFB2についてペア番号4 (TG7_15及びTG8_15)及び10 (TG19_15及びTG20_15)に対応する切り取られたgRNAとともにトランスフェクトした。NY-ESO TCRをTRAC遺伝子座の中に標的一体化するために、細胞にAAV6ドナーテンプレートを形質導入し、又はしなかった。処理したT細胞を、(i)B2Mの後成的サイレンシング及びTRACの遺伝子編集(即ち、AAV6ドナーの非存在又は存在によるNY-ESO TCRの破壊又は標的一体化)を測定するためのフローサイトメトリー及び(ii)TET2及びTGFB2の発現レベルを定量するためのddPCRによって解析した。

30

40

【0452】

【表 4】

表4. 切断されたTGFB2R2 及びTET2 gRNAのペア

gRNA スペーサー ID	ペア番号	gRNA ID	gRNA SEQ
TGFR2 gRNAs			
TG7	P4	TG7_15	4584
TG8		TG8_15	4585
TG19	P10	TG19_15	4586
TG20		TG20_15	4587
TET2 gRNAs			
TE19	P10	TE19_15	4582
TE20		TE20_15	4583

10

【0453】

AAV6ドナーを用いないB2M、TRAC、及びTGFB2R2の多機能編集の実験条件に関して、ZIM3:Cas9:DNMT3LはB2M及び内因性TCRについて陰性のそれぞれ11%及び95%までの細胞を誘起できることが、解析によって示された(図31)。バルク処理した細胞のddPCR解析により、TGFB2R2の発現レベルはこれらの試料で顕著に低減し、50%までのエピサイレンシングがもたらされることが示された(図31)。AAV6ドナーで処理した試料に関しては、処理したT細胞の16%までがB2Mについて陰性であった一方、59%及び26.7%がそれぞれ内因性TCRについて陰性、NY-ESOについて陽性となったことが見出された(図32)。これらの細胞において、TGFB2R2のエピサイレンシング効率は54%であった(図32)。重要なことに、処理したT細胞の分子解析より、AAV6ドナーを形質導入した場合もしない場合も、3つの標的遺伝子の間で相互染色体転座の兆候は何ら示されなかった(図33)。この後者のデータとは一致せずに、ZIM3:Cas9:DNMT3L及び検討した遺伝子に対する完全長のgRNAを用いて実施した実験では、B2M、TRAC、及びTGFB2R2の間の相互染色体転座の明らかな証拠が示された(図33)。

20

30

【0454】

AAV6ドナーを用いないB2M、TRAC、及びTET2の多機能編集の実験条件に関して、ZIM3:Cas9:DNMT3LはB2M及び内因性TCRについて陰性のそれぞれ46%及び99%までの細胞を誘起できることが、解析によって示された(図34)。バルク処理した細胞のddPCR解析により、TET2の発現レベルはこれらの試料で顕著に低減し、63%までのエピサイレンシングがもたらされることが示された(図34)。AAV6ドナーで処理した試料に関しては、処理したT細胞の40%までがB2Mについて陰性であった一方、53%及び29%がそれぞれ内因性TCRについて陰性、NY-ESOについて陽性となったことが見出された(図35)。これらの細胞において、TET2のエピサイレンシング効率は60%であった(図35)。重要なことに、処理したT細胞の分子解析より、AAV6ドナーを形質導入した場合もしない場合も、3つの標的遺伝子の間で相互染色体転座の兆候は何ら示されなかった(図36)。この後者のデータとは一致せずに、ZIM3:Cas9:DNMT3L及び検討した遺伝子に対する完全長のgRNAを用いて実施した実験では、B2M、TRAC、及びTET2の間の数多くの相互染色体転座の明らかな証拠が示された(図36)。

40

【0455】

最後に、AAV6ドナーあり又はなしで、ZIM3:Cas9:DNMT3Lを用いてB2M、TRAC、TGFB2R2、及びTET2の四重多機能編集を試験した。この実験では、B2M、TGFB2R2、及びTET2については切り取られたgRNA、TRACについては完全長のgRNAを用いた

50

。AAV6ドナーを用いない条件では、処理した細胞の5.7%及び93%までが、それぞれB2M及び内因性TCRについて陰性であることが証明された(図37)。これらの細胞のddPCR解析により、TGFR2及びTET2の転写物が偽処理試料と比較して顕著に低減し、それぞれ70%及び71%までのエピサイレンシングがもたらされたことが示された(図37)。AAV6ドナーで処理した試料に関しては、処理したT細胞の7%までがB2Mについて陰性であった一方、54%及び26%がそれぞれ内因性TCRについて陰性、NY-ESOについて陽性となったことが見出された(図38)。これらの細胞において、TGFR2及びTET2のエピサイレンシング効率はそれぞれ50%及び51%であった(図38)。重要なことに、処理したT細胞の分子解析より、AAV6ドナーを形質導入した場合もしない場合も、3つの標的遺伝子の間で相互染色体転座の兆候は何ら示されなかった(図39)。この後者のデータとは一致せずに、ZIM3:Cas9:DNMT3L及び検討した遺伝子に対する完全長のgRNAを用いて実施した実験では、B2M、TRAC、及びTET2の間の数多くの相互染色体転座の明らかな証拠が示された(図39)。

10

【0456】

全体として、これらのデータは、切り取られた及び完全長のgRNAを伴うCas9系ETR(EMT)が、相互染色体転座を誘起せずに、T細胞における多重直交編集を実施できることを示している。

【0457】

後成的サイレンシングによってサイレンシングできるさらなる標的には、例えばA2AR、CISH、PTPN11、PTPN6、PTPA、PTPN2、JUNB、TOX、TOX2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、MAP4K1、REL、IRF4、DGKA、PIK3CD、HLA-A、USP16、DCK、及びFASが含まれる。

20

【0458】

これらの標的の後成的サイレンシングは、CpGアイランド(CGI)を有しないTRAC、PD-1、及びCTLA4遺伝子の遺伝子編集と組み合わせる。

【0459】

細胞培養条件

末梢血単核細胞(PBMC)は、Ficoll勾配(Lymphoprep(商標))上の遠心分離を用いて健常ドナーから新たに単離した。次いでCD3陽性リンパ球を、Pan T細胞単離キット(Miltenyi Biotech)を用いてメーカーの説明書に従い、磁気分離によって精製した。Tリンパ球の純度は、フローサイトメトリー(FACSCanto(商標)II-BD Bioscience, Cytoplex-Beckman Coulter)により、抗CD3 (BD, 349201)、CD4 (Biolegend, 317429)、及びCD8 (Biolegend, 344708)抗体を用いて評価した。Tリンパ球は抗CD3/CD28磁性ビーズ(DynabeadsヒトT-アクチベーター CD3/CD28, Thermo Fisher)を用いて1:1の比で刺激し、ペニシリン(100IU/ml)、ストレプトマイシン(100µg/ml)、2%のグルタミン、10%のFBS (Euroclone)、及びそれぞれ5ng/mlのIL-7及びIL-15 (PeproTech)を添加したRPMI (Corning)中の培養で維持した。K-562^{dTomato}レポーター細胞系は既に記載されており(Amabile et al., 上掲)、ペニシリン(100IU/ml)、ストレプトマイシン(100µg/ml)、2%のグルタミン、及び10%のFBSを添加したRPMI中の培養で維持した。全ての細胞は、5% CO₂の加湿雰囲気中、37°Cで培養した。

30

40

【0460】

mRNA、gRNA、及びドナーテンプレート

これらの研究において用いたgRNAは、CHOPCHOP (Labun et al., Nucleic Acid Res. (2019) 47(W1):W171-4)を用いて設計した。T細胞の実験については、以前に記載された2'-O-メチル残基及びホスホロチオエート改変を含む高度に化学改変されたgRNA(Finn et al., Cell Rep (2018) 22(9):2227-35)をIDTから購入した。ETR、Cas9系ETR、及びCas9をコードするmRNAは、TriLinkから購入するか、MEGAscript(商標)T7転写キット(Invitrogen)を用い、メーカーの説明書に従って施設内で産生した。いずれの場合にも、mRNAはCleanCap(登録商標)試薬(TriLink)を用いて5'キャッピングし、UTPは、N1-メチルプソイドウリジン-5'-トリホスフェート(TriLink)に

50

よって完全に置換した。施設内で産生したmRNAはまた、Amicon(登録商標)Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Sigma-Aldrich)を用いて濃縮した。TRAC遺伝子座についての相同性アームを有する構築物、IG4 NY-ESO TCRアルファ/ベータは、Addgene(プラスミド#112021)によって入手し、AAV2逆転ターミナルリピートを含むAAV転移構築物の中にクローニングした。AAV6は、三重トランスフェクション法によるTIGEM Vector Coreによって産生し、超遠心によって精製した。K-562^{dTomato}実験については、完全長又は短縮化されたgRNAをヒトU6プロモーターの下流にtracrRNA (Amabile et al., 上掲)との融合転写物としてクローニングした。ETR、Cas9系ETR、及びCas9の配列は、CMVプロモーターの制御下に発現プラスミドの中にクローニングした(Amabile et al., 上掲)。

