

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-521975

(P2016-521975A)

(43) 公表日 平成28年7月28日(2016.7.28)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00

テーマコード(参考)

Z N A A 4 B O 2 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁)

(21) 出願番号	特願2016-514094 (P2016-514094)
(86) (22) 出願日	平成26年5月15日 (2014.5.15)
(85) 翻訳文提出日	平成27年12月25日 (2015.12.25)
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/038216
(87) 国際公開番号	W02014/186585
(87) 国際公開日	平成26年11月20日 (2014.11.20)
(31) 優先権主張番号	61/823,689
(32) 優先日	平成25年5月15日 (2013.5.15)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人	508241200 サンガモ バイオサイエンシーズ, イン コーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 リッ チモンド カナル ブールバード 501 ポイント リッチモンド テク センタ ー スト エ-100
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】遺伝的状態の処置のための方法および組成物

## (57) 【要約】

例えば、疾患の処置のためまたは遺伝子修飾された植物の作出のための、遺伝子修飾のための方法および組成物が開示される。一態様では、細胞において内因性遺伝子を修飾する方法が、本明細書に記載され、この方法は、内因性遺伝子中の標的部位を認識する単一ガイドRNAを含む第1の核酸分子および機能的ドメインをコードする第2の核酸分子をこの細胞に投与するステップを含み、この機能的ドメインは、標的部位上で単一ガイドRNAと会合し、それによって、内因性遺伝子を修飾する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞において内因性遺伝子の発現を修飾する方法であって、前記方法が、前記内因性遺伝子中の標的部位を認識する単一ガイドRNAを含む第1の核酸分子および機能的ドメインをコードする第2の核酸分子を前記細胞に投与するステップを含み、前記機能的ドメインが、前記標的部位上で前記単一ガイドRNAと会合し、それによって、前記内因性遺伝子の発現を修飾する、方法。

**【請求項 2】**

前記機能的ドメインが、転写活性化ドメイン、転写抑制ドメインおよびヌクレアーゼドメインからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。 10

**【請求項 3】**

前記機能的ドメインが、IIS型制限酵素ヌクレアーゼドメインまたはCasタンパク質である、請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記機能的ドメインが転写活性化ドメインであり、前記内因性遺伝子の発現が増加される、請求項2に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記機能的ドメインが転写抑制ドメインであり、前記内因性遺伝子の発現が阻害される、請求項2に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記機能的ドメインがヌクレアーゼであり、前記内因性遺伝子が開裂される、請求項2に記載の方法。 20

**【請求項 7】**

前記ヌクレアーゼドメインが、前記Casタンパク質によって含まれる、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記Casタンパク質が、もう1つのヌクレアーゼ開裂ドメインを含む、請求項7に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記細胞が、哺乳動物細胞または植物細胞である、請求項1～8のいずれかに記載の方法。 30

**【請求項 10】**

前記哺乳動物細胞が幹細胞である、請求項9に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記内因性遺伝子が、哺乳動物グロビン遺伝子(HBB)、ガンマグロビン遺伝子(HBG1)、B細胞リンパ腫/白血病11A(BCL11A)遺伝子、Kruppel様因子1(KLF1)遺伝子、CCR5遺伝子、CXCR4遺伝子、PPP1R12C(AAVS1)遺伝子、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Hprt)遺伝子、アルブミン遺伝子、第VIII因子遺伝子、第IX因子遺伝子、ロイシンリッチリピートキナーゼ2(LRRK2)遺伝子、ハンチングン(Huntingtin)(Htt)遺伝子、ロドプシン(RHO)遺伝子、囊胞性線維症膜コンダクタンス調節因子(CFTR)遺伝子、サーファクタントタンパク質B遺伝子(SFTPB)、T細胞受容体アルファ(TRAC)遺伝子、T細胞受容体ベータ(TRBC)遺伝子、プログラム細胞死1(PD1)遺伝子、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)遺伝子、ヒト白血球抗原(HLA)A遺伝子、HLA-B遺伝子、HLA-C遺伝子、HLA-DPA遺伝子、HLA-DQ遺伝子、HLA-DRA遺伝子、LMP7遺伝子、抗原ペプチド輸送体(TAP)1遺伝子、TAP2遺伝子、タバシン遺伝子(TAPPB)、クラスII主要組織適合複合体トランス活性化因子(CITA)遺伝子、ジストロフィン遺伝子(DMD)、グルココルチコイド受容体遺伝子(GR)、IL2RG遺伝子およびRFX5遺伝子からなる群から選択される、請求項1～9のいずれかに記載の方法。 40

**【請求項 1 2】**

前記内因性遺伝子が、植物 F A D 2 遺伝子、植物 F A D 3 遺伝子、植物 Z P 1 5 遺伝子、植物 K A S I I 遺伝子、植物 M D H 遺伝子および植物 E P S P S 遺伝子からなる群から選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 1 3】**

哺乳動物 グロビン遺伝子 (H B B) 、ガンマグロビン遺伝子 (H B G 1) 、B 細胞リンパ腫 / 白血病 1 1 A (B C L 1 1 A) 遺伝子、K r u p p e l 様因子 1 (K L F 1) 遺伝子、C C R 5 遺伝子、C X C R 4 遺伝子、P P P 1 R 1 2 C (A A V S 1) 遺伝子、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスクフェラーゼ (H P R T) 遺伝子、アルブミン遺伝子、第 V I I I 因子遺伝子、第 I X 因子遺伝子、ロイシンリッチリピートキナーゼ 2 (L R R K 2) 遺伝子、ハンチング (H t t) 遺伝子、ロドプシン (R H O) 遺伝子、囊胞性線維症膜コンダクタンス調節因子 (C F T R) 遺伝子、サーファクタントタンパク質 B 遺伝子 (S F T P B) 、T 細胞受容体アルファ (T R A C) 遺伝子、T 細胞受容体ベータ (T R B C) 遺伝子、プログラム細胞死 1 (P D 1) 遺伝子、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (C T L A - 4) 遺伝子、ヒト白血球抗原 (H L A) A 遺伝子、H L A B 遺伝子、H L A C 遺伝子、H L A - D P A 遺伝子、H L A - D Q 遺伝子、H L A - D R A 遺伝子、L M P 7 遺伝子、抗原ペプチド輸送体 (T A P) 1 遺伝子、T A P 2 遺伝子、タパシン遺伝子 (T A P B P) 、クラス I I 主要組織適合複合体トランスクフェラーゼ (C I I T A) 遺伝子、ジストロフィン遺伝子 (D M D) 、グルココルチコイド受容体遺伝子 (G R) 、I L 2 R G 遺伝子および R F X 5 遺伝子からなる群から選択される内因性遺伝子に結合する、単一ガイド R N A。

10

20

20

**【請求項 1 4】**

植物 F A D 2 遺伝子、植物 F A D 3 遺伝子、植物 Z P 1 5 遺伝子、植物 K A S I I 遺伝子、植物 M D H 遺伝子および植物 E P S P S 遺伝子からなる群から選択される内因性遺伝子に結合する、単一ガイド R N A。

**【請求項 1 5】**

配列番号 1 4 9 ~ 2 1 5 からなる群から選択される、請求項 1 3 または 1 4 に記載の単一ガイド R N A。

30

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願への相互参照**

本出願は、2013年5月15日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 8 2 3 , 6 8 9 号の利益を主張し、その開示は本明細書においてその全体が参考として援用される。

**【0 0 0 2】****技術分野**

本開示は、ゲノム遺伝子操作の分野にある。

**【背景技術】****【0 0 0 3】**

遺伝子療法は、医学における新時代の大きな可能性がある。これらの方法論は、標準的な医療業務によってこれまで対処できなかった状態に対する処置を可能にする。特に有望な一領域は、細胞を遺伝子操作して、その細胞においてそれまでは産生されなかった産物を細胞に発現させる能力である。この技術の使用の例には、新規治療タンパク質をコードする導入遺伝子の挿入、細胞または個体において失われているタンパク質をコードするコード配列の挿入、突然変異した遺伝子配列を含む細胞における野生型遺伝子の挿入、およびマイクロ R N A または s i R N A 等の構造的核酸をコードする配列の挿入が含まれる。

40

**【0 0 0 4】**

食糧生産に対する世界的需要の高まりに関する課題に対応するために、農業の生産性（例えば、増強された収量または遺伝子操作された有害生物抵抗性）を改善するための多く

50

の有効なアプローチは、突然変異育種か、または形質転換による作物種のゲノム中への新規遺伝子の導入のいずれかを利用するものである。いずれのプロセスも、本質的に非特異的であり、比較的非効率的である。例えば、従来の植物形質転換方法は、ランダムな位置でゲノム中に組み込まれる外因性DNAを送達する。これらの方法のランダムな性質により、望ましい特質を有するトランスジェニック系統を同定および単離するために、構築物1つ当たり数百の特有のランダム組込み事象を生成およびスクリーニングすることが必要となる。さらに、従来の形質転換方法は、(a)意図しないゲノム破壊に起因する多面的効果が生じているかどうかを予測することが困難であること；および(b)单一の導入遺伝子候補内の異なる調節エレメントおよび導入遺伝子設計の影響を比較することは、ゲノム中へのランダム組込みによってこうした比較が複雑化するので困難であることを含め、導入遺伝子の評価に関するいくつかの課題を生じる。結果として、従来の植物形質遺伝子操作は、成功の可能性が低い、労力を要する、コスト集約的なプロセスである。

10

## 【0005】

精密な遺伝子修飾は、植物系における従来の業務のロジスティックの課題を克服し、したがって、基礎的な植物の生物学研究および農業バイオテクノロジーの両方において長期にわたるとらえ所のない目標となってきた。しかし、イネにおける陽性-陰性薬物選択を介した「遺伝子標的化」または予め遺伝子操作された制限部位の使用を除くと、モデルおよび作物の両方の全ての植物種における標的化されたゲノム修飾は、最近まで、非常に困難であることが証明されていた。Teradaら(2002年)Nat Biotechnol 20巻(10号)：1030頁；Teradaら(2007年)Plant Physiol 144巻(2号)：846頁；D' Halluinら(2008年)Plant Biotechnology J. 6巻(1号)：93頁。

20

## 【0006】

導入遺伝子(または形質)スタッキングは、植物の作出にとって大きな潜在力を有するが、困難であることが証明されている。例えば、Halpin(2005年)Plant Biotechnology Journal 3巻：141～155頁を参照されたい。さらに、生物が2またはそれ超の重複した対のセットの染色体(同質倍数性)または関連する対のセットの染色体(異質倍数性)を有する倍数性は、動物よりも植物種においてより頻繁に存在する。例えば、コムギは、二倍体(2セットの染色体)、四倍体(4セットの染色体)および六倍体(6セットの染色体)である系統を有する。さらに、属Braasiicaの多くの農業的に重要な植物もまた、異質四倍体である。

30

## 【0007】

導入遺伝子は、種々の方法によって細胞に送達され得、その結果、この導入遺伝子は、細胞自身のゲノム中に組み込まれ、そこで維持される。近年、選択されたゲノム遺伝子座中の標的化された挿入のために部位特異的ヌクレアーゼによる開裂を使用する、導入遺伝子組込みのための戦略が開発された(例えば、共同所有された米国特許第7,888,121号を参照)。標的化される遺伝子に特異的なヌクレアーゼが利用され得、その結果、導入遺伝子構築物が、相同組換え修復(HDR)または非相同末端結合(NHEJ)駆動性過程の間の末端捕捉のいずれかによって挿入される。標的化される遺伝子座には、「セーフハーバー(safe harbor)」遺伝子座、例えば、ヒト細胞におけるAAVS1、HprtおよびCCR5遺伝子、ならびにマウス細胞におけるRosa26(例えば、米国特許第7,888,121号；第7,972,854号；第7,914,796号；第7,951,925号；第8,110,379号；第8,409,861号；第8,586,526号；米国特許出願公開第20030232410号；第20050208489号；第20050026157号；第20060063231号；第20080159996号；第201000218264号；第20120017290号；第20110265198号；第20130137104号；第20130122591号；第20130177983号および第20130177960号を参照)、ならびに植物におけるZp15遺伝子座(米国特許第8,329,986号を参照)が含まれる。ヌクレアーゼ媒介性の組込みは、導入遺伝子のランダム組込みに依存する古典的組込みアプロ

40

50

ーチと比較して、改善された導入遺伝子発現、増加した安全性および発現持続性の見込みを提供するが、それは、これが、近傍の癌遺伝子の遺伝子サイレンシングまたは活性化のリスクを最小限にするための、正確な導入遺伝子の位置付けを可能にするからである。

#### 【0008】

ゲノム遺伝子操作には、上記挿入方法に加えて、遺伝子のノックアウトもまた含まれ得る。ドナー核酸の非存在下では、開裂されたゲノムを有する細胞は、切断を治すためにエラープローンNHEJ経路を用いる。この過程は、多くの場合、標的部位におけるミスセントスまたはナンセンス突然変異の導入をもたらし得る修復過程の間にヌクレオチドを付加または欠失する（「挿入欠失」）。例えば、CCR5特異的ジンクフィンガーヌクレアーゼは、非機能的CCR5受容体を生じ、したがってHIV感染を予防するために、第I/I相試験において使用されている（米国特許第7,951,925号を参照）。

10

#### 【0009】

所望の位置における標的化されたヌクレアーゼ媒介性のゲノム開裂は、遺伝子操作されたヌクレアーゼの使用によって得られ得る。例えば、二本鎖切断（DSB）は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）またはTALエフェクタードメインヌクレアーゼ（TALEN）等の部位特異的ヌクレアーゼによって生じ得る。例えば、あらゆる目的でその開示が参照によりその全体が組み込まれる、Urnovら（2010年）Nature 435巻（7042号）：646～51頁；米国特許第8,586,526号；第6,534,261号；第6,599,692号；第6,503,717号；第6,689,558号；第7,067,317号；第7,262,054号を参照されたい。