10

【0461】

遺伝子編集手順

T細胞は、精製の2日後に編集した。電気穿孔の前にDynabeadsを除去した。Lonza 4D-Nucleofector(商標)(P3 Primary Cell溶液、EO-115プログラム)を用いて、 5×10^5 個の細胞を、それぞれのETR/Cas9-ETR/Cas9について1.5 μ g(他に特定しなければ)の安定化されたmRNA及び3 μ gのそれぞれ高度に改変されたgRNAとともに電気穿孔した。ヌクレオフェクションの直後に、80 μ lのRMPIをキュベットに直接加え、細胞を37°Cで15分、インキュベートした。次いで細胞を96-U底ウェルに移し、100 μ lの完全2×培地(20%のFBS、4mMのL-グルタミン、2%のP/S、及びそれぞれ10ng/mlのIL-7及びIL-15を含むRPMI)を加えた。遺伝子標的実験では、AAV6 NY-ESO TCRも 10^5 vg/細胞の用量で2×培地に加えた。B2M陰性細胞のパーセンテージは、抗B2M抗体(Biolegend, 316312)を用いるフローサイトメトリーによって評価し、NY-ESO/TCR陽性事象は、抗V β 13.1抗体(Beckman Coulter)又は抗ヒトTCRアルファ/ベータ抗体(Biolegend)を用いることによって評価した。完全新鮮培地を3日ごとに培養液に添加した。K-562^{dTomato}の実験については、Lonza 4D-Nucleofector(商標)(SF Cell Line solution, FF-120プログラム)を用いて、 5×10^5 個の細胞を、それぞれ600ngのETR/Cas9-ETR/Cas9プラスミド及び200ngのgRNAプラスミドとともに電気穿孔した。ヌクレオフェクションの直後に、細胞を完全RPMI中、96-U底ウェルに播種した。dTomato陰性細胞をフローサイトメトリーによって解析した。フローサイトメトリー解析はFlow Joソフトウェア(FLOWJO, LLC)を用いて実施した。

20

30

【0462】

分子解析

細胞系からのゲノムDNAは、 2×10^6 細胞未満からなる試料についてMaxwell 16 LEV Blood DNAキット(Promega)を用いて抽出した。 5×10^5 細胞未満からのDNAは、QuickExtract(商標)DNA Extraction Solution (Epicentre)を用いて抽出した。遺伝子インデルは、Surveyorヌクレアーゼアッセイ(Surveyor Mutation Kit, IDT)を用い、メーカーの説明書に従って検出した。B2M遺伝子座における変異を測定するために、以下のプライマーを用いた。

【0463】

【表5-1】

40

表5. 変異の測定のためのB2Mプライマー

説明	配列	配列番号
B2M (F4, C8) フォワード	TACAGACAGCAAACCTCACCCAGTC	4527

50

【表 5 - 2】

B2M (F4, C8) リバース	AGAACTTGGAGAAGGGAAGTCACG	4528
B2M (H8) フォワード	ATCTTCTGGGTTTCCGTTTTCT	4529
B2M (H8) リバース	TCTCGTGATGTTTAAGAAGGCA	4530
B2M (H10) フォワード	CGTGAGTCTCTCCTACCCCTCC	4531
B2M (H10) リバース	TTATCGACGCCCTAAACTTTGT	4532

他の目的の遺伝子座における変異を測定するために、以下のプライマーを用いた。

【0 4 6 4】

10

【表 6】

表6. 他の遺伝子座における変異の測定のためのプライマー

説明	配列	配列番号
TRAC フォワード	CCGTATAAAGCATGAGACCGTG	4533
TRAC リバース	ATTCCTGAAGCAAGGAAACAGC	4534
TGFR2 フォワード	TCGGTCTATGACGAGCAGC	4535
TGFR2 リバース	GAAACTTTCCTCGTTTCCGC	4536
TET2 フォワード	AACAAGGCAGTGCTAATGCCT	4537
TET2 リバース	GCTTTGGAGGCAGCTCAGAG	4538

20

【0 4 6 5】

転座解析は、実験に採用したgRNAに従って上で列挙したフォワードプライマー及びリバースプライマーを組み合わせるGoTaq(登録商標)DNA Polymerase (Promega)を用いて実施した。アンプリコンは1%アガロースゲル上で泳動した。目的のゲノム転座を検出するために以下のプライマーを用いた。

【0 4 6 6】

【表 7】

表7. ゲノム転座の検出のためのプライマー

説明	配列	配列番号
B2M フォワード	TACAGACAGCAAACCTCACCCAGTC	4629
B2M リバース	ACAAAGTTTAGGGCGTCGATAA	4630
TRAC フォワード	CCGTATAAAGCATGAGACCGTG	4631
TRAC リバース	ATTCCTGAAGCAAGGAAACAGC	4632
TGFR2 フォワード	CACGTTTCAAGTCGGGTGAGT	4633
TGFR2 リバース	TCCAGGAGCTAAGGACTGAGGA	4634
TET2 フォワード	TAATTCCCTGGGAGCCGGGG	4635
TET2 リバース	TTGCTCCCCAGTCCCTGGAA	4636

30

40

【0 4 6 7】

遺伝子発現解析のため、RNeasy Miniキット(QIAGEN)を用いて 10^6 個の細胞から全RNAを抽出し、SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen)のメーカーの説明書に従い、ランダムヘキサマーを用いて逆転写した。転写物のレベルは、0.2~10ngのテンプレートcDNAを用いるデジタル液滴PCRによって決定した。PCR反応は、メーカーの説明書(Biorad)に従って1×TaqMan Gene Expressionアッセイ(Applied Biosystems)を加えることによって行ない、QX200リーダーによって読み取り、QuantaSoftソフトウェア(Biorad)によって解析した。データは、HPRT及び偽処理試料によって正規化した。用いた試薬を以下に列挙する。

50

【 0 4 6 8 】

【 表 8 A 】

<i>B2M</i>	Hs00187842_m1
<i>TGFBR2</i>	Hs00234253_m1
<i>TET2</i>	Hs00325999_m1
<i>HPRT</i>	Hs02800695_m1

【 0 4 6 9 】

配列表

10

本開示で開示した配列を以下に列挙する。

【 0 4 7 0 】

20

30

40

50

【表 8 B - 1】

表 8. 配列の説明

配列番号	説明
1	ZNF10 KRAB ドメイン
2	ZIM3 KRAB ドメイン
3	ZNF350 KRAB ドメイン
4	ZNF197 KRAB ドメイン
5	RBAK KRAB ドメイン
6	ZKSCAN1 KRAB ドメイン
7	KRBOX4 KRAB ドメイン
8	ZNF274 KRAB ドメイン
9	DNMT3A 触媒ドメイン
10	DNMT3B 触媒ドメイン
11	DNMT3B
12	DNMT1 触媒ドメイン
13	DNMT3L
14	SETDB1
15	SETDB1 触媒ドメイン
16	Cas9 (触媒的に活性)
17	dCas9
18	例示的な ETM-KRAB
19	例示的な ETM-DNMT3A
20	例示的な ETM-DNMT3L
21	例示的な B2M 標的配列、センス鎖
22	例示的な B2M 標的配列、アンチセンス鎖
23-45	B2M gRNA スペーサー 24: F4 25-34: 5'末端から(それぞれ 19-10 nt 配列) 短縮化された F4 35: C8 36-45: 5'末端から(それぞれ 19-10 nt 配列) 短縮化された C8
46	TRAC gRNA スペーサー
47-96	TRAC 標的配列
97-146	TRBC1 標的配列
147-196	TRBC2 標的配列
197-246	PDCD1 標的配列
247-296	TIM-3/HAVCR2 標的配列
297-346	TIGIT 標的配列
347-396	LAG3 標的配列
397-446	CTLA4 標的配列
447-511	AAVS1 標的配列
512-561	CCR5 標的配列
562-611	TRAC gRNA スペーサー

10

20

30

40

50

【表 8 B - 2】

612-661	TRBC1 gRNA スペーサー
662-711	TRBC2 gRNA スペーサー
712-761	PDCD1 gRNA スペーサー
762-811	TIM-3/HAVCR2 gRNA スペーサー
812-861	TIGIT gRNA スペーサー
862-911	LAG3 gRNA スペーサー
912-961	CTLA4 gRNA スペーサー
962-1026	AAVS1 gRNA スペーサー
1027-1076	CCR5 gRNA スペーサー
1077-1177	B2M 標的配列
1178-1227	HLA-A 標的配列
1228-1277	TGFBR2 標的配列
1278-1377	A2AR 標的配列
1378-1427	FAS 標的配列
1428-1477	DCK 標的配列
1478-1527	DGKA 標的配列
1528-1577	USP16 標的配列
1578-1627	PTPN11 標的配列
1628-1677	PTPN6 標的配列
1678-1727	PTPA 標的配列
1728-1777	PTPN2 標的配列
1778-1827	CISH 標的配列
1828-1927	PI3KCD.1 標的配列
1928-1977	MAP4K1 標的配列
1978-2027	NR4A1 標的配列
2028-2127	NR4A2 標的配列
2128-2277	NR4A3 標的配列
2278-2377	JUNB 標的配列
2378-2427	REL 標的配列
2428-2527	TOX 標的配列
2528-2627	TOX2 標的配列
2628-2727	IRF4 標的配列
2728-2777	TET2 標的配列
2778-2878	B2M gRNA スペーサー 2778: H11 2780: H8 2801: H12 2813: C8 2863: H10 2878: F4
2879-2928	HLA-A gRNA スペーサー
2929-2978	TGFBR2 gRNA スペーサー
2979-3078	A2AR gRNA スペーサー
3079-3128	FAS gRNA スペーサー

10

20

30

40

50

【表 8 B - 3】

3129-3178	DCK gRNA スペーサー
3179-3228	DGKA gRNA スペーサー
3229-3278	USP16 gRNA スペーサー
3279-3328	PTPN11 gRNA スペーサー
3329-3378	PTPN6 gRNA スペーサー
3379-3428	PTPA gRNA スペーサー
3429-3478	PTPN2 gRNA スペーサー
3479-3528	CISH gRNA スペーサー
3529-3628	PI3KCD.1 gRNA スペーサー
3629-3678	MAP4K1 gRNA スペーサー
3679-3728	NR4A1 gRNA スペーサー
3729-3828	NR4A2 gRNA スペーサー
3829-3978	NR4A3 gRNA スペーサー
3979-4078	JUNB gRNA スペーサー
4079-4128	REL gRNA スペーサー
4129-4228	TOX gRNA スペーサー
4229-4328	TOX2 gRNA スペーサー
4329-4428	IRF4 gRNA スペーサー
4429-4478	TET2 gRNA スペーサー
4479	後成的編集のために設計された B2M gRNA の例 (配列番号 24 のスペーサーを含む)
4480	後成的編集のために設計された B2M gRNA の例 (配列番号 35 のスペーサーを含む)
4481	ZIM:dCas9:DNMT3L
4482	ZIM:Cas9:DNMT3L
4483	後成的編集のために設計された B2M gRNA の例 (配列番号 2780 のスペーサーを含む)
4484-4493	5'末端から(それぞれ 19-10 nt 配列) 短縮化された H8
4494	後成的編集のために設計された B2M gRNA の例 (配列番号 2863 のスペーサーを含む)
4495-4504	5'末端から(それぞれ 19-10 nt 配列) 短縮化された H10
4505	後成的編集のために設計された B2M gRNA の例 (配列番号 2778 のスペーサーを含む)
4506-4515	5'末端から(それぞれ 19-10 nt 配列) 短縮化された H11
4516	後成的編集のために設計された B2M gRNA の例 (配列番号 2801 のスペーサーを含む)
4517-4526	5'末端から(それぞれ 19-10 nt 配列) 短縮化された H12
4527	B2M (F4, C8) フォワードプライマー
4528	B2M (F4, C8) リバースプライマー
4529	B2M (H8) フォワードプライマー
4530	B2M (H8) リバースプライマー
4531	B2M (H10) フォワードプライマー
4532	B2M (H10) リバースプライマー
4533	TRAC フォワードプライマー

10

20

30

40

50

【表 8 B - 4】

4534	TRAC リバースプライマー
4535	TGFR2 フォワードプライマー
4536	TGFR2 リバースプライマー
4537	TET2 フォワードプライマー
4538	TET2 リバースプライマー
4539-4545	TGFR2 標的配列
4546-4552	TET2 標的配列
4553-4559	TGFR2 gRNA スペーサー
4560-4565	TET2 gRNA スペーサー
4566-4567	tracr 配列の例
4568-4573	B2M gRNA の例 (それぞれ配列番号 24、35、2780、2863、2778、及び 2801 のスペーサーを含む)
4574-4575	TRAC を標的とする例示的な gRNA
4576-4579	B2M を標的とする例示的な完全長の改変 gRNA
4580-4583	TET2 を標的とする例示的な短縮化された改変 gRNA
4584-4587	TGFR2 を標的とする例示的な短縮化された改変 gRNA
4588-4607	TET2 を標的とする例示的な完全長の改変 gRNA
4608-4627	TGFR2 を標的とする例示的な完全長の改変 gRNA
4628	GFP を標的とする例示的な完全長の改変 gRNA
4629	転座の評価のための B2M フォワードプライマー
4630	転座の評価のための B2M リバースプライマー
4631	転座の評価のための TRAC フォワードプライマー
4632	転座の評価のための TRAC リバースプライマー
4633	転座の評価のための TGFR2 フォワードプライマー
4634	転座の評価のための TGFR2 リバースプライマー
4635	転座の評価のための TET2 フォワードプライマー
4636	転座の評価のための TET2 リバースプライマー
4637	代替の ZIM3 KRAB ドメイン
4638	例示的な化学改変された gRNA

10

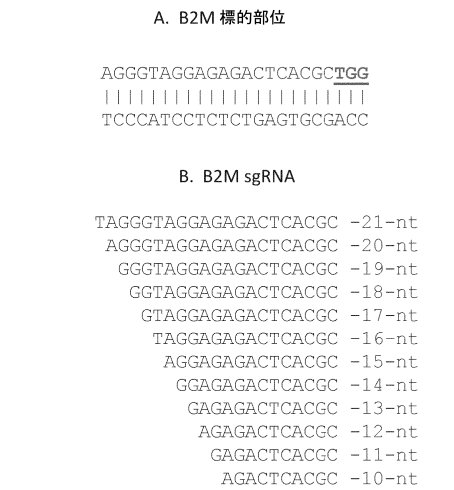
20

30

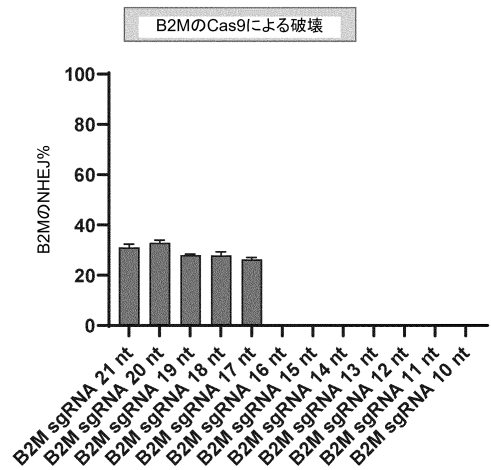
40

50

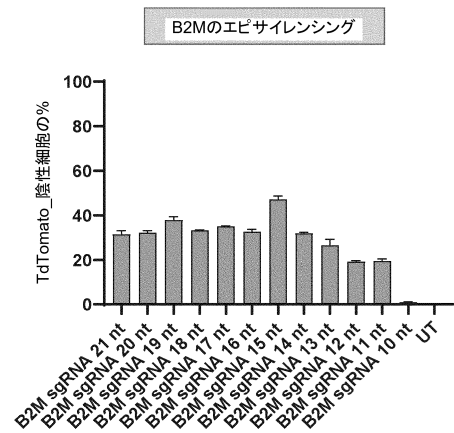
【図面】
【図 1】



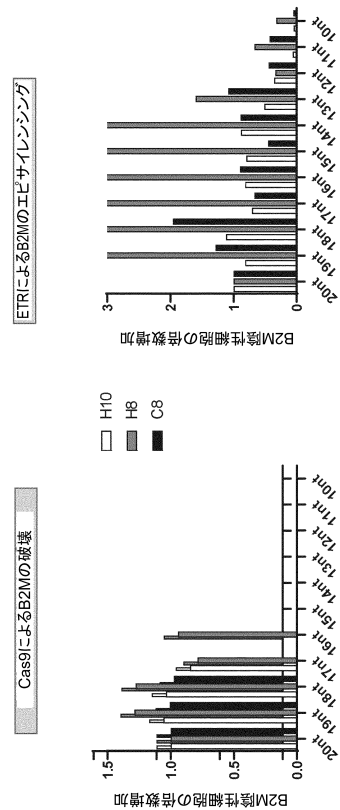
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