20

#### 【0010】

別のヌクレアーゼ系は、CRISPR/Cas系として公知の、細菌および古細菌において見出されるいわゆる獲得免疫系の使用を含む。CRISPR/Cas系は、細菌の40%および古細菌の90%において見出され、それらの系は複雑性が異なっている。例えば、米国特許第8,697,359号を参照されたい。CRISPR遺伝子座（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）は、外来DNAの短いセグメントが短いリピート回文配列間に組み込まれる、生物のゲノム内の領域である。これらの遺伝子座は転写され、RNA転写物（「pre-crRNA」）は、短いCRISPR RNA（crRNA）へとプロセシングされる。3つの型のCRISPR/Cas系が存在し、これらは全て、「Cas」タンパク質（CRISPR関連）として公知のこれらのRNAおよびタンパク質を取り込む。I型およびII型は共に、crRNAへと完全にプロセシングされたときに、このcrRNAに相補的な核酸を開裂させることができマルチCasタンパク質複合体をアセンブルするpre-crRNAをプロセシングする、Casエンドヌクレアーゼを有する。

30

#### 【0011】

II型の系では、crRNAは、pre-crRNA中のリピート配列と相補的なトランスクレアーゼRNA（tracrRNA）がCas9タンパク質の存在下での二本鎖特異的RNase IIによるプロセシングを誘発する異なる機構を使用して、產生される。次いで、Cas9は、成熟crRNAと相補的な標的DNAを開裂させることができるが、Cas9による開裂は、crRNAと標的DNAとの間の塩基対合、およびPAM配列（プロトスペーサー隣接モチーフ）と呼ばれるcrRNA中の短いモチーフの存在の両方に依存する（Qiら（2013年）Cell 152巻：1173頁を参照）。さらに、その3'末端においてcrRNAと塩基対合するので、このtracrRNAもまた存在しなければならず、この会合は、Cas9活性を誘発する。

40

このCas9タンパク質は、少なくとも2つのヌクレアーゼドメインを有する：一方のヌクレアーゼドメインは、HNHエンドヌクレアーゼと類似しているが、他方は、Ruvエンドヌクレアーゼドメインと似ている。HNH型ドメインは、crRNAと相補的なDNA鎖を開裂させることを担うようであるが、Ruvドメインは、非相補鎖を開裂させる。

crRNA-tracrRNA複合体の要求は、crRNAおよびtracrRNAの

50

アニーリングによって通常形成されるヘアピンを含む遺伝子操作された「単一ガイドRNA」(sgRNA)の使用によって回避され得る(Jinekら(2012年)Science 337巻:816頁およびCongら(2013年)Science express 10.1126/science.1231143を参照)。S.pyrogenesでは、遺伝子操作されたtracrRNA:crRNA融合物またはsgRNAは、Cas会合したRNAと標的DNAとの間で二本鎖RNA:DNAへテロ二量体が形成する場合に、Cas9が標的DNAを開裂するようにガイドする。Cas9タンパク質とPAM配列を含む遺伝子操作されたsgRNAとを含むこの系は、RNAガイドされるゲノム編集に使用されており(Ramalingam同書を参照)、ZFNおよびTALENと類似の編集効率で、in vivoでゼブラフィッシュ胚ゲノム編集に有用である(Hwangら(2013年)Nature Biotechnology 31巻(3号):227頁を参照)。

10

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0012】

【特許文献1】米国特許第7,888,121号明細書

【特許文献2】米国特許第7,972,854号明細書

【特許文献3】米国特許第7,914,796号明細書

【特許文献4】米国特許第7,951,925号明細書

【特許文献5】米国特許第8,110,379号明細書

【特許文献6】米国特許第8,409,861号明細書

【特許文献7】米国特許第8,586,526号明細書

【特許文献8】米国特許出願公開第2003/0232410号明細書

20

【特許文献9】米国特許出願公開第2005/0208489号明細書

【特許文献10】米国特許出願公開第2005/0026157号明細書

【特許文献11】米国特許出願公開第2006/0063231号明細書

【特許文献12】米国特許出願公開第2008/0159996号明細書

【特許文献13】米国特許出願公開第2010/00218264号明細書

【特許文献14】米国特許出願公開第2012/0017290号明細書

30

【特許文献15】米国特許出願公開第2011/0265198号明細書

【特許文献16】米国特許出願公開第2013/0137104号明細書

【特許文献17】米国特許出願公開第2013/0122591号明細書

【特許文献18】米国特許出願公開第2013/0177983号明細書

【特許文献19】米国特許出願公開第2013/0177960号明細書

【特許文献20】米国特許第8,329,986号明細書

【特許文献21】米国特許第7,951,925号明細書

【特許文献22】米国特許第8,586,526号明細書

【特許文献23】米国特許第6,534,261号明細書

【特許文献24】米国特許第6,599,692号明細書

40

【特許文献25】米国特許第6,503,717号明細書

【特許文献26】米国特許第6,689,558号明細書

【特許文献27】米国特許第7,067,317号明細書

【特許文献28】米国特許第7,262,054号明細書

【特許文献29】米国特許第8,697,359号明細書

## 【非特許文献】

## 【0013】

【非特許文献1】Urnovら(2010年)Nature 435巻(7042号):646~51頁

【非特許文献2】Qiら(2013年)Cell 152巻:1173頁

【非特許文献3】Jinekら(2012年)Science 337巻:816頁およ

50

び Cong ら (2013年) Science express / 10. 1126 / science. 1231143

【非特許文献4】 Hwang ら (2013年) Nature Biotechnology 31巻(3号) : 227頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

したがって、疾患の処置および／または予防のため、ならびに農業的使用のためを含む、ゲノム編集のための系が、いまだ必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0015】

例えば、疾患の処置のため、または遺伝子修飾された植物の作出のための、遺伝子修飾のための方法および組成物が、本明細書に開示される。ゲノム編集は、異常な遺伝子を修正するため、野生型遺伝子を挿入するため、または内因性遺伝子の発現を変化させるために使用される。任意の哺乳動物または植物の遺伝子（複数可）を含む、1または複数の内因性遺伝子が、ゲノム編集のために標的化され得る。非限定的な例として、グロビンをコードする野生型遺伝子が、欠陥のあるグロビンによって引き起こされるヘモグロビン異常症を処置するために、細胞のゲノム中に挿入され得る。一部の例では、野生型遺伝子は、セーフハーバー遺伝子座中に、または赤血球細胞中のグロビン遺伝子座等の、目的の組織において高度に発現されることが公知の遺伝子座において、挿入され得る。本明細書に開示される別のアプローチには、欠陥のある内因性遺伝子が標的化され、遺伝子操作されたドナーを使用して突然変異体配列が置き換えられる（例えば、この突然変異体は、機能的配列で置き換えられる）、遺伝子修正の使用を含む。あるいは、別の遺伝子のミュレーションに関する1または複数の調節遺伝子が変更され得る、例えば、遺伝子の抑制に関する調節遺伝子が、変更もしくはノックアウトされ得、その結果、通常は抑制される遺伝子が、今度は発現されもしくは発現されず、または遺伝子の上流の調節結合部位もしくはこの遺伝子座の他の領域中の調節結合部位は、調節因子がこの遺伝子座においてDNAと適切に相互作用することができず、遺伝子発現を調節できないように、変更される。別のアプローチは、ヘモグロビン異常症または他の疾患（例えば、遺伝性疾患）の処置のための、患者中に移植するために次いで使用され得る、修飾された幹細胞（例えば、造血幹細胞または赤血球（RBC）前駆体）の使用をさらに含む。

【0016】

一様では、ゲノム中の内因性遺伝子（例えば、内因性もしくはセーフハーバー遺伝子、または調節遺伝子もしくはそのDNA標的）中の目的の領域中の標的部位に結合するCRISPR/Cas系が本明細書に記載され、ここで、このCRISPR/Cas系は、標的遺伝子および機能的ドメイン（例えば、転写調節ドメインおよび／またはヌクレオゼドメイン）を認識する1または複数の遺伝子操作された単一ガイドRNAを含む。

【0017】

本明細書に記載されるCRISPR/Cas系は、遺伝子内のもしくは遺伝子に隣接するコード領域もしくは非コード領域中の目的の領域、例えば、リーダー配列、トレーラー配列もしくはイントロン等、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域内の目的の領域に結合しおよび／またはそれを開裂し得る。ある特定の実施形態では、このCRISPR/Casは、遺伝子に結合しおよび／またはそれを開裂する。他の実施形態では、このCRISPR/Casは、セーフハーバー遺伝子、例えば、哺乳動物細胞中のCCR5遺伝子、PPP1R12C（AAVS1としても公知）遺伝子またはRos-a遺伝子、および植物中のZp15遺伝子座に結合しおよび／またはそれを開裂する。PPP1R12Cは、そのコード配列中に22個のエクソンを有し、標的化のため特に好み位置は、イントロン1内に存在し（即ち、chr19:55624164~55624759またはその近傍）、プロモーターなしの導入遺伝子の挿入を可能にする。さらに、哺乳動物系における選択を補助するために、Hprt遺伝子座が使用され得る（米国

10

20

30

40

50

特許出願第13/660,821号および第13/660,843号を参照)。一部の実施形態では、このCRISPR/Casは、調節エレメントに結合し、調節エレメントにおいて開裂させる。別の態様では、本明細書に記載されるCRISPR/Casヌクレアーゼのうちの1または複数を含む組成物が、本明細書に記載される。

#### 【0018】

一態様では、記載されるようなCRISPR/Cas系は、目的の遺伝子に結合し得および/または目的の遺伝子の発現をモジュレートし得る。一実施形態では、このCRISPR/Cas系は、DNA配列に結合し、他の調節因子の結合を防止する。別の実施形態では、CRISPR/Cas系融合タンパク質の結合は、標的DNAの発現をモジュレート(即ち、誘導または抑制)し得る。

10

#### 【0019】

別の態様では、本明細書に記載される1または複数のCRISPR/Cas系をコードするポリヌクレオチドが記載される。このポリヌクレオチドは、例えば、mRNAであり得る。一部の態様では、このmRNAは、化学的に修飾され得る(例えば、Kormannら(2011年)Nature Biotechnology 29巻(2号):154~157頁を参照)。

#### 【0020】

別の態様では、プロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載される1または複数のCRISPR/Cas構成成分をコードするポリヌクレオチドを含むCRISPR/Cas系発現ベクターが、記載される。一実施形態では、この発現ベクターは、ウイルスベクターである。別の実施形態では、この発現ベクターは、DNAミニサークルである。

20

#### 【0021】

一態様では、標的DNAを開裂するために使用されるCasタンパク質が、本明細書に記載される。

#### 【0022】

別の態様では、内因性遺伝子を修飾する(例えば、内因性遺伝子の発現をモジュレートする)方法が本明細書に記載され、この方法は、内因性遺伝子中の標的部位を認識する単一ガイドRNAを含む第1の核酸分子および機能的ドメインをコードする第2の核酸分子をこの細胞に投与するステップを含み、この機能的ドメインは、標的部位上で単一ガイドRNAと会合し、それによって、内因性遺伝子を修飾する。第1および第2の核酸は、同じまたは異なるベクター上に存在し得る。ある特定の実施形態では、この内因性遺伝子は、哺乳動物グロビン遺伝子(HBB)、ガンマグロビン遺伝子(HBG1)、B細胞リンパ腫/白血病11A(BCL11A)遺伝子、Kruppel様因子1(KLF1)遺伝子、CCR5遺伝子、CXCR4遺伝子、PPP1R12C(AAVS1)遺伝子、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Hprt)遺伝子、アルブミン遺伝子、第VIII因子遺伝子、第IX因子遺伝子、ロイシンリッチリピートキナーゼ2(LRK2)遺伝子、ハンチンチン(Huntingtin)(Htt)遺伝子、ロドプシン(RHO)遺伝子、囊胞性線維症膜コンダクタンス調節因子(CFTR)遺伝子、サーファクタントタンパク質B遺伝子(SFTPB)、T細胞受容体アルファ(TRAC)遺伝子、T細胞受容体ベータ(TRBC)遺伝子、プログラム細胞死1(PD1)遺伝子、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)遺伝子、ヒト白血球抗原(HLA)A遺伝子、HLA-B遺伝子、HLA-C遺伝子、HLA-DPA遺伝子、HLA-DQ遺伝子、HLA-DRA遺伝子、LMP7遺伝子、抗原ペプチド輸送体(Transporter associated with Antigen Processing)(TAP)1遺伝子、TAP2遺伝子、タパシン遺伝子(TAPBP)、クラスII主要組織適合複合体トランス活性化因子(CITA)遺伝子、ジストロフィン遺伝子(DMD)、グルココルチコイド受容体遺伝子(GR)、IL2RG遺伝子、RFX5遺伝子、FAD2遺伝子、FAD3遺伝子、ZP15遺伝子、KASII遺伝子、MDH遺伝子および/またはEPPSPS遺伝子からなる群から選択される。

30

40

50

## 【0023】

本明細書に記載される方法および組成物のいずれかでは、この細胞は、任意の真核生物細胞（複数可）、例えば、植物細胞もしくは哺乳動物細胞、またはCOS、CHO（例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HAK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293（例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）およびper C6細胞を含む細胞株、ならびに昆虫細胞、例えば、*Spodoptera frugiperda* (Sf)、あるいは真菌細胞、例えば、*Saccharomyces*、*Pichia*および*Schizosaccharomyces*であり得る。ある特定の実施形態では、この細胞株は、CHO、MDCKまたはHEK293細胞株である。線維芽細胞、血液細胞（例えば、赤血球、白血球）、肝臓細胞、腎臓細胞、神経細胞などが含まれるがこれらに限定されない初代細胞もまた、本明細書に記載されるように編集され得る。適切な細胞には、幹細胞、例えば、例として、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞（iPSC）、造血幹細胞、ニューロン幹細胞および間葉系幹細胞もまた含まれる。他の態様では、遺伝子修飾された血液細胞前駆体（「HSC」として公知の造血幹細胞）が、骨髄移植において与えられ、HSCが、in vivoで分化および成熟する。

10

## 【0024】

他の態様では、遺伝子修飾されたRBC前駆体および/または造血幹細胞（HSC）が、骨髄移植において与えられ、RBCが、in vivoで分化および成熟する。一部の実施形態では、これらのHSCは、G-CSF誘導された動員の後に末梢血から単離され、他の実施形態では、これらの細胞は、ヒト骨髄または臍帯血から単離される。一部の態様では、これらのHSCは、特定の遺伝子または調節配列をノックアウトするように設計されたヌクレアーゼによる処理によって編集される。他の態様では、これらのHSCは、野生型遺伝子が挿入および発現され、ならびに/または内因性の異常な遺伝子が修正されるように、遺伝子操作されたヌクレアーゼとドナー核酸とで修飾される。一部の実施形態では、遺伝子操作された遺伝子が、挿入および発現される。一部の実施形態では、修飾されたHSCは、穏やかな骨髄破壊的前処理の後に、患者に投与される。他の態様では、移植後に、造血細胞の大部分が、新たに移植された修飾されたHSC集団に由来するよう、これらのHSCは、完全な骨髄破壊後に投与される。

20

## 【0025】

一態様では、本発明は、突然変異したCasヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、これらの突然変異体Casヌクレアーゼは、Cas9ヌクレアーゼであり、変更された機能性を有する。一部の実施形態では、このCas9タンパク質は、HNHDメインにおいて突然変異しており、それにより、cRNAと相補的なDNA鎖を開裂させることができなくなっている。他の実施形態では、このCas9は、Rvuドメインにおいて突然変異しており、それにより、非相補的DNA鎖を開裂させることができなくなっている。これらの突然変異は、Cas9ニッカーゼの創出を生じ得る。一部の実施形態では、2つのCasニッカーゼが、DNAを標的化するために2つの別々のcRNAと共に使用されて、標的DNA中に、特定の距離離れた2つのニックを生じる。他の実施形態では、HNHおよびRvuエンドヌクレアーゼドメインの両方が、Cas9タンパク質が標的DNAを開裂させることができないようにするために変更される。

30

## 【0026】

別の態様では、本発明の方法および組成物は、Cas9タンパク質のトランケーションを含む。一実施形態では、このCas9タンパク質は、Cas9の機能的ドメインのうちの1または複数が除去されるように、トランケートされる。一実施形態では、ヌクレアーゼドメインの一部または1つの除去は、Casヌクレアーゼをニッカーゼにする。一実施形態では、このCas9は、cRNAまたはsgRNAおよび標的DNAとの相互作用を担うドメインのみを含む。

40

## 【0027】

50

なおさらなる態様では、本発明の方法および組成物は、Cas9タンパク質またはそのトランケーションが機能的ドメインに融合した融合タンパク質もまた含む。一部の態様では、この機能的ドメインは、活性化ドメインまたは抑制ドメインである。他の態様では、この機能的ドメインは、ヌクレアーゼドメインである。一部の実施形態では、このヌクレアーゼドメインは、FokIエンドヌクレアーゼドメインである（例えば、Tsaï（2014年）Nature Biotech doi: 10.1038/nbt.2908）。一部の実施形態では、このFokIドメインは、二量体形成ドメイン中に突然変異を含む。

#### 【0028】

別の態様では、細胞（例えば、幹細胞）において内因性遺伝子（例えば、セーフハーバー遺伝子）中に配列を挿入するための方法が本明細書に記載され、この方法は、1または複数のヌクレアーゼを使用してこの内因性遺伝子を開裂させるステップおよびこの開裂部位中に配列を挿入するステップを含む。ある特定の実施形態では、任意の標的遺伝子中のゲノム配列は、例えば、本明細書に記載されるCRISPR/Cas系（または前記CRIPSR/Cas系をコードするベクター）、および標的化された開裂の後に遺伝子中に挿入される「ドナー」配列（「導入遺伝子」としても公知）を使用して、置き換えられる。このドナー配列は、CRISPR/Casベクター中に存在し得、別々のベクター（例えば、Ad、AAV、DNAミニサークルまたはLVベクター）中に存在し得、またはあるいは、異なる核酸送達機構を使用して細胞中に導入され得る。例えば、Casヌクレアーゼタンパク質をコードするmRNAは、エレクトロポレーションによって、所望のsgRNAと共に細胞中に導入され得る。標的遺伝子座（例えば、セーフハーバー遺伝子）中のドナーヌクレオチド配列の斯かる挿入は、標的遺伝子座の遺伝子制御エレメントの制御下での導入遺伝子の発現を生じる。一部の実施形態では、この導入遺伝子は、非コードRNA（例えば、shRNA）をコードする。幹細胞分化前の導入遺伝子の発現は、目的の非コードRNAを含む誘導体細胞を生じる。

#### 【0029】

一部の実施形態では、本発明の方法および組成物は、植物細胞において実施されるおよび/または植物細胞を含む。一部の態様では、これらの植物細胞は、成長点細胞である。一部の実施形態では、これらの植物細胞は、本発明のヌクレアーゼを含む。他の実施形態では、これらの植物細胞は、導入遺伝子をさらに含む。さらに別の態様では、植物細胞のゲノム中に1または複数の外因性配列を導入するための方法が本明細書に記載され、この方法は、（a）細胞を1または複数の外因性配列（ドナーベクター、導入遺伝子またはGOI）と接触させるステップ；および（b）この細胞において、本明細書に記載される1または複数のヌクレアーゼ（例えば、CRISPR/Cas系）を発現させるステップであって、この1または複数のヌクレアーゼが、染色体DNAを開裂させる、ステップ、を含み；その結果、ステップ（b）中の染色体DNAの開裂は、相同組換えによるゲノム中へのドナーベクターの取り込みを刺激する。複数の導入遺伝子が、同時に（並行して）組み込まれ得、またはこれらのステップは、導入遺伝子の逐次的付加（導入遺伝子スタッキング）のために反復され得る。

#### 【0030】

他の実施形態では、この導入遺伝子は、機能的タンパク質、例えば、グロビン（例えば、野生型ベータおよび/または野生型ガンマ）タンパク質を含む。他の実施形態では、この導入遺伝子は、望ましい品質での新規タンパク質の産生のための遺伝子操作された遺伝子をコードする。一部の実施形態では、内因性遺伝子中への目的の導入遺伝子の挿入は、インタクトな外因性タンパク質配列の発現を生じ、内因性遺伝子によってコードされる任意の配列を欠く。他の実施形態では、発現される外因性タンパク質は、融合タンパク質であり、導入遺伝子によってコードされるアミノ酸および内因性遺伝子（例えば、内因性標的遺伝子座由来）によってコードされるアミノ酸を含む。存在する場合、内因性配列は、外因性タンパク質のアミノ（N）末端部分および/または外因性タンパク質のカルボキシ（C）末端部分上に存在し得る。一部の態様では、このセーフハーバーは、AAVS1、

10

20

30

40

50

R o s a、H P R T、Z p 1 5 または C C R 5 遺伝子座から選択される（米国特許出願公開第20080299580号；第20080159996号；および第201000218264号ならびに米国特許出願第13/660,821号および第13/660,843号ならびに米国特許第8,329,986号を参照）。

【0031】

さらに別の態様では、ゲノム修飾された細胞株および／またはトランスジェニック生物、例えば動物モデル（系）が、本明細書に提供される。一部の実施形態では、このトランスジェニック細胞および／または生物（例えば、動物）は、ヒト遺伝子をコードする導入遺伝子を含む。一部の例では、このトランスジェニック動物は、外因性導入遺伝子に対応する内因性遺伝子座においてノックアウトを含み、それによって、ヒトタンパク質が単離状態で研究され得るin vivo系の開発を可能にする。斯かるトランスジェニックモデルは、小分子もしくは大きい生体分子または目的のヒトタンパク質と相互作用し得るもしくは目的のヒトタンパク質を修飾し得る他の実体を同定するために、スクリーニング目的で使用され得る。一部の実施形態では、本発明の細胞株は、医薬品開発における活性スクリーニングのための細胞ベースのアッセイにおいて使用されるが、他の実施形態では、これらの細胞株は、診断アッセイにおいて使用される。一部の態様では、この導入遺伝子は、本明細書に記載される方法のいずれかによって得られた幹細胞（例えば、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、造血幹細胞等）または動物胚中に、選択された遺伝子座（例えば、セーフハーバー）中に組み込まれ、次いで、この胚は、生きた動物が出生するように移植される。次いで、この動物は、性的成熟になるまで育てられ、子孫を生じるようになり、ここで、子孫の少なくとも一部は、編集された内因性遺伝子配列または組み込まれた導入遺伝子を含む。

10

20

30

40

50

【0032】

なおさらなる態様では、本明細書に記載される方法のいずれかに従って得られた細胞（例えば、植物細胞または哺乳動物細胞）もまた提供される。

【0033】

別の態様では、本明細書に記載される細胞（例えば、植物または動物）を含む生物（例えば、植物または動物）が、本明細書で提供される。

【0034】

別の態様では、本明細書に記載されるように得られた植物細胞を含む植物由来の種子が、本明細書で提供される。

【0035】

別の態様では、本明細書に記載されるように得られた植物細胞を含む植物から得られる果実が、本明細書で提供される。

【0036】

本明細書に記載される組成物（細胞または植物）または方法のいずれかでは、この植物細胞は、单子葉植物細胞または双子葉植物細胞を含み得る。ある特定の実施形態では、この植物細胞は、作物植物、例えば、コムギ、トマト（または他の果実作物）、ジャガイモ、トウモロコシ、ダイズ、アルファルファ等である。

【0037】

なおさらなる態様では、染色体の内因性遺伝子座（例えば、セーフハーバー遺伝子）中の、例えば、胚の染色体中への核酸配列の部位特異的組込みのための方法が、本明細書で提供される。ある特定の実施形態では、この方法は、（a）（i）組み込まれる核酸配列に隣接する上流配列および下流配列を含む、少なくとも1つのDNAベクターと、（ii）標的遺伝子座（例えば、グロビンまたはセーフハーバー遺伝子座）中の組込みの部位を認識するCRISPR/Cas系ヌクレアーゼをコードする少なくとも1つのRNA分子とを胚に注射するステップ、および（b）CRISPR/Cas系ヌクレアーゼの発現を可能にするために胚を培養するステップを含み、CRISPR/Cas系ヌクレアーゼによって組込みの部位中に導入された二本鎖切断は、染色体中に核酸配列を組み込むように、このDNAベクターとの相同組換えを介して修復される。

## 【0038】

本明細書に記載される方法のいずれかでは、C R I S P R / C a s 系をコードするポリヌクレオチドは、D N A、R N Aまたはそれらの組合せを含み得る。ある特定の実施形態では、このポリヌクレオチドは、プラスミドを含む。他の実施形態では、このヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、m R N Aを含む。

## 【0039】

本発明のC R I S P R / C a s 系を含むキットもまた提供される。このキットは、C R I S P R / C a s 系をコードする核酸（例えば、R N A分子または適切な発現ベクター中に含まれるC R I S P R / C a s 系コード遺伝子）、またはヌクレアーゼタンパク質のアリコート、ドナー分子、適切な宿主細胞株、本発明の方法を実施するための指示書などを含み得る。10

## 【0040】

これらおよび他の態様は、全体としての開示を踏まえて、当業者に容易に明らかとなる。。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0041】

疾患を研究および処置するため、または望ましい形質を有する植物の創出のためのゲノム遺伝子操作を含む、ゲノム遺伝子操作のための方法および組成物が、本明細書に開示される。本発明は、それを必要とする対象における疾患の処置または望ましい植物の作出を次いで生じる、1または複数の遺伝子の発現における好ましい変化が生じるような、任意の標的細胞のゲノム編集を記載する。疾患の非限定期には、遺伝性疾患（例えば、ヘモグロビン異常症、血友病、リソソーム蓄積症、囊胞性線維症等）、感染性疾患（例えば、H I V）、神経学的疾患（例えば、P D、H D等）、がんなどが含まれる。さらに、所望のタンパク質産物を発現するように変更された移植片における変更された幹細胞の送達は、疾患において同様に有益であり得る。変更された遺伝子発現を有する細胞株および生物（例えば、植物または動物）もまた記載される。本発明のs g R N Aを使用してC R I S P R / C a s 系によって標的化される遺伝子が、以下に記載される。記載されるような哺乳動物の遺伝子位置は、t h e G e n o m e B i o i n f o r m a t i c s G r o u p o f U C S a n t a C r u z によって作成されたU C S C G e n o m e B r o w e r、ソフトウェア著作権t h e R e g e n t s o f t h e U n i v e r s i t y o f C a l i f o r n i a に対してのものである。ヒトゲノム座標は、ヒトゲノムのG R C h 3 7 / h g 1 9 アセンブリにおいて提供され、二本鎖D N A上の数字に対応する。したがって、ゲノム座標によって記載される任意の位置は、( + )鎖もしくはW a t s o n 鎖のいずれかに対応するか、またはその対応する( - )鎖もしくはC r i c k 鎖を特定し得る。20