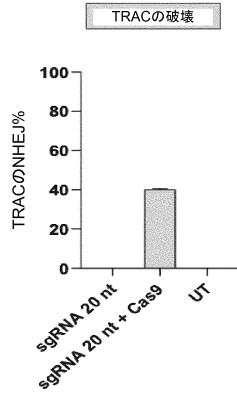
20

30

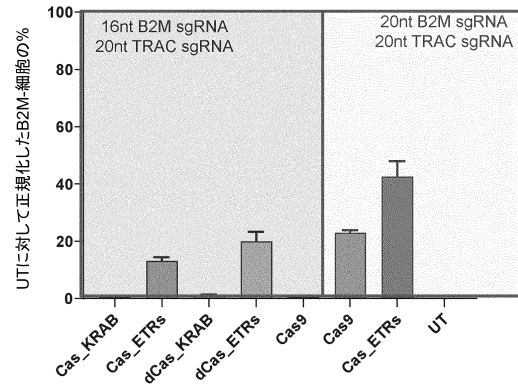
40

50

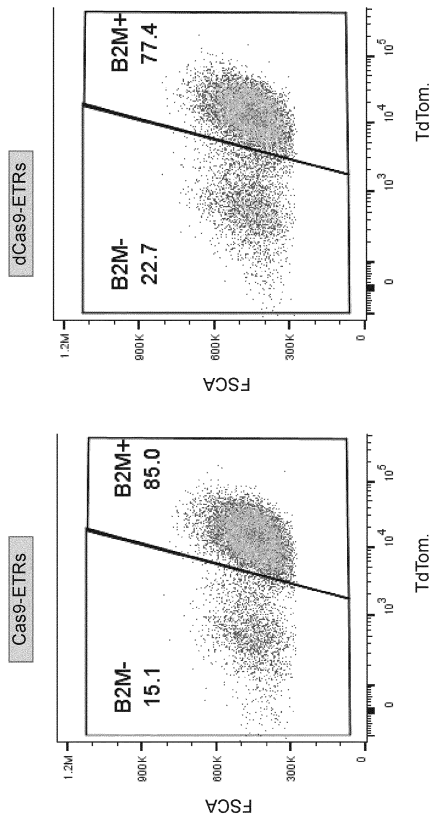
【図 5】



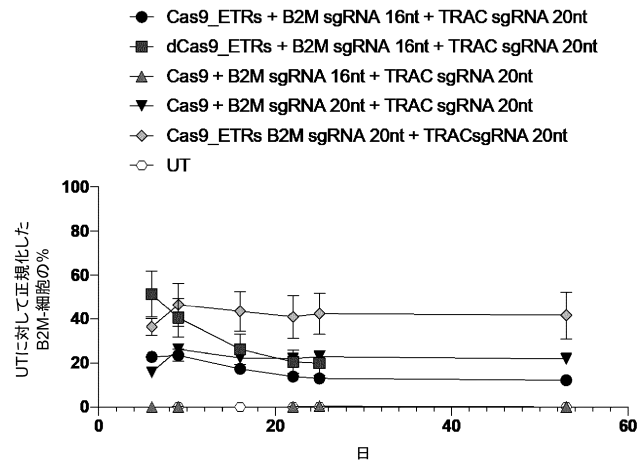
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

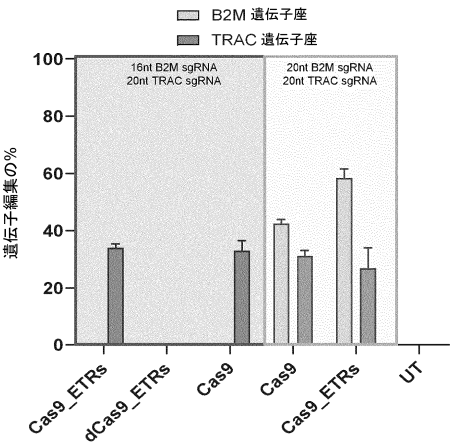
20

30

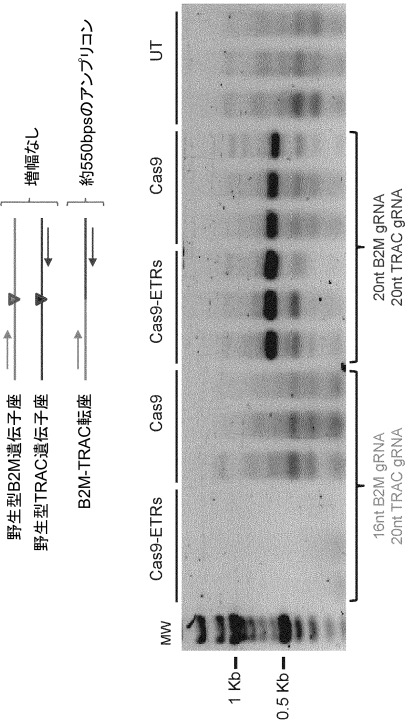
40

50

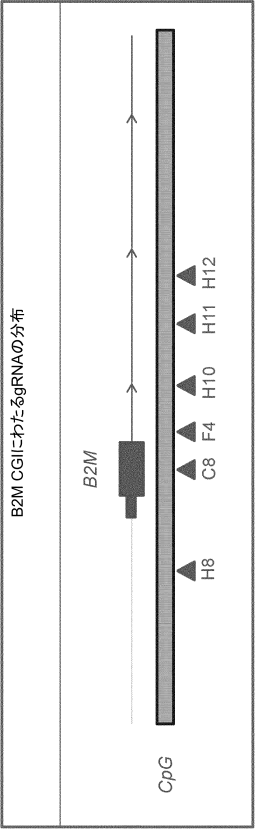
【図 9】



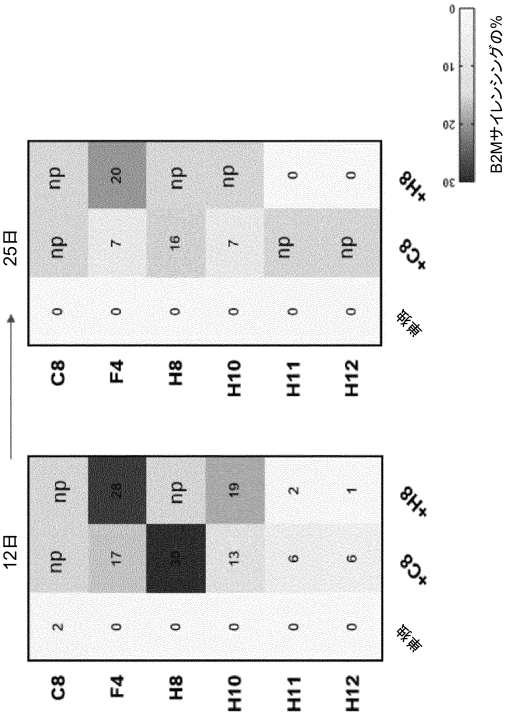
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