## 【0042】

例示的な標的には、ヘモグロビン異常症に関する遺伝子が含まれる。ヘモグロビンは、2つの様グロビン鎖および2つの様グロビン鎖および4つのヘム基を含むヘテロ四量体である。成人では、2 2 四量体は、ヘモグロビンA ( H b A ) または成人ヘモグロビンと呼ばれる。典型的には、アルファグロビン鎖およびベータグロビン鎖は、およそ1 : 1の比で合成され、この比は、ヘモグロビンおよびR B C の安定化に関して重要なようである。実際、1つの型のグロビン遺伝子が不適切に発現されるいくつかの場合には（以下を参照）、他の型のグロビンの発現を低下させて（例えば、特異的s i R N Aを使用する）、この1 : 1の比を回復することは、突然変異体の細胞表現型の一部の態様を軽減する（V o o n ら（2 0 0 8 年）H a e m a t o l o g i c a 9 3 卷（8 号）：1 2 8 8 頁を参照）。発生中の胎児では、異なる形態のヘモグロビン、ヘモグロビンAよりも酸素に対する高い結合親和性を有する胎児ヘモグロビン（H b F ）が産生され、その結果、酸素は、母親の血流を介して乳児の系に送達され得る。胎児ヘモグロビンもまた、2つのグロビン鎖を含むが、成人 - グロビン鎖の代わりに2つの胎児 - グロビン鎖を有する（ 2 2 ）。妊娠期間のおよそ3 0 週において、胎児における - グロビンの合成は4050

低下し始めるが、 $\alpha$ -グロビンの産生は増加する。およそ10カ月齢までに、新生児のヘモグロビンは、ほぼ全て $\alpha_2\beta_2$ であるが、一部のHbFは、成人期まで持続する（総ヘモグロビンのおよそ1~3%）。 $\alpha$ の産生から $\gamma$ の産生への切り替えの調節は、全く複雑であり、主に、 $\alpha$ -グロビン発現の同時の上方調節と共に、 $\alpha$ -グロビンの発現下方調節を含む。

#### 【0043】

ヘモグロビン鎖をコードする配列における遺伝的欠損は、鎌状赤血球貧血およびサラセミアを含む、ヘモグロビン異常症として公知のいくつかの疾患の原因であり得る。ヘモグロビン異常症を有する患者の大部分では、 $\alpha$ -グロビンをコードする遺伝子は存在したままであるが、発現は、上記のような出産周辺で生じる正常な遺伝子抑制に起因して比較的低い。

10

#### 【0044】

米国において5000人に1人が鎌状赤血球症（SCD）を有すると推定され、ほとんどがサハラ以南のアフリカの家系の人々である。マラリアに対する保護にとって鎌状赤血球ヘテロ接合性の利益が存在するようであり、したがって、この形質は、経時的に選択されてきた可能性があり、その結果、サハラ以南のアフリカでは、集団の3分の1が鎌状赤血球形質を有すると推定される。鎌状赤血球症は、バリンがアミノ酸番号6においてグルタミン酸を置換した（DNAレベルでは、GAGからGTG） $\alpha$ -グロビン遺伝子中の突然変異によって引き起こされ、得られたヘモグロビンは、「ヘモグロビン（hemoglobin S）または「HbS」と呼ばれる。低酸素条件下では、HbSのデオキシ形態は、EヘリックスとFヘリックスとの間でタンパク質上に疎水性パッチを露出させる。ヘモグロビン中のベータ鎖の6位におけるバリンの疎水性残基は、この疎水性パッチと会合することができ、HbS分子を凝集させ、線維状沈殿物を形成させる。これらの凝集物は、次いで、RBCの異常または「鎌状化」を引き起こし、細胞の柔軟性の損失を生じる。鎌状化しているRBCは、毛細血管床中に押し込められることはやできず、鎌状赤血球患者において血管閉塞性のクライシスを生じ得る。さらに、鎌状化したRBCは、正常なRBCよりも脆弱であり、溶血に向かう傾向があり、最終的に患者において貧血をもたらす。

20

#### 【0045】

サラセミアもまた、ヘモグロビンに関連する疾患であり、典型的には、グロビン鎖の低下した発現が関与する。これは、遺伝子の調節領域における突然変異を通じて、または低下した発現を生じるグロビンコード配列における突然変異から生じ得る。アルファサラセミアは、西アフリカおよび南アジアの家系の人々と関連し、マラリア抵抗性を付与し得る。ベータサラセミアは、典型的にはギリシャならびにトルコおよびイタリアの沿岸地域からの地中海家系の人々と関連する。サラセミアの処置は、通常、輸血および鉄キレート療法を含む。骨髄移植もまた、適切なドナーが同定できる場合には、重症サラセミアを有する人々の処置に使用されているが、この手順は、顕著なリスクを有し得る。

30

#### 【0046】

ベータグロビンをコードするヒトHBB遺伝子の修正は、本発明のCRISPR/Cas系を用いて達成され得る。開裂の好ましい位置は、HBB遺伝子配列を標的化することを含む（即ち、chr11：5246696~5248301またはその近傍）。鎌状アレルの遺伝子修正を達成するために、HbSアレル中のHBBの領域を標的化することが、特に好ましい。S.pyogenes Cas9系の使用のためには、鎌状アレルの修正のための、PAM部位が第11染色体：5248110、5248106、5248100、5248090、5248122、5248112上の位置またはその近傍にある配列を標的化することが、特に好ましい。ベータサラセミア（thalassemia）と関連するベータ-グロビンアレルの遺伝子修正のために、多くの潜在的標的が存在する。ベータサラセミアと関連する1つの周知の突然変異は、いわゆるIVS1.1突然変異であり、好ましい標的化領域は、HBB遺伝子配列のヌクレオチド1093~1192周辺である。PAM部位が第11染色体：5248170~5248171、524816

40

50

8 ~ 5 2 4 8 1 6 9、 5 2 4 8 1 6 7 ~ 5 2 4 8 1 6 8、 5 2 4 8 1 6 4 ~ 5 2 4 8 1 6  
5、 5 2 4 8 1 6 3 ~ 5 2 4 8 1 6 4、 5 2 4 8 1 5 5 ~ 5 2 4 8 1 5 6 および 5 2 4 8  
1 4 7 ~ 5 2 4 8 1 4 8 上の位置またはその近傍にある配列を標的化することが、最も好  
ましい。

## 【0047】

提唱された S C D およびベータサラセミアの両方の処置のための 1 つのアプローチは、異常な成人ヘモグロビンを H b F に機能的に置き換えることを目的として、 - グロビンの発現を増加させることである。上述のように、ヒドロキシウレアによる S C D 患者の処置は、増加する - グロビン発現に対するその影響に一部起因して、成功すると考えられる。 H b F 再活性化活性に影響を与えることが発見された化合物の第 1 の群は、細胞傷害性薬物であった。薬理学的操作によるガンマ - グロビンの de novo 合成を引き起こす能力は、実験動物において 5 - アザシチジンを使用して最初に示された (Desimone (1982 年) Proc Natl Acad Sci USA 79 卷 (14 号) : 4428 ~ 31 頁)。引き続く研究により、5 - アザシチジンが、 - サラセミアおよび鎌状赤血球症を有する患者において H b F を増加させる能力が確認された (Leyら (1982 年) N. Engl. J. Medicine, 307 卷 : 1469 ~ 1475 頁および Leyら (1983 年) Blood 62 卷 : 370 ~ 380 頁)。さらに、短鎖脂肪酸 (例えば、ブチレートおよび誘導体) は、実験系において、H b F を増加させることができている (Constantoulakisら (1988 年) Blood 72 卷 (6 号) : 1961 ~ 1967 頁)。上昇した量の H b F が成人期において持続する (HPFH ヘテロ接合体において 10 ~ 40 % (Theinら (2009 年) Hum. Mol. Genet 18 卷 (R2 号) : R216 ~ R223 頁を参照))、「遺伝性高胎児ヘモグロビン血症」 (HPFH) として公知の状態を有するヒト集団の区分が存在する。これは稀な状態であるが、任意の関連するベータグロビン異常の非存在下では、個体のヘモグロビンの 100 % が H b F である場合であっても、任意の顕著な臨床所見とは関連しない。ベータサラセミアを有する個体が、同時発生的 HPFH もまた有する場合、H b F の発現は、疾患の重症度を低下させ得る。さらに、鎌状赤血球症の天然過程の重症度は、患者毎に顕著に変動し得、この可変性は、一部、より軽度の疾患を有する一部の個体が、より高いレベルの H b F を発現するという事実に端を発し得る。

## 【0048】

H b F の発現を増加させるための 1 つのアプローチは、その産物が - グロビン発現の調節において役割を果たす遺伝子の同定を含む。1 つの斯かる遺伝子は、リンパ球発生におけるその役割に起因して最初に同定された、 B C L 1 1 A である。 B C L 1 1 A は、 - グロビン発現の段階特異的調節に関与すると考えられるジンクフィンガータンパク質をコードする。 B C L 1 1 A は、成人赤血球前駆体細胞において発現され、その発現の下方調節は、 - グロビン発現における増加をもたらす。 Sankaranら (2008 年) Science 322 卷、 1839 頁を参照されたい。このタンパク質は、 - グロビン遺伝子座と相互作用してその立体配置およびしたがって、異なる発生段階におけるその発現を変更するようである。さらに、別の調節タンパク質 K L F 1 (chr19 : 12995237 ~ 12998017 においてコードされる) が、 - グロビン発現の調節に関与するようである。 K L F 1 レベルは、 B C L 1 1 A レベルと正比例し、両方とも、 K L F 1 遺伝子のヘテロ接合性突然変異を有する H b F の持続性の発現を有するマルタ島の家族では、 - グロビンレベルと反比例することが見出されている (Borgら (2011 年) Haematologica 96 卷 (5 号) : 635 ~ 638 頁)。 K L F 1 遺伝子産物は、 in vivo で B C L 1 1 A 遺伝子と直接結合するようであり、したがって、その上方調節を担い得る (Borgら (2010 年) Nat Genet 42 卷 (9 号) : 801 ~ 805 頁; Bieker (2010 年) Nat Genet 42 卷 (9 号) : 733 ~ 734 頁; Zhouら (2010 年) Nat Genet 42 卷 (9 号) : 742 ~ 744 頁を参照)。したがって、 K L F 1 が B C L 1 1 A 発現を刺激する場合、 B C L 1 1 A の作用は、 - グロビンおよび H b F の产生の抑制を生じる。 B C L 1

10

20

30

40

50

1 A 遺伝子へと標的化された阻害的 RNA の使用が提唱されてきたが（例えば、米国特許出願公開第 20110182867 号を参照）、この技術は、いくつかの潜在的な欠点を有する、即ち、完全なノックダウンが達成されない可能性があり、斯かる RNA の送達に問題があり得、これらの RNA が継続的に存在しなくてはならず、生涯にわたって複数回の処置を必要とする。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイド RNA が KLF1 遺伝子または BCL11a 遺伝子を標的化するための配列を含む CRISPR/Cas 系を用いて SCD およびヘモグロビン異常症を処置するために使用され得る。二本鎖開裂を介した KLF1 遺伝子のノックアウトは、本発明の CRIPSR/Cas 系を介して達成され得る。標的化のための好ましい部位は、遺伝子の所望のノックアウトを得るために、エクソン 1、エクソン 2 およびエクソン 3 中に存在する。12994239～12999017、12997868～12998017 および 12996131～12996956 またはその近傍における第 19 染色体上の領域が、特に好ましい。12997877～12997912 またはその近傍における第 19 染色体の領域を標的化することが、特に好ましい。標的化に適切な配列の非限定的な例を、表 1 に示す。

10

## 【0049】

二本鎖開裂を介した BCL11A 遺伝子のノックアウトは、本発明の CRISPR/Cas 系および sgRNA を使用して達成され得る。BCL11A 遺伝子 (chr2:60684329～60780633) を標的化することが好ましい。エクソン配列（例えば、第 2 染色体：60780351～60780633（エクソン 1）、60773106～60773435、特に 60773362～60773400（エクソン 2）、60695867～60695968（エクソン 3）、60687817～60689559（エクソン 4）、60678302～60679801（エクソン 5）またはその近傍）において BCL11A 遺伝子を開裂させることもまた好ましい。BCL11A 遺伝子中のエンハンサー配列を標的化することが、特に好ましい（Bauer ら（2013 年）、Science 342 卷（6155 号）：253～7 頁を参照）。したがって、第 2 染色体 60725317～60725682、60722125～60722677 および 60718031～60718382 またはその近傍の配列を標的化することが、特に好ましい。

20

## 【0050】

ガンマグロビンの発現を変更させるための別のアプローチは、ガンマグロビンをコードする遺伝子（HBG1、第 11 染色体：5268501～5272087 上に位置する）上の調節部位を標的化することである。第 11 染色体：5271086～5271087 またはその近傍における転写開始部位を標的化することが好ましい。遺伝性高胎児ヘモグロビン血症を有する患者に起因して公知のいわゆる「HPFH」領域を標的化することが、特に好ましい（Thein ら（2009 年）Hum. Mol. Genet. 18 卷（R2 号）：R216～R223 頁を参照）。したがって、第 11 染色体：5272286～5272290、5272263～5272263 および 5272198～5272205 またはその近傍の配列を標的化することが、特に好ましい。

30

## 【0051】

アルファサラセミアもまた、特にアジアにおけるヒト集団において蔓延しており、ある型のアルファグロビン異常は、ヒトにおいて最も一般的な遺伝性障害であると考えられる。世界の熱帯および亜熱帯地域では、アルファグロビン障害は、集団の 80～90% において見出される（Harteveld および Higgs（2010 年）Orphanet Journal of Rare Diseases 5 卷：13 頁を参照）。

40

## 【0052】

ヒトは、第 16 染色体上にタンデムで 2 コピーのアルファグロビン遺伝子（1 および 2）を有しており、したがって、正常な二倍体細胞には、全て合わせて 4 コピーが存在する。2 遺伝子は通常、1 遺伝子よりも 2～3 倍多くの - グロビン mRNA を占める。これら 2 つの遺伝子のタンデムの組織化は、アルファサラセミア患者におけるアルファグロビン遺伝子の大きい欠失の高い蔓延と関連し得、ここで、一般に、非機能的なアル

50

ファグロビン遺伝子の数は、任意のアルファサラセミアの重症度と直接関連する（Chuら（2003年）Blood 101巻（3号）：791頁を参照）。1コピーの欠失は、かなり一般的なようであり（アフリカ系アメリカ人の30%、ならびにサウジアラビア、インドおよびタイに生きる人々の60~80%）、一般に、遺伝子検査が実施されない限り、個体において明白ではない。同じ染色体上（シス）であれ各染色体からの一方上（トランス）であれ、2コピーの欠失は、罹患患者に軽度の貧血を有させ得る。3つの-グロビン遺伝子が欠失される場合、その結果、個体は、機能している-グロビン遺伝子を1つだけ有し、中程度の貧血が見出されるが、より重要なことに、重要なグロビン対グロビンの比が破壊される。4つのベータ-グロビン鎖を含む4四量体は、多くの場合、HbHとして公知の状態、1つだけの機能的アルファ-グロビン遺伝子を有する患者において観察される。これらの4四量体は、酸素と結合できるが、末梢に酸素を放出せず、HbH疾患として公知の疾患を引き起こす。HbH疾患を有する個体は、短縮された半減期を有して溶血を容易に受けるRBCを有し、増加した貧血をもたらす。4つ全ての-グロビン遺伝子の損失は、通常は子宮内で致死である。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAがアルファグロビン遺伝子の調節領域を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてサラセミアを処置するために使用され得る。標的化に適切な配列の非限定的な例を、表1に示す。

### 【0053】

他の例示的な標的には、受容体、例えばウイルス受容体をコードする遺伝子が含まれる。HIVは、ヒトT細胞に感染する場合、細胞中への侵入を獲得するために、T細胞受容体CD4および2つの共受容体ケモカイン受容体CCR5またはCXCR4のうちの1つの会合に依存する。特にホモ接合性の情況でHIV感染に対して抵抗性であるように見えるヒト集団において、天然のCCR5バリアント（「CCR5-デルタ32」）が同定された。したがって、HIVがT細胞に感染しないようにし、最終的に、HIV感染患者においてT細胞死および減少した免疫機能をもたらさないようにするために、共受容体の一方または両方の破壊が、細胞をウイルスに対して抵抗性にするために達成され得る（米国特許第7,951,925号を参照）。現在、CCR5遺伝子をノックアウトするためにex vivoでCCR5遺伝子座においてHIV患者のT細胞が編集される臨床治験が、進行中である。次いで、これらの細胞は、HIVを処置するために、患者中に再導入される。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAがヒトCCR5遺伝子（chr3：46411633~46417697）、特にエクソン領域（chr3：46414394~46415452）またはその近傍を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてCCR5アレルを破壊するために使用され得る。ノックアウトのためにCCR5遺伝子を標的化するための1つの特に好ましい領域は、デルタ-32突然変異領域近く（chr3：46414923~46415020またはその近傍）の領域である。別の特に好ましい領域は、CCR5タンパク質の2番目の細胞外ループの一部をコードする、chr3：46414522~46414643周辺にある。ATGタンパク質翻訳開始部位またはその近傍（chr3：46414347~46414466またはその近傍）の領域もまた、ゲノム修飾、例えば、抗HIV療法のための標的化された組込みによるCCR5のN末端へのC34ペプチドの融合のために、特に好ましい。類似の研究が、CXCR4が選択的に破壊されるか、またはT細胞のHIV感染を予防するためにCCR5とタンデムで破壊される、CXCR4依存的HIVの動物モデルにおいて、進行中である（米国特許出願公開第20100291048号を参照）。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAがヒトCXCR4遺伝子（chr2：136871919~136875725）、特にエクソン2領域（chr2：136872439~136873482）またはその近傍、および小さいエクソン1を囲む領域（chr2：136875616~136875630）を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてCXCR4アレルを破壊するために使用され得る。ノックアウトのためにCXCR4遺伝子を標的化するための1つの好ましい領域は、CCR5遺伝子中のデルタ-32突然変異領域と類似したchr2：136872863~13

10

20

30

40

50

6 8 7 2 9 8 2 またはその近傍の領域である。エクソン 1 の A T G タンパク質翻訳開始部位に近い c h r 2 : 1 3 6 8 7 5 5 4 0 ~ 1 3 6 8 7 5 6 8 7 またはその近傍の領域が特に好ましく、エクソン 2 のスプライシング部位に近い c h r 2 : 1 3 6 8 7 3 3 8 9 ~ 1 3 6 8 7 3 5 5 8 またはその近傍の領域が、遺伝子修飾、例えば、抗 H I V 療法のための標的化された組込みによる C X C R 4 の N 末端への C 3 4 ペプチドの融合に、特に好ましい。したがって、s g R N A は、これらの好ましい標的化領域のうちの 1 または複数中の配列が含まれるがこれらに限定されない、C C R 5 または C X C R 4 遺伝子座中のいずれかの場所の配列に結合するように設計され得る。

## 【 0 0 5 4 】

目的の別の受容体は、グルココルチコイド受容体である（米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 1 8 8 0 0 0 号を参照）。特定の治療的処置におけるこの受容体のノックアウトは、グルココルチコイド受容体によって通常取り込まれるステロイドの使用を可能にする。したがって、この受容体は、第 5 染色体：1 4 2 6 4 6 2 5 4 ~ 1 4 2 7 8 3 2 5 4 またはその近傍を標的化するために本発明の s g R N A を使用する C R I S P R / C a s 系によって標的化され得る。例えば、第 5 染色体の 1 4 2 6 4 6 2 5 5 ~ 1 4 2 7 8 3 2 5 4 (エクソン 1)、1 4 2 7 8 2 7 7 6 ~ 1 4 2 7 8 3 2 5 4 (エクソン 2)、1 4 2 7 7 9 2 2 1 ~ 1 4 2 7 8 0 4 1 7 、および特に有用な 1 4 2 6 5 7 4 9 6 ~ 1 4 2 6 5 8 9 7 6 (エクソン 3)、1 4 2 6 9 3 5 6 7 ~ 1 4 2 6 9 3 7 3 3 (エクソン 4)、1 4 2 6 8 9 6 6 2 ~ 1 4 2 6 8 9 7 7 8 (エクソン 5)、1 4 2 6 8 0 0 5 0 ~ 1 4 2 6 8 0 3 2 8 (エクソン 6)、1 4 2 6 7 8 2 3 3 ~ 1 4 2 6 7 8 3 7 7 (エクソン 7)、1 4 2 6 7 5 0 2 5 ~ 1 4 2 6 7 5 1 5 5 (エクソン 8)、1 4 2 6 6 2 1 3 3 ~ 1 4 2 6 6 2 2 9 0 (エクソン 9) またはその近傍のエクソン配列を標的化することが、特に好ましい。

## 【 0 0 5 5 】

特異的ヌクレアーゼもまた、T 細胞の H I V 感染を予防するために H I V 受容体にペプチド融合インヒビターを挿入するように遺伝子操作され得（共同所有された米国特許出願公開第 2 0 1 2 0 0 9 3 7 8 7 号を参照）、斯かるペプチド融合インヒビターの一例は、C 3 4 またはフゼオンである。同様に、H I V は、ウイルスと闘うために細胞内のセーフハーバー遺伝子座中に抗 H I V 導入遺伝子を挿入するために遺伝子操作されたヌクレアーゼを使用することによって処置され得る。斯かる抗 H I V 遺伝子の例は、H I V ポリタンパク質を抑制するジンクフィンガー転写因子をコードする配列、H I V 受容体の発現を抑制するジンクフィンガー転写因子をコードする配列、C C R 5 リボザイム、H I V ポリタンパク質へと標的化された s i R N A 配列、T r i m 5 アルファ ( T r i m 5 ) 制限因子をコードする配列、A P O B E C 3 G 制限因子をコードする配列、R e v M 1 0 タンパク質をコードする配列、C 4 6 をコードする配列、他の抗 H I V 遺伝子、自殺カセットおよびそれらの組合せからなる群から選択され得る。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイド R N A が適切な抗 H I V 導入遺伝子の組込みのために C C R 5 または C X C R 4 遺伝子を標的化する配列を含む C R I S P R / C a s 系を用いて H I V を処置または予防するために使用され得る。標的化に適切な配列のさらなる非限定的な例を、表 1 に示す。

## 【 0 0 5 6 】

本明細書に記載されるゲノム編集は、任意の内因性標的に対して実施され得る。ある特定の実施形態では、ゲノム修飾（例えば、導入遺伝子組込み）は、「セーフハーバー」遺伝子においてである。ゲノム中の特定の「セーフハーバー」位置は、そのセーフハーバー遺伝子座において見出されるプロモーターを利用し得るかまたは挿入前に導入遺伝子に融合された外因性プロモーターによる導入遺伝子の発現調節を可能にし得るかのいずれかの導入遺伝子組込みのために、利用され得る。ヒト細胞における A A V S 1 ( P P P 1 R 1 2 C としても公知 ) および C C R 5 遺伝子、R o s a 2 6 およびアルブミン（共同所有された米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 2 9 9 5 8 0 号、第 2 0 0 8 0 1 5 9 9 9 6 号および第 2 0 1 0 0 0 2 1 8 2 6 4 号ならびに米国特許出願第 1 3 / 6 2 4 , 1 9 3 号および第 1 3 / 6 2 4 , 2 1 7 号を参照）、ならびに植物における Z p 1 5 ( 米国特許第 8 , 3 2 50

9, 986号を参照)を含む、いくつかの斯かる「セーフハーバー」遺伝子座が記載されている。外因性核酸または導入遺伝子の配列は、例えば、1もしくは複数の遺伝子またはcDNA分子、または任意の型のコード配列もしくは非コード配列、ならびに1もしくは複数の制御エレメント(例えば、プロモーター)を含み得る。さらに、この外因性核酸配列は、1または複数のRNA分子(例えば、小ヘアピンRNA(shRNA)、阻害的RNA(RNAi)、マイクロRNA(miRNA)等)を产生し得る。この外因性核酸配列は、細胞のゲノム(例えば、第19染色体、即ち、chr19:55602840~55624858上に存在するPPP1R12C遺伝子)中に組み込まれるように、細胞中に導入される。外因性配列の組込みは、相同性依存的機構および相同性非依存的機構の両方を通じて進行し得る。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAがセーフハーバー遺伝子を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてセーフハーバー遺伝子座中に導入遺伝子を挿入するために使用され得る。標的化に適切な配列の非限定的な例を、表1に示す。

#### 【0057】

上記のように、このセーフハーバーに特異的なヌクレアーゼ(例えば、CRISPR/Cas)は、HDR駆動性の過程またはNHEJ駆動性の過程のいずれかによって導入遺伝子構築物が挿入されるように、利用され得る。ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Hprt)は、Hprt1遺伝子(chrX:133594175~133634698)によってコードされる、プリン代謝に関与する酵素である。Hprt1は、X染色体上に位置し、したがって、雄性においては單一コピーで存在する。Hprt1は、5'-ホスホリボシル-1-ピロホスフェートから5'-ホスホリボシル(phosphoribosyl)基をプリンに転移させることによって、ヒポキサンチンのイノシン-リリン酸への変換およびグアニンのグアノシン-リリン酸への変換を触媒するトランスフェラーゼをコードする。この酵素は、新たなプリン合成における使用のために、分解されたDNAからプリンをサルベージするように、主に機能する。6-TGの存在下では、Hprtは、細胞中のDNAおよびRNA中への6-TGの組込みを担う酵素であり、適切なポリヌクレオチドの合成および代謝の遮断を生じる。したがって、6-TGは、機能的Hprt酵素を用いて細胞を殺滅するための選択剤として使用され得、さらに、6-TGは、それを必要とする対象において軽度の免疫除去(immunoblaltung)を引き起こすために与えられ得る。幹細胞移植片(例えば、造血幹細胞または前駆幹細胞)を受けている患者では、目的の導入遺伝子が、Hprt遺伝子座中に組み込まれ得、Hprt1遺伝子をノックアウトする。斯かる細胞集団は、6-TG毒性に対して抵抗性となる。したがって、導入遺伝子(+)/Hprt1(-)細胞が患者に注入される場合、穏やかな過程の6-TGは、細胞の生着を増加させ得、生着する細胞は、より大きいパーセンテージの導入遺伝子組込みを有することになる。

#### 【0058】

Hprtは、導入遺伝子組込みのためのセーフハーバーとして伝統的に標的化されてきた(例えば、Jasinら(1996年)Proc Natl Acad Sci USA 93巻、8804頁を参照)。Hprtは、低レベルで構成的に発現され、このHprt遺伝子の破壊は、6-TGを使用してin vitroおよびin vivoの両方で選択され得る。しかし、ランダム組込みによるHprt遺伝子座中への組込みは、困難であり得、低頻度でのみ生じる。特異的ヌクレアーゼの使用は、Hprt遺伝子座の改善された標的化を可能にする。したがって、本発明の方法および組成物は、本発明の単一ガイドRNAがセーフハーバー遺伝子を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてHprt遺伝子座中に導入遺伝子を挿入するために使用され得る。Hprt遺伝子(chrX:133594175~133634698)を標的化することが好ましい。イントロン1中の配列(X染色体:133597660~133597662、133603544~133603546および133604282~133604284またはその近傍)を標的化することが、特に好ましい。エクソン3、特にX染色体:133609240~133609242またはその近傍において、開裂することもまた好まし

い。別の好ましい位置は、X染色体：133627552～133627554またはその近傍において、酵素の活性ドメイン中に存在する。したがって、sgRNAは、これらの好ましい標的化領域のうちの1または複数中の配列が含まれるがこれらに限定されない、Hprt遺伝子座中のいずれかの場所の配列に結合するように設計され得る。標的化に適切な配列のさらなる非限定的な例を、表1に示す。