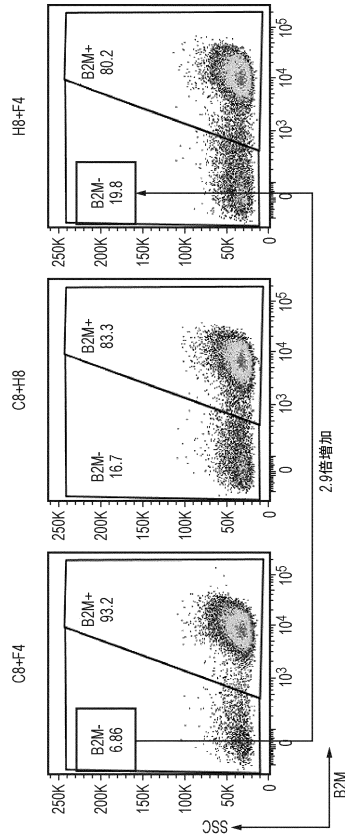
20

30

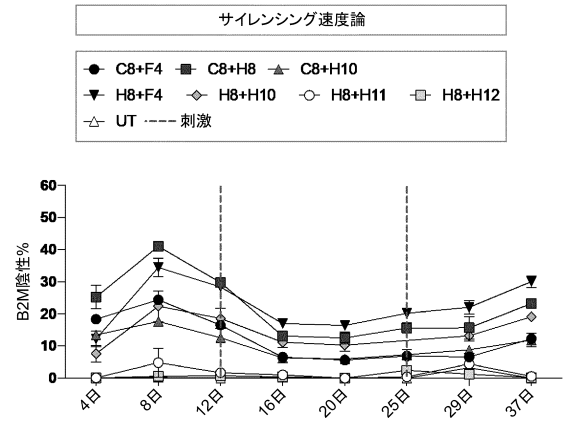
40

50

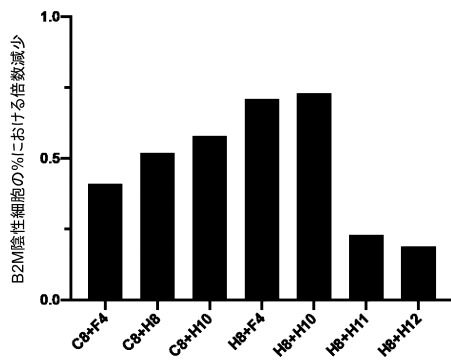
【図 1 3】



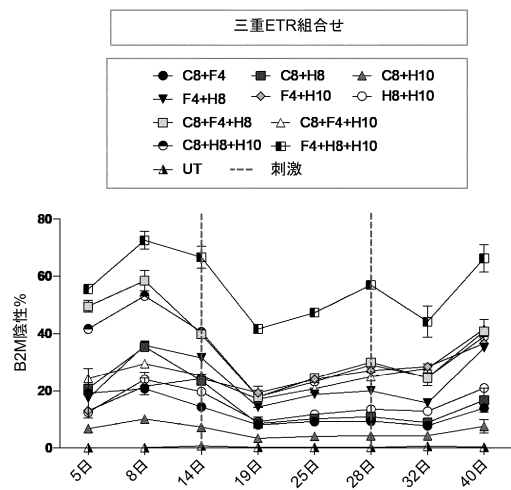
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

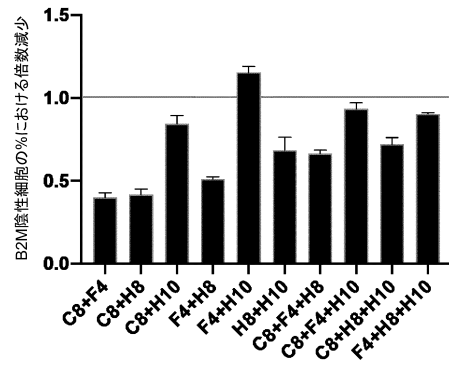
20

30

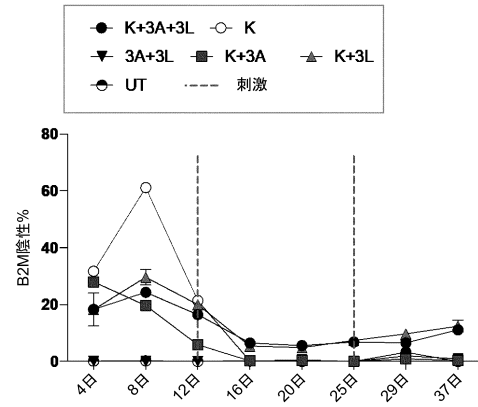
40

50

【図 17】

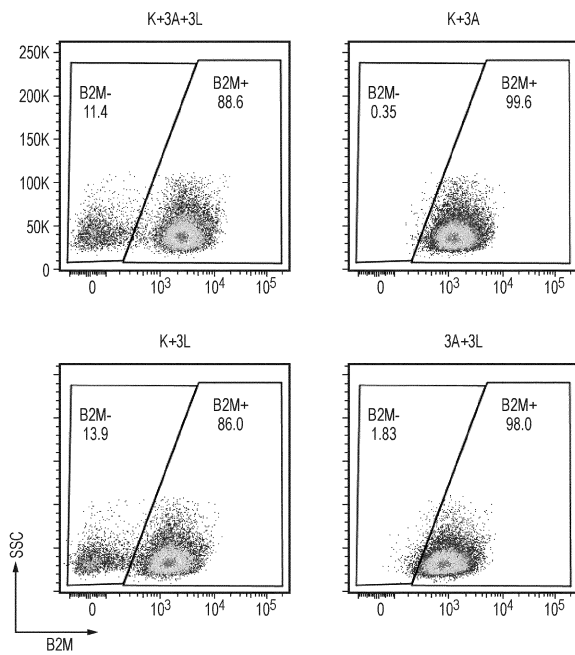


【図 18 A】

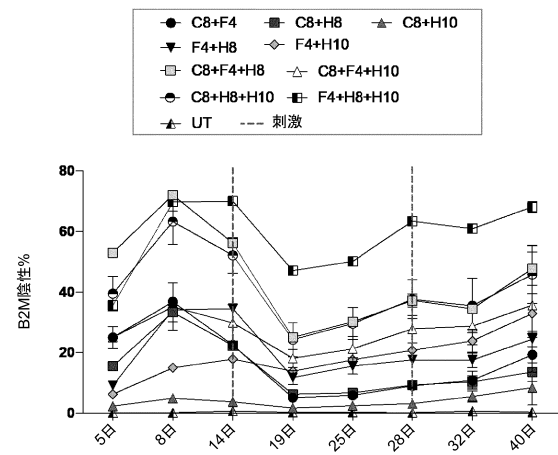


10

【図 18 B】



【図 19】



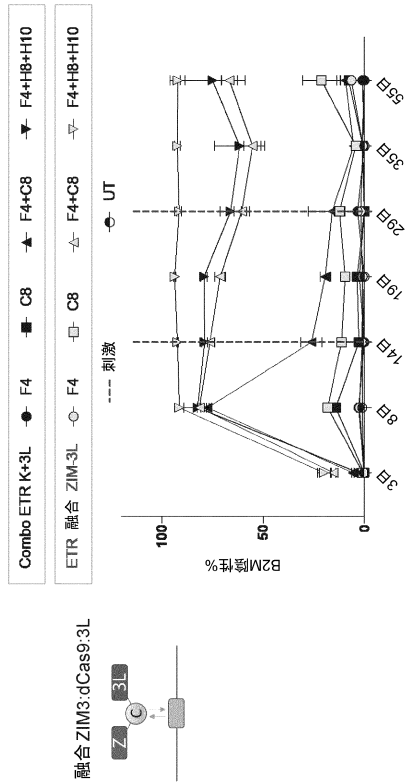
20

30

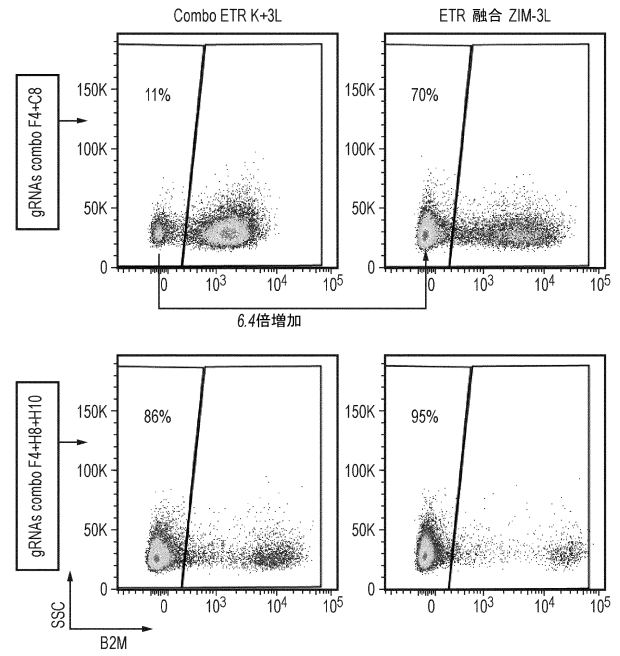
40

50

【図 20 A】



【図 20 B】



10

20

【図 21】

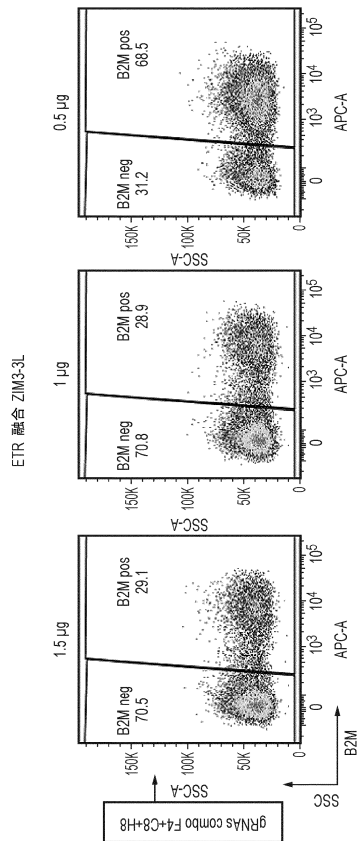
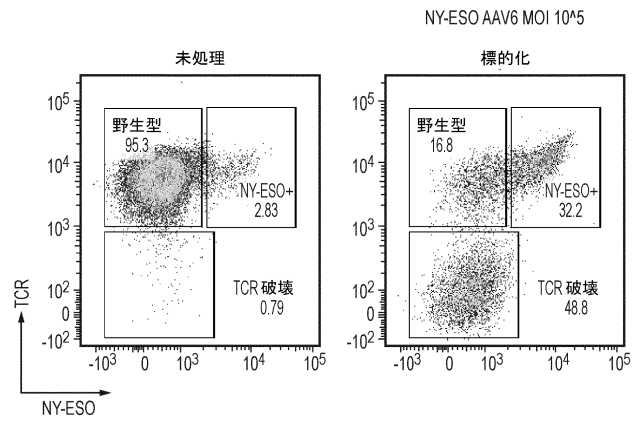


FIGURE 21

【図 22】

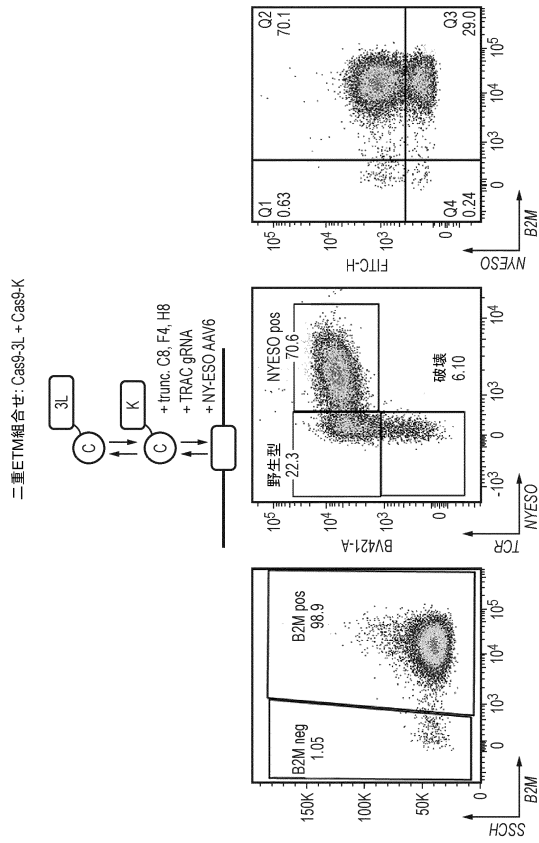


30

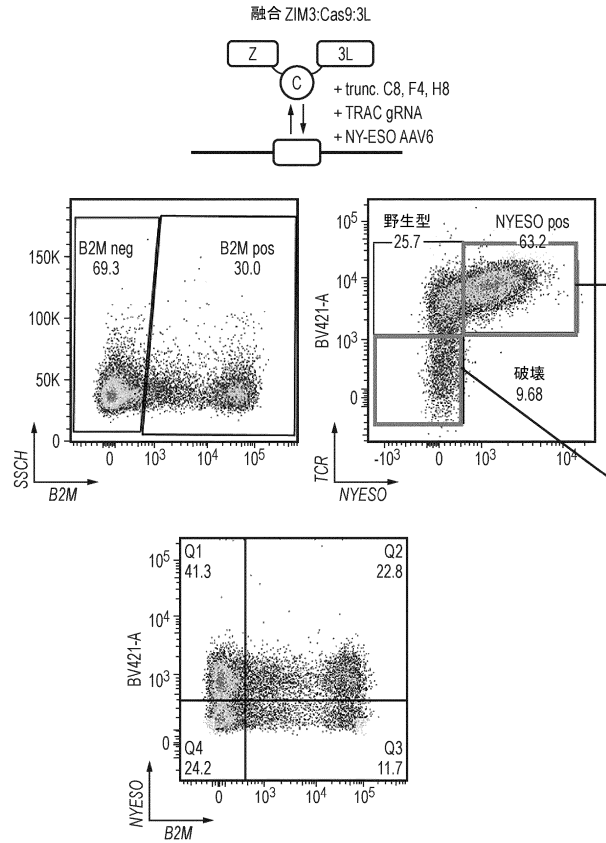
40

50

【図 2 3】



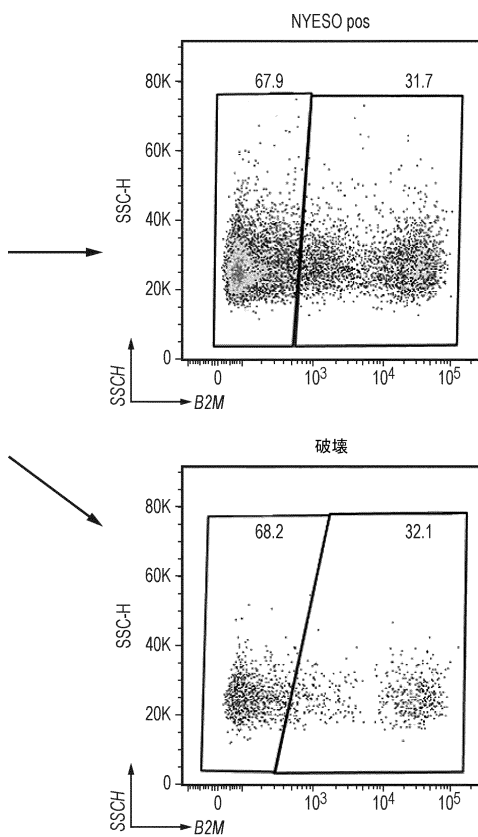
【図 2 4 - 1】



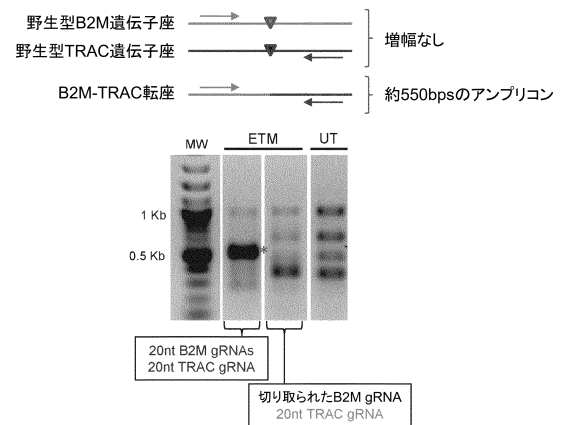
10

20

【図 2 4 - 2】



【図 2 5】

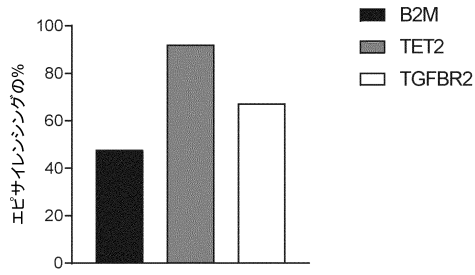


30

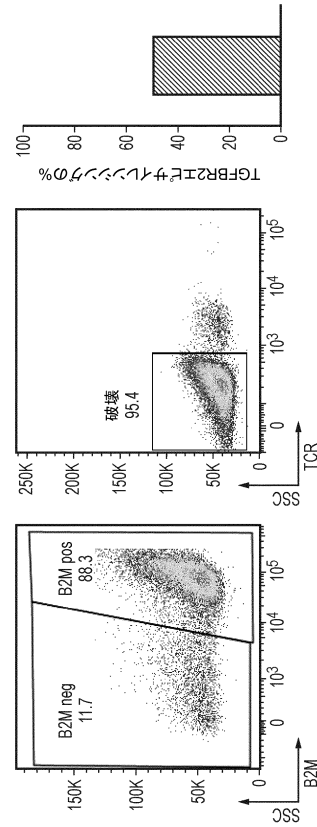
40

50

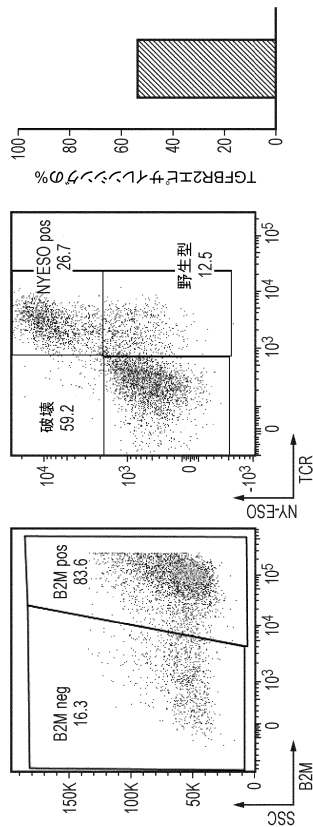
【図 3 0】



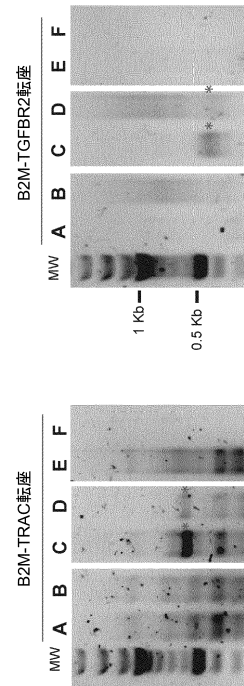
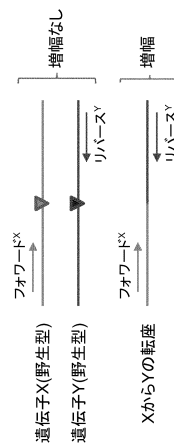
【図 3 1】