#### 【0059】

本発明の方法および組成物を用いて標的化する別の有用な遺伝子は、IL2受容体共通ガンマ鎖(IL2RG)遺伝子によってコードされる、chrX：70327254～70331481またはその近傍)。IL2RGタンパク質は、いくつかのサイトカイン受容体における共通受容体鎖であり、この遺伝子における突然変異は、X連鎖重症複合免疫不全(「X-SCID」)と関連する。したがって、遺伝子修正を容易にするために本発明のCRISPR/Cas系およびsgRNAを用いてこの遺伝子を標的化することは、X-SCID患者にとって有益である。エクソン1の末端近く(chrX：70331274～70331276またはその近傍)を標的化することが好ましい。X染色体：70331196～70331198もしくはその近傍のイントロン1、またはX染色体：70329158～70329160もしくはその近傍のエクソン5を標的化することが、特に好ましい。

10

#### 【0060】

アルブミン遺伝子は、肝臓において高度に発現される。したがって、特異的ヌクレアーゼを使用した内因性アルブミン遺伝子座中への導入遺伝子の挿入は、その導入遺伝子によってコードされるタンパク質または遺伝子産物の高レベルの発現を生じ、これらはまた、血流中に分泌され得る。この導入遺伝子は、治療的利益を提供するものを含む、任意のタンパク質またはペプチドをコードし得る。例えば、この導入遺伝子は、血液の障害、例えば凝固障害、および種々の他の一遺伝子性疾患に関するタンパク質をコードし得る。この導入遺伝子は、導入遺伝子の発現がアルブミンの発現制御エレメントによって制御されるように、内因性アルブミン遺伝子座中に挿入され得、導入遺伝子がコードするタンパク質の高濃度での肝臓特異的発現を生じる。発現され得るタンパク質には、凝固因子、例えば、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、vWFなど、抗体、リソソーム蓄積(lysosomal storage)に関連するタンパク質、インスリン、アルファ1-アンチトリプシン、およびそうして発現された場合に利益を提供する実際に任意のペプチドまたはタンパク質が含まれ得る。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAがアルブミン遺伝子(chr4：74269972～74287129またはその近傍)を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてアルブミン遺伝子中に導入遺伝子を挿入するために使用され得る。好ましい標的是、例えば、chr4：74270073～74270883またはその近傍(エクソン1、特に好ましい、最も好ましくは第4染色体：74270385～74270485)、74270840～74272396(エクソン2、特に好ましくは第4染色体：74270840～74272396またはその近傍)、74272428～74274361(エクソン3)、74274472～74275122(エクソン4)、74275154～74276079(エクソン5)、74276076～74277763(エクソン6)、74277792～74279187(エクソン7)、74279301～74280802(エクソン8)、74280834～74282023(エクソン9)、74282020～74283298(エクソン10)、7428336～74283855(エクソン11)、74283978～74285274(エクソン12、特に好ましい)、74285306～74286021(エクソン13、特に好ましい)および74285988～74286859(エクソン14、特に好ましい)におけるエクソン配列中の標的である。したがって、sgRNAは、これらの好ましい標的化領域のうちの1または複数中の配列が含まれるがこれらに限定されない、アルブミン遺伝子座中のいずれかの場所の配列に結合するように設計され得る。標的化に適切な配列のさらなる非限定的な例を、表1に示す。

20

30

40

50

## 【0061】

リソソーム蓄積症（LSD）は、老廃脂質、糖タンパク質およびムコ多糖の分解に通常は関与する機能的な個々のリソソームタンパク質の欠如を特徴とする稀な代謝性一遺伝子性疾患の群である。これらの疾患は、細胞におけるこれらの化合物の蓄積を特徴とするが、それは、特異的酵素の誤機能に起因して、リサイクルのためにそれらをプロセシングすることができないからである。最も一般的な例は、ゴーシェ病（グルコセレブロシダーゼ欠損症 - 遺伝子名：GBA）、ファブリー病（ガラクトシダーゼ欠損症 - GLA）、ハンター病（イズロン酸 - 2 - スルファターゼ欠損症 - IDS）、ハーラー病（アルファ-Lイズロニダーゼ欠損症 - IDUA）およびニーマン・ピック病（スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ1欠損症 - SMPD1）である。全てを一緒にまとめた場合、LSDは、7000の出生中約1人の、集団における発生率を有する。これらの疾患は、これらに罹患した者に対して破壊的な影響を有する。これらは、特徴的な顔面および身体の成長パターンを有し得、中程度から重度までの精神遅滞を有し得る乳児において、通常は最初に診断される。処置選択肢には、通常は大用量で静脈内注射を通じて失われている酵素が患者に与えられる、酵素補充療法（ERT）が含まれる。斯かる処置は、これらの症状を処置するだけであって治癒的ではなく、したがって、患者は、その残りの人生にわたってこれらのタンパク質の反復投薬を与えられなければならず、潜在的に、注射されたタンパク質に対する中和抗体を発達させ得る。多くの場合、これらのタンパク質は、短い血清半減期を有し、したがって、患者は、このタンパク質の頻繁な注入にも耐えなければならない。例えば、Cerezyme（登録商標）製品（イミグルセラーゼ）を受けているゴーシェ病患者は、1週間に3回の注入を有さなければならない。酵素の産生および精製にも問題があり、したがって、これらの処置は、非常に費用がかかる（患者1人当たり年間 > 100,000ドル）。したがって、本発明の特異的ヌクレアーゼは、発現およびLSDの処置のために、アルブミンなどのセーフハーバー遺伝子座中に、リソソーム蓄積症に関するタンパク質の失われている野生型バージョンをコードする遺伝子を挿入するために、使用され得る。

10

20

30

40

## 【0062】

血友病Bは、関節および軟組織中の出血、ならびに外傷を受けていたりまたは手術を受けている任意の部位中の過剰な出血を特徴とする、血液凝固系の遺伝性障害である。血友病Bは、血友病Aから臨床的に識別不可能であるが、第VII因子（FVII）は、血友病Aにおいて欠損しているかまたは存在せず、第IX因子（FIXまたはF.IX）は、血友病Bを有する患者において欠損しているかまたは存在しない。第IX因子は、凝固系に関するセリンプロテアーゼの1つをコードし、野生型第IX因子タンパク質の正常な循環レベルの3%の回復であっても、自発的出血を予防できることが示されている。

## 【0063】

機能的FIXタンパク質をコードするプラスミドおよび他のベクター（例えば、AAV）の導入を含む、肝臓指向性の遺伝子療法プロトコールおよび直接的筋内注射を含む遺伝子療法が、血友病Bの処置のために記載してきた。例えば、米国特許第6,936,243号；Leeら（2004年）Pharm. Res. 7巻：1229～1232頁；Grahamら（2008年）Genet Vaccines Ther. 3巻：6～9頁を参照されたい。しかし、これらのプロトコールでは、阻害的抗第IX因子（抗FIX）抗体および送達ビヒクリに対する抗体の形成が、依然として、血友病BのためのFIXタンパク質補充ベースの処置の主要な合併症である。したがって、内因性第VII因子もしくは第IX因子遺伝子を修正するためまたはセーフハーバー遺伝子座中にこの遺伝子の野生型コピーを導入するための、設計されたヌクレアーゼおよび関連技術の使用は、処置された患者において凝固活性を回復できる。第VII因子遺伝子のための好ましい標的化領域は、chrX：154064064～154250998に位置する遺伝子配列またはその近傍にある。第VII因子遺伝子を標的化するために特に好ましいのは、インtron 22の領域であり、ここは、chrX：154091503～154124

50

351 またはその近傍に位置する、重症血友病A患者におけるFVIIIA突然変異の最大50%を占める一般的な逆位事象の部位である。第IX因子(F.IX)遺伝子について、標的化に好ましいのは、chrX:138,612,895~138,645,617またはその近傍に位置する遺伝子配列である。例えば、chrX:138613760~138613816、chrX:138618832~138618887および/もしくはchrX:138613815~138613872またはその近傍における、インtron 1中の領域中の標的が、特に好ましい。したがって、sgRNAは、これら的好ましい標的化領域のうちの1または複数中の配列が含まれるがこれらに限定されない、第VIIIA因子または第IX因子の遺伝子座中のいずれかの場所の配列に結合するように設計され得る。

10

## 【0064】

パーキンソン病(PD)は、世界中でおよそ400万~600万人に罹患する神経変性疾患である。米国では、100,000人当たりおよそ100~200人が、PDを有する。PDの有病率は、高齢集団において増加し、80歳を超える人々のおよそ4%がこの疾患に罹患しているが(Davie(2008年)Brit Med Bull 86巻(1号)109頁)、患者の10%は、40歳未満である(Kumari(2009年)FEBS J. 276巻(22号)6455頁)。

## 【0065】

多くの因子が、PDの疾患発症および/または進行において役割を果たし得るようである。例えば、ロイシンリッチリピートキナーゼ2遺伝子(LRRK2、PARK8としても公知)における遺伝子突然変異は、PDの家族性形態および孤発性形態の両方に関与することが同定されている。実際、研究により、LRRK2突然変異が、家族性PDの5~13%の間、および孤発性PDの1~5%を担い得ることが示唆されている。このタンパク質自体は、以下の公知のドメインを含む大きい(>280kD)マルチドメインタンパク質である:アルマジロ(ARM)、アンキリン(ANK)、LRR、複合体タンパク質のRas(Ras of complex proteins)(ROC)、ROCのC末端(C-terminal of ROC)(COR)、マイトジエン活性化タンパク質キナーゼキナーゼおよびWD40。したがって、LRRK2は、いくつかのタンパク質-タンパク質相互作用的ドメイン(ARM/ANK、LRRおよびWD40)を含み、これは、LRRK2が、タンパク質複合体形成において役割を果たすことを示唆する(Kumari、同書)。突然変異のいくつかのクラスターが、遺伝子のその長さにわたって同定されており、病理学的突然変異の大部分は、このタンパク質の酵素ドメインにおいてクラスター化する。

20

## 【0066】

具体的には、LRRK2突然変異G2019Sは、いくつかの民族性においてPDにおいて重要な役割を果たすことが示唆されている。この突然変異は、常染色体優性であり、この突然変異についての生涯浸透率は、31.8%であると推定されている。患者におけるこのミスセンス突然変異を担うSNPは、ヒトゲノムにおいてrs34637584とアノテーションされ、ゲノムレベルではGからAへの置換(6055G>A)である。このLRRK2突然変異は、G2019Sまたは6055G>Aのいずれかと呼ばれ得、chr12:40734202またはその近傍において見出される。このG2019S突然変異は、LRRK2キナーゼ活性を増加させることができており、このタンパク質の活性化ドメインまたはタンパク質キナーゼ様ドメイン内に見出される(Luzon-Toro(2007年)Hum Mol Genet 16巻(17号)2031頁)。したがって、特異的ヌクレアーゼが、PDの処置のために、LRRK2遺伝子中の突然変異を修正するために使用され得る。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAがLRRK2遺伝子を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてLRRK2遺伝子を修正するために使用され得る。chr12:40734202~40734202またはその近傍を標的化するように設計されたsgRNAが、特に好ましい。標的化に適切な配列の非限定的な例を、表1に示す。

30

40

50

## 【0067】

三塩基リピート伸長障害は、1990年代初めに最初に特徴付けられた（Di ProsperoおよびFischbeck（2005年）Nature Reviews Genetics 6巻：756～765頁を参照）。これらの障害は、3ヌクレオチドのセットの不安定なリピートの局在的伸長を含み、このリピートが存在する遺伝子の機能損失、毒性機能の獲得、またはそれら両方を生じ得る。三塩基リピートは、非コード遺伝子領域およびコード遺伝子領域を含む、遺伝子の任意の部分に位置し得る。コード領域内に位置するリピートは、典型的に、反復されたグルタミンコードトリプレット（CAG）またはアラニンコードトリプレット（CGA）のいずれかを含む。非コード配列内の伸長されたりピート領域は、遺伝子の異常な発現をもたらし得、コード領域内の伸長されたりピート（コドン反復障害としても公知）は、ミスフォールディングおよびタンパク質凝集を引き起こし得る。

10

## 【0068】

ハンチントン舞蹈病としても公知のハンチントン病（HD）は、運動障害、認知障害および精神医学的障害の、進行性の障害である。この疾患の発症の平均年齢は、35～44歳であるが、症例の約10%では、発症は21歳前に生じ、この疾患の診断後の平均寿命は、15～18年である。有病率は、西欧の家系の100,000人のうち約3～7人である。この疾患は、内因性ハンチントン（Huntington）遺伝子（Htt、chr4：3076237～3245687）中のCAGリピート領域の伸長と関連する。正常なHttアレルは、15～20のCAGリピートを含むが、35またはそれ超のリピートを含むアレルは、潜在的にHD原因アレルとみなされ得、疾患を発達させるリスクを与える。36～39リピートを含むアレルは、不完全に浸透性とみなされ、これらのアレルを有する個体は、この疾患を発達させてもさせなくてもよい（または、高齢期に症状を発達させ得る）が、40またはそれ超のリピートを含むアレルは、完全に浸透性とみなされ、この多くのリピートを有するHDアレルを含む無症候性の個人は報告されていない。若年発症型HD（<21歳）を有する個体は、多くの場合、60またはそれ超のCAGリピートを有することが見出されている。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAが伸長されたHtt遺伝子を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてHttアレルを破壊するために使用され得る。3071604～3081660またはその近傍で第4染色体を標的化することが、特に好ましい。本発明の方法および組成物は、抑制ドメインを含むCRISPR/Cas系融合タンパク質を使用して、突然変異体Httアレルを選択的に抑制するためにも使用され得る。標的化に適切な配列の非限定的な例を、表1に示す。

20

30

## 【0069】

網膜色素変性症（RP）とは、不治の盲目をもたらす、世界中で200万人に罹患する遺伝性疾患の多様な群を指す。RPは、遺伝性網膜変性の最も一般的な形態の1つであり、その突然変異がRPをもたらし得る複数の遺伝子が存在する。杆体光受容体において発現される44の遺伝子において100よりも多い突然変異がこれまでに同定されており、これは全ての型の網膜変性の15%を占め、そのほとんどはミスセンス突然変異であり、通常は常染色体優性である。

40

## 【0070】

ロドプシンは、光の知覚における最初の事象に関与する網膜の色素である。これは、網膜補因子に共有結合したタンパク質部分オプシンで構成される。ロドプシンは、RHO遺伝子（chr3：129247482～129254187）によってコードされ、このタンパク質は、およそ40kDの分子量を有し、杆体細胞の膜を貫通する。この網膜補因子は、光が網膜に入る際に光を吸収し、光励起され、分子立体配置における変化を受けて、オプシンから解離する。この変化は、最終的に、電気インパルスを視神経に沿って脳に送る過程を開始させる。RPに関して、ヒトにおける全ての常染色体優性網膜色素変性症（ADRP）の30%を占めるロドプシン遺伝子中の80よりも多い突然変異が同定されている（Dryjaら（2000年）Invest Ophthalmol Vis Sci 50

i 41巻：3124～3127頁）。ヒトロドプシン遺伝子中の3つの点突然変異（タンパク質配列においてP23H、Q64XおよびQ344Xをもたらす）が、ヒトにおいてADRPを引き起こすことが公知である。例えば、Olssonら（1992年）Neuron 9巻（5号）：815～30頁を参照されたい。P23H突然変異は、米国において最も一般的なロドプシン突然変異である。タンパク質フォールディングに関する問題に起因して、P23Hロドプシンは、in vitroで網膜と部分的にのみ再構成し（Liulà（1996年）Proc Nat'l Acad Sci 93巻：4554～4559頁）、トランスジェニックにおいて発現される突然変異体ロドプシンは、網膜変性を引き起こす（Gotoら（1995年）Invest Ophthalmol Vis Sci 36巻：62～71頁）。したがって、本発明の方法および組成物は、单一ガイドRNAがヒトRHO遺伝子（chr3：129247482～129254187またはその近傍）を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてRHOアレルを破壊するために使用され得る。特定の位置でRHOを標的化することは、遺伝子修正を容易にするために有用である。好ましい標的位置には、エクソン1（P23HまたはQ64X突然変異と関連する配列を修正するために、chr3：129247577～129247937またはその近傍）およびエクソン5（chr3：129251376～129251615またはその近傍）が含まれる。標的化に適切な配列の非限定的な例を、表1に示す。

10

## 【0071】

囊胞性線維症（CF）およびサーファクタントタンパク質B（SP-B）欠損症などの遺伝性障害を含む肺疾患は、小児集団において、いまだ問題となっている。SP-B欠損症は、タンパク質および脂肪分子が肺の遠位部分に蓄積し、呼吸に影響を与える稀な肺疾患である。この疾患は、出生後の肺機能およびホメオスタシスにとって不可欠な両親媒性サーファクタントタンパク質である肺関連サーファクタントBタンパク質（SPB）をコードするSFTPB遺伝子（chr2：85884440～85895374またはその近傍に位置する）における欠損に主に起因した、肺サーファクタントタンパク質Bの欠損によって引き起こされる。SP-B欠損症における最も一般的な突然変異は、「GAA」へと変換されるmRNA中の131位におけるヌクレオチド「C」（ゲノム配列中、これは、375C-GAAに対応し、エクソン4中に位置する）をもたらす、「121ins2」と称される突然変異である。したがって、本発明の方法および組成物は、chr2：85884440～85895374またはその近傍のSFTPB遺伝子、最も好ましくは、エクソン4（chr2：85893740～85893865またはその近傍）へと、本発明のsgRNAを使用してCRISPR/Cas系を標的化するために使用され得る。

20

## 【0072】

CFは、1500～4000の生児出生中1人に罹患する常染色体劣性障害であり、最も一般的な遺伝性小児障害の1つである。CFにおける主な欠損は、囊胞性線維症膜コンダクタンス調節因子（CFTR）遺伝子（chr7：117120017～117308718に位置する）によってコードされるクロライドチャネルタンパク質によって輸送される上皮クロライドの調節における欠損である。例えば、Keremら（1989年）Science 245巻：1073～1080頁；Kredaら（2005年）Mol Biol Cell 16巻：2154～2167頁を参照されたい。CF患者において観察される突然変異の約70%は、CFTRのヌクレオチド配列における3塩基対の消失から生じ、このタンパク質中の508位に位置するアミノ酸フェニルアラニンの損失を生じる（F508と呼ばれる突然変異、（エクソン11中に位置する）。野生型ゲノムでは、アミノ酸507は、イソロイシンであり、Gが遺伝子中のヌクレオチド1652であるコドンTAGによってコードされる。アミノ酸508は、AAAによってコードされるフェニルアラニンである。508突然変異では、507コドンからのGは、508コドンの最初の2つのAと共に消失され、その結果、この突然変異は、消失された507～508コード位置において配列TAAを有する。TAAは、イソロイシンもまたコードする

30

40

50

が、野生型 508 位におけるフェニルアラニンは損失される。I507 欠失について、506 位または 507 位のいずれかのイソロイシンが欠失される。この突然変異について、1648～1650 もしくは 1651～1653 におけるヌクレオチドが損失され、またはそのいくつかの組合せは、得られたタンパク質中にイソロイシンを 1 つだけ生じる。複合（ヘテロ接合性）突然変異（F508 および I507）もまた報告されている。例えば、Orozcoら（1994 年）Am J Med Genet. 51巻（2 号）：137～9 頁を参照されたい。複合ヘテロ接合性 I507 / F508 またはホモ接合性 F508 / F508 のいずれかの CF 患者は、完全にグリコシル化された CFTR タンパク質を発現できず、部分的にグリコシル化されたタンパク質は、CFTR 機能に必要とされるようには細胞表面上で発現されない（例えば、Kredaら（2005 年）Mol Biol Cell 16巻：2154～2167 頁；Chengら（1990 年）Cell 63巻：827～834 頁を参照）。1 つのアレルのみにおいて I507 または F508 CFTR 突然変異のいずれかを有する個体（即ち、wt / I507 または wt / F508）は、CF キャリアであり、肺細胞機能における欠損を示さない。例えば、Keremら（1990 年）Proc Natl Acad Sci U S A 87巻：8447～8451 頁を参照されたい。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイド RNA がヒト CFTR 遺伝子を標的化するための配列を含む CRISPR/Cas 系を用いて CFTR アレルを破壊または修正するために使用され得る。chr7：117227793～117227887 またはその近傍が、標的化に特に好ましい。標的化に適切な配列の非限定的な例を、表 1 に示す。

10

20

30

40

50

## 【0073】

筋ジストロフィーは、筋肉群の進行性の変性および衰弱を特徴とする疾患である。1 つの周知の筋ジストロフィーは、3500 人の少年のうち 1 人に罹患する X 連鎖疾患である、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。これは、個々の筋肉細胞におけるタンパク質ジストロフィンの欠如によって引き起こされ、症状は、小児がおよそ 3 歳のときに最初に出現し、疾患の重症度に依存して、患者が 20 代になったときに死が生じ得る。ジストロフィン、DMD をコードする遺伝子（chrX：31137345～33229673 またはその近傍に位置する）は、非常に大きく、14 kb の mRNA をコードする 79 個のエクソンを含む 2.4 メガベースの DNA をカバーする。機能的ジストロフィンを欠く患者では、およそ 40% が、コード配列中のフレームシフトを引き起こす点突然変異を有し、その結果、翻訳の間に、未成熟な停止が起こると、トランケートされたタンパク質または非機能的タンパク質の産生を生じることになる。残りの 60% は、フレームの変更も生じ、同様に非機能的タンパク質の産生を生じる、大きな挿入または欠失を有する（Nowak および Davies（2004 年）EMBO Reports 5巻（9 号）：872～876 頁）。非機能的ジストロフィンを有する患者は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）としても公知の最も重症な疾患を有する。その突然変異が、野生型と比較して機能の低いジストロフィンタンパク質を生じる、ジストロフィンの内部部分をコードする領域の遺伝子欠失を特徴とする他の患者は、ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）と呼ばれるあまり重症でない疾患を有し得る。BMD 患者は、50 代まで生存することが知られている。DMD 遺伝子を標的化することは、点突然変異の遺伝子修正のためまたは mRNA 転写物のスプライシングパターンを変化させるために有用であり得、細胞に機能的ジストロフィンタンパク質を産生させる。したがって、sgRNA は、chrX：31137345～33229673 またはその近傍において、DMD 遺伝子座中のいずれかの場所の配列に結合するように設計され得る。養子免疫治療は、腫瘍抗原に対し高アビディティ（avidity）TCR を保有する CTL のある特定の亜集団の高度に特異的な T 細胞刺激の達成と、ex vivo におけるその刺激および増大と、続く患者へのその導入を実施することである。養子免疫治療は、腫瘍特異的細胞の注入前に患者から天然のリンパ球を取り出す場合に特に有効である。この種類の治療法を支える考えとは、高アビディティ CTL の導入が成功すれば、腫瘍が排除されると、これらの細胞の一部が、がんが再出現する場合に備えてメモリー T 細胞として残り、患者中に存続することである。

。しかし、宿主T細胞に何らかのTCR導入遺伝子を移入すると、それに伴いほとんどの遺伝子移入方法に関する懸念、即ち、TCR導入遺伝子発現力セットの調節されない予測不可能なゲノム挿入がしばしば低レベルでも発生する。このような所望の導入遺伝子の十分に制御されない挿入は、周囲の遺伝子における導入遺伝子の効果と共に、隣接遺伝子からの効果による導入遺伝子のサイレンシングを引き起こす可能性がある。加えて、導入されたTCR導入遺伝子と共に遺伝子操作されたT細胞において共発現される内因性TCR遺伝子は、内因性TCRにより認識される抗原によるT細胞の不要な刺激や、新規認識特性を有する新規TCR複合体を生じる内因性TCRサブユニットとTCR導入遺伝子との誤対合による、意図されない抗原によるT細胞の不要な刺激を引き起こし得る、あるいは内因性TCRタンパク質と導入遺伝子コードTCRサブユニットとのヘテロ二量体形成による不活性TCRの生成による目的の抗原に対する最適以下の刺激をもたらし得る。実際には、内因性および外因性の鎖の誤対合による自己反応性TCRの形成に起因する重篤な自己免疫性毒性のリスクは、近年、マウスモデル(Bendleら(2010年)Nature Medicine 16巻:565~570頁)およびヒト細胞(van Loenenら(2010年)Proc Natl Acad Sci U S A 107巻:10972~7頁)で取り上げられている。その上、腫瘍特異的TCRは、細胞表面における複合体の発現に必要とされるCD3分子をめぐって内因性および誤対合したTCRと競合するため、細胞表面に最適以下のレベルで発現され得る。低いTCR発現は、トランスジェニックT細胞のアビディティーおよび有効性に影響を与える。T細胞中への導入のための高親和性TCRを作製するために使用され得る標的的例は、WT1およびNEYEsである。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAがヒトTCRアルファ(TRACまたはTCRA、chr6:42883727~42893575またはその近傍に位置する)またはベータ(TRBCまたはTCRB、chr7:142197572~142198055またはその近傍に位置する)遺伝子を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いて内因性TCR遺伝子を破壊または修正するために使用され得る。標的化に適切な配列の非限定的な例を、表1に示す。

#### 【0074】

プログラム死受容体(PD1またはPD-1、PDCD1としても公知)は、T細胞活性化と慢性抗原に応答したT細胞寛容との間のバランスを調節することに関与することが示されている。T細胞活性化に際して、PD1発現が、T細胞において誘導される。PD1受容体に対するリガンドは、PD1リガンド(B7-H1およびCD272としても公知のPDL1)およびPDL2(B7-DCおよびCD273としても公知)であり、通常は、抗原提示細胞および末梢において発現される。PD1-PDL(PD1リガンド)カップリングは、T細胞の不活性化を引き起こし、T細胞寛容の誘導に関与する(Paradise(2012年)Nat Rev 12巻:252頁を参照)。HIV1感染の間に、PD1の発現は、CD4+T細胞において増加することが見出されており、PDL1発現は、抗原提示細胞(APC)上で増加され、T細胞阻害とT細胞刺激との間のバランスをT細胞阻害に向けて傾ける(Freemanら(2006年)J Exp Med 203巻(10号):2223~2227頁を参照)。PD1の上方調節は、T細胞機能不全がHIV感染の場合と同様の慢性抗原曝露の存在下で観察される場合、T細胞疲弊(重要なエフェクター機能の進行性の損失として規定される)に何らかの形で縛られると考えられる。PD1の上方調節は、慢性ウイルス感染の間にこれらの同じセットの細胞における増加したアポトーシスとも関連し得る(Petrovassら(2009年)J Immunol. 183巻(2号):1120~32頁を参照)。PD1は、免疫監視からの腫瘍特異的逃避においても役割を果たし得る。PD1は、慢性骨髓性白血病(CML)および急性骨髓性白血病(AML)の両方において、腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)において高度に発現されることが実証されている。PD1はまた、メラノーマ浸潤Tリンパ球(TIL)において上方調節される(Dotti(2009年)Blood 114巻(8号):1457~58頁を参照)。腫瘍は、PD1リガンドPDL1を発現することが見出されており、または、より稀には、CTLにおけるPD1の上方調節