【図 3 2】



【図 3 3】



A. B2M及びTGFB2について切り取られたgRNAプラスTRACについて20mのgRNA
B. B2M及びTGFB2について切り取られたgRNAプラスTRAC及びAAV6について20mのgRNA
C. B2M及びTGFB2について20mのgRNAプラスTRACについて20mのgRNA
D. B2M及びTGFB2について20mのgRNAプラスTRAC及びAAV6について20mのgRNA
E. 未処理
F. テンプレートなし対照
*予想される転座バンド

10

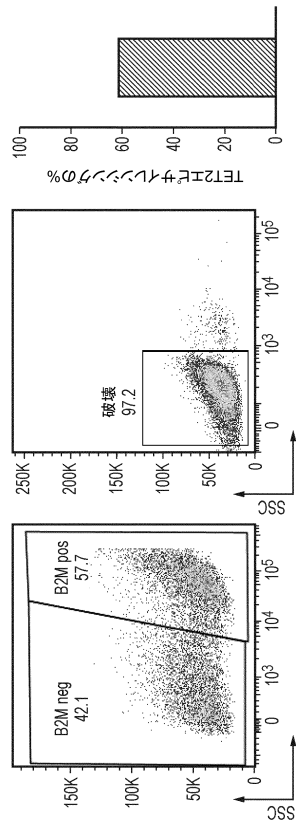
20

30

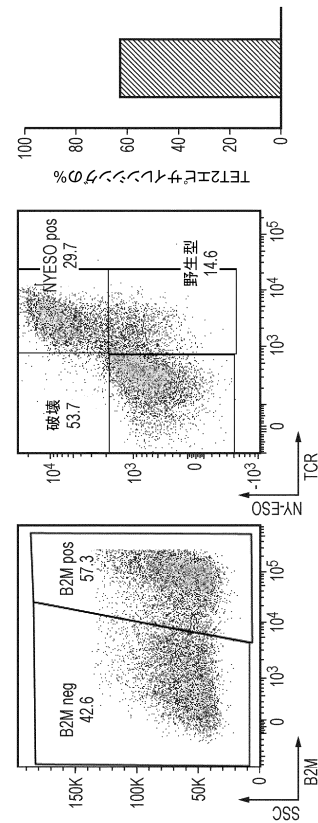
40

50

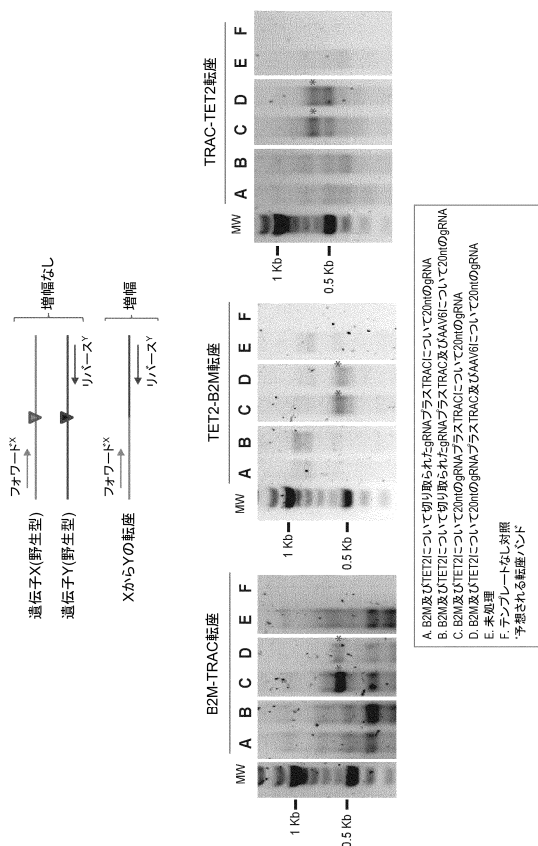
【図 3 4】



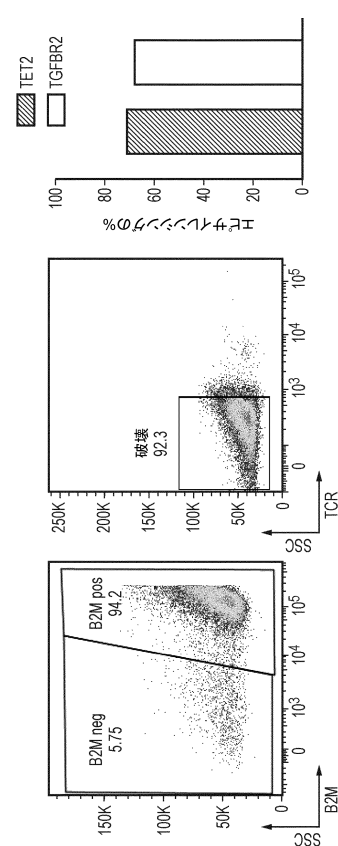
【図 3 5】



【図 3 6】



【図 3 7】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/052372

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C12N15/113	C12N9/10
	C12N9/22	C07K14/47
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/161276 A2 (EDITAS MEDICINE INC [US]) 22 October 2015 (2015-10-22) the whole document	28, 30-35
X	WO 2019/097305 A2 (CRISPR THERAPEUTICS AG [CH]) 23 May 2019 (2019-05-23) the whole document	28, 30-35
X	WO 2017/040786 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 9 March 2017 (2017-03-09)	1-11, 13-19, 21, 23, 26-31
Y	claims 1-17; figures 1, 2; example 1 the whole document	20, 22, 25
----- -/--		
☒ 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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 April 2022		21/06/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Spindler, Mark-Peter

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/052372

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/005851 A1 (UNIV ARIZONA STATE [US]; KIANI SAMIRA ET AL.) 3 January 2019 (2019-01-03)	1-11, 13-19, 21, 23, 26-31
Y	paragraph [0079] - paragraph [0083]; claims 1, 3-5 the whole document	20, 22, 25
X	----- SAMIRA KIANI ET AL: "Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression", NATURE METHODS, vol. 12, no. 11, 7 September 2015 (2015-09-07), pages 1051-1054, XP055300060, New York ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth.3580	1-11, 13-19, 21, 23, 26-31
Y	abstract; figure 2 the whole document -& SAMIRA KIANI ET AL: "Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression: Supplementary Data", NATURE METHODS, vol. 12, no. 11, 7 September 2015 (2015-09-07), pages 1051-1054, XP055738481, New York ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth.3580 figures 8, 9 the whole document	20, 22, 25
X	----- WO 2019/204766 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 24 October 2019 (2019-10-24)	28, 30, 31
Y	claims 1-42; figures 1, 5; examples 1, 5,	20, 22, 25
A	6 the whole document	1-11, 13-19, 21, 23, 27, 29
X	----- WO 2016/063264 A1 (OSPEDALE SAN RAFFAELE SRL [IT]; FOND TELETHON [IT]) 28 April 2016 (2016-04-28)	28, 30, 31
Y	claims 1-44; figures 13, 20; example 1	20, 22, 25
A	the whole document	1-11, 13-19, 21, 23, 27, 29
X	----- WO 2016/094872 A1 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 16 June 2016 (2016-06-16) paragraph [0468] - paragraph [0499]; claims 1-13, 15, 19, 21, 23-25, 27, 41, 47-50, 61, 62-64; figure 15 the whole document	28, 30, 31
	----- -/--	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/052372

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PICKAR-OLIVER ADRIAN ET AL: "Targeted transcriptional modulation with type I CRISPR-Cas systems in human cells", NATURE BIOTECHNOLOGY, GALE GROUP INC, NEW YORK, vol. 37, no. 12, 23 September 2019 (2019-09-23), pages 1493-1501, XP036954201, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/s41587-019-0235-7 [retrieved on 2019-09-23] abstract; figures 4, 5 the whole document -----	28, 30
X	WO 2016/141224 A1 (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL [US]) 9 September 2016 (2016-09-09) claims 1, 12-22, 26, 27, 30 the whole document -----	28, 30
X	WO 2018/227114 A1 (EDITAS MEDICINE INC [US]) 13 December 2018 (2018-12-13) claims 1, 5, 6 the whole document -----	28, 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2022/052372

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/052372**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-11, 25 (completely); 13-23, 26-35 (partially)

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2022/052372

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-11, 25(completely); 13-23, 26-35(partially)

combination for modifying transcription, expression and/or activity of one or more gene in a cell, the combination comprising:

- (A) one or more fusion proteins each comprising a catalytically active CRISPR/Cas endonuclease domain, wherein the one or more fusion proteins collectively comprise a transcriptional repressor domain and a DNMT3L domain, or polynucleotide(s) encoding the one or more fusion proteins;
- (B) one or more guide RNAs (gRNAs) having a spacer sequence with a length that allows epigenetic editing and not gene editing of a first gene in the cell, wherein the first gene comprises a CpG island (CGI), or polynucleotide(s) coding for the one or more gRNAs; and
- (C) one or more gRNAs having a spacer sequence with a length that allows gene editing of a second gene in the cell, or polynucleotide(s) coding for the one or more gRNAs.

2. claims: 12-14, 19-24, 26-35(all partially)

combination for regulating one or more gene in a human cell, optionally an immune cell or a T cell, the combination comprising:

one to three fusion proteins each comprising a catalytically inactive Cas9, optionally SCas9 endonuclease domain wherein the one to three fusion proteins collectively comprise a transcriptional repressor and a DNMT3L domain, or polynucleotide(s) encoding the one to three fusion proteins, wherein the gene comprises a CpG island (CGI) and is a B2M gene and the combination further comprises two or more gRNAs each comprising a spacer having the sequence of one of SEQ ID NOs: 2778-2878 optionally with a 1 to 9 nucleotide truncation at the 5' end, or comprises polynucleotide(s) coding for the gRNAs

3. claims: 12, 15, 16, 19-24, 26-35(all partially)

combination for regulating one or more gene in a human cell, optionally an immune cell or a T cell, the combination comprising: one to three fusion proteins each comprising a catalytically inactive Cas9, optionally SCas9 endonuclease domain wherein the one to three fusion proteins collectively comprise a transcriptional repressor and a DNMT3L domain, or polynucleotide(s) encoding the one to three fusion proteins, wherein the gene comprises a CpG island (CGI) and is a TGFBR2 gene and the combination further comprises a gRNA that comprises a spacer having the sequence of any one of SEQ ID NOs: 2929-2978 and 4553-4559 optionally with a 1 to 9 nucleotide truncation at the 5' end, or comprises

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/EP2022 /052372

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

polynucleotide(s) coding for the gRNA

4. claims: 12, 17-24, 26-35(all partially)

combination for regulating one or more gene in a human cell, optionally an immune cell or a T cell, the combination comprising: one to three fusion proteins each comprising a catalytically inactive Cas9, optionally SCas9 endonuclease domain wherein the one to three fusion proteins collectively comprise a transcriptional repressor and a DNMT3L domain, or polynucleotide(s) encoding the one to three fusion proteins, wherein the gene comprises a CpG island (CGI) and is a TET2 gene and the combination further comprises a gRNA that comprises a spacer having the sequence of any one of SEQ ID NOs: 4429-4478 and 4560-4565 optionally with a 1 to 9 nucleotide truncation at the 5' end, or comprises polynucleotide(s) coding for the gRNA

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/052372

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015161276 A2	22-10-2015	AU 2015247323 A1	10-11-2016
		CA 2945335 A1	22-10-2015
		CN 108138183 A	08-06-2018
		EP 3132030 A2	22-02-2017
		EP 3800248 A2	07-04-2021
		IL 279230 A	30-09-2021
		IL 286103 A	01-06-2022
		JP 2017513485 A	01-06-2017
		JP 2020062029 A	23-04-2020
		JP 2022081522 A	31-05-2022
		KR 20170009865 A	25-01-2017
		SG 10201809157V A	29-11-2018
		SG 10201912171P A	27-02-2020
		SG 11201608701Q A	29-11-2016
		US 2017175128 A1	22-06-2017
		US 2022106600 A1	07-04-2022
		WO 2015161276 A2	22-10-2015
WO 2019097305 A2	23-05-2019	AU 2018367896 A1	31-10-2019
		BR 112019023608 A2	26-05-2020
		CA 3062506 A1	23-05-2019
		CN 110914289 A	24-03-2020
		CO 2019013821 A2	31-01-2020
		EP 3621981 A2	18-03-2020
		JP 2020519277 A	02-07-2020
		KR 20200005596 A	15-01-2020
		PH 12019502529 A1	13-07-2020
		US 11071755 B1	27-07-2021
		US 2018325955 A1	15-11-2018
		US 2019314413 A1	17-10-2019
		US 2019314414 A1	17-10-2019
		US 2019365808 A1	05-12-2019
		US 2019365809 A1	05-12-2019
		US 2020330518 A1	22-10-2020
		US 2020405764 A1	31-12-2020
		US 2021085718 A1	25-03-2021
		US 2021108174 A1	15-04-2021
		US 2021236551 A1	05-08-2021
		US 2021236552 A1	05-08-2021
		US 2021252060 A1	19-08-2021
		WO 2019097305 A2	23-05-2019
		ZA 201906923 B	27-01-2021
		ZA 202006500 B	26-01-2022
WO 2017040786 A1	09-03-2017	US 2018251789 A1	06-09-2018
		WO 2017040786 A1	09-03-2017
WO 2019005851 A1	03-01-2019	US 2020123567 A1	23-04-2020
		WO 2019005851 A1	03-01-2019
WO 2019204766 A1	24-10-2019	AU 2019255789 A1	22-10-2020
		BR 112020021229 A2	02-02-2021
		CA 3096713 A1	24-10-2019
		CN 112334577 A	05-02-2021
		EP 3781705 A1	24-02-2021
		GB 2587970 A	14-04-2021
		JP 2021521788 A	30-08-2021
		KR 20210003819 A	12-01-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/052372

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		SG 11202009783W A	27-11-2020
		US 2021139918 A1	13-05-2021
		WO 2019204766 A1	24-10-2019
WO 2016063264 A1	28-04-2016	AU 2015334469 A1	25-05-2017
		AU 2022202407 A1	05-05-2022
		CA 2965591 A1	28-04-2016
		CN 107109433 A	29-08-2017
		DK 3209783 T3	14-02-2022
		EP 3209783 A1	30-08-2017
		EP 3995584 A1	11-05-2022
		ES 2906263 T3	13-04-2022
		JP 7002936 B2	04-02-2022
		JP 2017537611 A	21-12-2017
		JP 2022068875 A	10-05-2022
		PL 3209783 T3	19-04-2022
		PT 3209783 T	10-02-2022
		US 2019032049 A1	31-01-2019
		WO 2016063264 A1	28-04-2016
WO 2016094872 A1	16-06-2016	EP 3230452 A1	18-10-2017
		US 2017321214 A1	09-11-2017
		WO 2016094872 A1	16-06-2016
WO 2016141224 A1	09-09-2016	AU 2016226077 A1	21-09-2017
		AU 2022201915 A1	07-04-2022
		CA 2978314 A1	09-09-2016
		CN 107532161 A	02-01-2018
		EP 3265559 A1	10-01-2018
		EP 3858990 A1	04-08-2021
		HK 1249132 A1	26-10-2018
		JP 6817215 B2	20-01-2021
		JP 2018506987 A	15-03-2018
		JP 2021058202 A	15-04-2021
		KR 20170124565 A	10-11-2017
		US 2016312198 A1	27-10-2016
		US 2016312199 A1	27-10-2016
		US 2016319260 A1	03-11-2016
		US 2016319261 A1	03-11-2016
		US 2017327806 A1	16-11-2017
		US 2018282714 A1	04-10-2018
		US 2020149023 A1	14-05-2020
		US 2020399620 A1	24-12-2020
		US 2020399621 A1	24-12-2020
		US 2022145275 A1	12-05-2022
		WO 2016141224 A1	09-09-2016
WO 2018227114 A1	13-12-2018	AU 2018279829 A1	02-01-2020
		CA 3065813 A1	13-12-2018
		CN 110997908 A	10-04-2020
		EP 3635104 A1	15-04-2020
		JP 2020524497 A	20-08-2020
		KR 20200016892 A	17-02-2020
		US 2018355332 A1	13-12-2018
		US 2020056164 A1	20-02-2020
		US 2022177861 A1	09-06-2022
		WO 2018227114 A1	13-12-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1

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

イタリア国 2 0 1 2 3 ミラノ, 8, ヴィア ヴィンセンツォ ジョベルティ, イブシレン バイオ
エス. アール. エル.

F ターム (参考) 4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA44
4C084 AA13 NA14 ZC021 ZC022
4C087 AA01 AA02 BB43 CA04 NA14 ZC02