10

20

30

40

50

と組み合わせた場合にT細胞機能性における損失およびCTLが有効な抗腫瘍応答を媒介できないことにおける寄与因子であり得るPD1リガンドPDL2を発現することが見出されている。研究者は、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス(LCMV)に慢性に感染したマウスでは、抗PD1抗体の投与がPD1-PDL相互作用を遮断し、あるT細胞機能性(増殖およびサイトカイン分泌)を回復でき、ウイルス負荷における減少をもたらしたことを見ている(Barberら(2006年)Nature 439巻(9号):682~687頁)。さらに、完全ヒトPD-1特異的IgG4モノクローナル抗体が、種々の疾患背景(進行メラノーマ、腎細胞癌、非小細胞肺癌、結腸直腸がんまたは前立腺がん)を有する患者に対して、腫瘍学設定においてクリニックで検査されてきた。臨床活性は、メラノーマ、腎細胞がんおよび非小細胞肺癌の患者において観察され、予備的データは、処置前の腫瘍によるPD1リガンド発現の検出が、臨床成績と相關することを示唆した(Wolfe(2012年)Oncology Business Review、7月;およびPardoll、同書を参照)。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAがヒトPD1遺伝子(chr2:242792033~242801058)を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてPD1アレルを破壊するために使用され得る。ノックアウトのためにPD1遺伝子を標的化するための1つの好ましい領域は、そのATGタンパク質翻訳開始部位に近い領域またはその近傍にある。これは、PD1遺伝子のヌクレオチドchr2:242800981~242800982に対応する。S. pyogenes Cas9についてのPAM位置が、242800980位~242800981位、242800975位~242800976位、242800971位~242800972位、242800970位~242800971位、242800967位~242800968位および242800965位~242800966位において第2染色体またはその近傍に位置する、PD1遺伝子の標的部位が、特に好ましい。別の特に好ましい標的化位置は、PD-1リガンド結合ドメイン(第2染色体、ヌクレオチド242794834~242794835および242794828~242794829)の近くの領域周辺である。標的化のための別の好ましい領域は、免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ(例えば、第2染色体242793349~242793350、242793338~242793339、242793330~242793331または242793327~242793328)の近くの領域またはその近傍にある。この領域中の突然変異は、PD1機能を無効にする。第2染色体:242800953~242800979、242794976~242795005、242794416~242794444および242793405~242793433またはその近傍の位置におけるS. pyogenes Cas9タンパク質のための標的部位が、特に好ましい。第VII因子遺伝子のための好ましい標的化領域は、chrX:154064064~154250998に位置する遺伝子配列またはその近傍にある。第VII因子遺伝子を標的化するために特に好ましいのは、インtron 22の領域であり、ここは、chrX:154091503~154124351またはその近傍に位置する、重症血友病A患者におけるFVII因子突然変異の最大50%を占める一般的な逆位事象の部位である。第IX因子(F.IX)遺伝子について、標的化のために好ましいのは、chrX:138,612,895~138,645,617またはその近傍に位置する遺伝子配列である。例えば、chrX:138613760~138613816、chrX:138618832~138618887および/またはchrX:138613815~138613872またはその近傍において、インtron 1中の領域中の標的が、特に好ましい。したがって、sgRNAは、これら的好ましい標的化領域のうちの1または複数中の配列が含まれるがこれらに限定されない、PD1遺伝子座中のいずれかの場所の配列に結合するように設計され得る。標的化に適切な配列の非限定的な例を、表1に示す。

#### 【0075】

T細胞活性の別のモジュレーターは、CTLA-4受容体である。T細胞受容体CD28と同様に、CTLA-4は、抗原提示細胞上でCD80およびCD86リガンドと相互

10

20

30

40

50

作用する。しかし、これらの抗原とCD28との相互作用は、T細胞の活性化を引き起こし、CD80またはCD86とCTLA-4との相互作用は、IL-2分泌およびIL-2受容体発現を妨害することによって、ならびに重要な細胞周期構成成分の発現を阻害することによって、T細胞活性化と拮抗する。CTLA-4は、ほとんどの休止T細胞の表面上では見出されないが、T細胞活性化後に一過的に上方調節される。したがって、CTLA-4は、T細胞活性を活性化することおよび阻害することのバランスにも関与する(Attiaら(2005年)J Clin Oncol. 23巻(25号):6043~6053頁を参照)。転移性メラノーマを有する対象におけるCTLA4抗体の使用を含む初期の臨床研究は、疾患の退縮を見出したが(Attia、同書)、後の研究は、抗体で処置した対象が、自己寛容の中止に関連すると思われる療法の副作用(免疫関連有害事象:発疹、大腸炎、肝炎等)を示すことを見出した。このデータの分析により、抗CTLA4抗体の結果としてのより高い腫瘍退縮は、免疫関連有害事象のより高い重症度と直接関することが示唆された(Weber(2007年)Oncologist 12巻(7号):864~872頁)。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAがchr2:204732511~204738683またはその近傍に位置するヒトCTLA-4遺伝子を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてCTLA-4遺伝子を破壊するために使用され得る。標的化に適切な配列の非限定的な例を、表1に示す。

10

## 【0076】

キメラ抗原受容体(CAR)は、細胞表面上に発現された特異的分子標的に免疫細胞を標的化するように設計された分子である。その最も基本的な形態では、これらは、細胞の内側のシグナル伝達経路に細胞の外側で発現される特異性ドメインを結びつける、細胞に導入される受容体であり、その結果、特異性ドメインがその標的と相互作用する場合、この細胞は活性化される。多くの場合、CARは、特異性ドメイン、例えばscFvまたはある型の受容体がTCRのシグナル伝達ドメインに融合されたT細胞受容体(TCR)のバリエントから構成される。次いで、これらの構築物は、標的抗原を発現する細胞の存在下でT細胞が活性化されるようにT細胞中に導入され、非MHC依存的様式で、活性化されたT細胞による標的化された細胞に対する攻撃を生じる(Chicago(2011年)Int Rev Immunol 30巻:294~311頁を参照)。現在、種々の腫瘍抗原を標的化する腫瘍特異的CARが、種々の異なるがんの処置のためにクリニックにおいて検査されている。標的化されているこれらのがんおよびそれらの抗原の例には、濾胞性リンパ腫(CD20またはGD2)、神経芽腫(CD171)、非ホジキンリンパ腫(CD20)、リンパ腫(CD19)、膠芽腫(IL13R2)、慢性リンパ性白血病またはCLLおよび急性リンパ性白血病またはALL(共にCD19)が含まれる。ウイルス特異的CARは、HIVなどのウイルスを有する細胞を攻撃するために開発してきた。例えば、臨床治験は、HIVの処置のために、Gp100に特異的なCARを使用して開始された(Chicago、同書)。

20

30

## 【0077】

T細胞の注意をがん細胞などの特定の細胞へと再び向けさせる技術を開発することは有用であるが、これらの標的細胞は、多くの場合、PD-1リガンドを発現するという問題が残っている。したがって、PD1-PD-L1/PD-L2相互作用は、T細胞を不活性化することならびにアポトーシスおよび細胞疲弊を増加させることによって、CARによって標的化されたT細胞による作用を腫瘍が逃れることを可能にする。さらに、PD1-PDL相互作用は、HIVに対するT細胞応答の抑制にも関与し、このとき、PD1およびPDLの両方の発現の増加は、T細胞疲弊をもたらす。活性化したT細胞上でのCTLA-4発現の誘導は、免疫応答を減衰させるための最初のステップの1つでもあり、したがって、CARを装備したT細胞は、T細胞活性化とT細胞阻害とのバランスをとるように設計されたこの系の関与に起因して、不活性になり得る。したがって、本発明のCRISPR/Cas系は、CARを含むT細胞においてCTLA-4および/またはPD1をノックアウトするために、上記本発明のsgRNAと共に使用され得る。

40

50

## 【0078】

MHC抗原は、移植反応において主要な役割を果たすタンパク質として最初に特徴付けられた。拒絶は、移植された組織の表面上の組織適合抗原と反応するT細胞によって媒介され、これらの抗原の最も大きな群は、主要組織適合抗原(MHC)である。MHCタンパク質は、2つのクラスIおよびIIのものである。クラスI MHCタンパク質は、2つのタンパク質、鎖および2ミクログロブリン鎖のヘテロ二量体であり、この鎖は、MHC1遺伝子によってコードされる膜貫通タンパク質であり、2ミクログロブリン鎖は、MHC遺伝子クラスター内には存在しない遺伝子によってコードされる小さい細胞外タンパク質である。この鎖は、3つの球状ドメインへとフォールディングし、2ミクログロブリン鎖が会合した場合、この球状構造複合体は、抗体複合体と類似する。外来ペプチドは、最も可変性もある2つの最もN末端側のドメイン上に提示される。クラスII MHCタンパク質もまたヘテロ二量体であるが、このヘテロ二量体は、MHC複合体内の遺伝子によってコードされる2つの膜貫通タンパク質を含む。クラスI MHC：抗原複合体は、細胞傷害性T細胞と相互作用するが、クラスII MHCは、ヘルパーT細胞に対して抗原を提示する。さらに、クラスI MHCタンパク質は、ほぼ全ての有核細胞および血小板(およびマウスでは赤血球)において発現される傾向があるが、クラスII MHCタンパク質は、より選択的に発現される。典型的には、クラスII MHCタンパク質は、B細胞、一部のマクロファージおよび単球、ランゲルハンス細胞、ならびに樹状細胞上で発現される。

10

## 【0079】

ヒトにおけるクラスI HLA遺伝子クラスターは、3つの主要な遺伝子座B、CおよびA、ならびにいくつかのマイナーな遺伝子座を含む。HLA-A、H：A-BおよびHLA-Cは、HLAクラスI重鎖パラログである。クラスI分子は、MHCアルファ重鎖(HLA-A、HLA-BまたはHLA-C)および軽鎖(ベータ-2ミクログロブリン)からなるヘテロ二量体である。重鎖は、膜アンカーされている。クラスI分子は、小胞体内腔由来のペプチドを提示することによって、免疫系において中心的役割を果たす。重鎖は、およそ45kDaであり、その遺伝子は8つのエクソンを含む。エクソン1は、リーダーペプチドをコードし、エクソン2および3は、アルファ1ドメインおよびアルファ2ドメインをコードし、これらは共にペプチドに結合し、エクソン4は、アルファ3ドメインをコードし、エクソン5は、膜貫通領域をコードし、エクソン6および7は、細胞質側末端をコードする。エクソン2およびエクソン3内の多型は、各クラスI分子のペプチド結合特異性を担う。HLA-A、BまたはCにおいてsgRNAを標的化するために好みの領域は、遺伝子配列内に存在する(例えば、HLA-Aについてはchr6:29910247~29912868、HLA-Bについてはchr6:31236526~31239125、およびHLA-Cについてはchr6:31236526~31239125)。リーダー配列(例えば、HLA-Bについてはchr6:31324936~31324989またはその近傍)、アルファ1ドメインおよびアルファ2ドメイン(例えば、HLA-Bについては、それぞれ、chr6:31324863~31324935およびchr6:31324735~31324862またはその近傍)ならびにアルファ3ドメイン(例えば、HLA-Bについてはchr6:31324465~31324734またはその近傍)内の配列を標的化することが、特に好みの領域。

20

30

## 【0080】

クラスII HLAクラスターは、3つの主要な遺伝子座DP、DQおよびDRもまた含み、クラスIおよびクラスIIの両方の遺伝子クラスターは、集団内のクラスI遺伝子およびクラスII遺伝子の両方のいくつかの異なるアレルが存在するという点で、多型である。HLA-DPA1、HLA-DQA1およびHLA-DRAは、HLAクラスIIアルファ鎖パラログに属する。このクラスII分子は、両方とも膜アンカーされたアルファ(DPA)鎖およびベータ(DPB)鎖からなるヘテロ二量体である。これらは、細胞外タンパク質由来のペプチドを提示することによって、免疫系において中心的な役割を果たす。クラスII分子は、抗原提示細胞(APC：Bリンパ球、樹状細胞、マクロファ-

40

50

ジ)において発現される。アルファ鎖は、およそ33~35kDaであり、それらの遺伝子(HLA-DRA)についてはchr6\_sssto\_hap7:3, 754, 283~3, 759, 493、HLA-DQについてはchr6:32605183~32611429、およびHLA-DPAについてはchr6:33032346~33048555)は、5つのエクソンを含む。エクソン1(例えば、HLA-DPA1についてはchr6:33041248~33041347またはその近傍)は、リーダーペプチドをコードし、エクソン2および3(例えば、HLA-DPA1についてはchr6:33037418~33037663およびchr6:33036796~33037077またはその近傍)は、2つの細胞外ドメインをコードし、エクソン4(例えば、HLA-DPA1についてはchr6:33036427~33036581またはその近傍)は、膜貫通ドメインおよび細胞質側末端をコードする。したがって、本発明のCRIPSR-Cas系を用いて標的化するために特に好ましい領域は、エクソン1、2および3内に存在する。DP分子内で、アルファ鎖およびベータ鎖の両方が、ペプチド結合特異性を特定する多型を含み、最大4つの異なる分子を生じる。したがって、sgRNAは、これらの好ましい標的化領域のうちの1または複数中の配列が含まれるがこれらに限定されない、HLA-DPA1、HLA-DQ1またはHLA-DRA遺伝子座中のいずれかの場所の配列に結合するように設計され得る。

#### 【0081】

HLA機能において同様に役割を果たすいくつかのアクセサリータンパク質もまた存在する。Tap1(chr6:32812986~32821748においてコードされる)サブユニットおよびTap2(chr6:32793187~32806547においてコードされる)サブユニットは、クラスI HLA複合体上にペプチド抗原を負荷する際に不可欠なTAP輸送体複合体の一部であり、LMP2およびLMP7プロテアソームサブユニットは、HLA上でのディスプレイのためのペプチドへの抗原の、タンパク質分解性分解において役割を果たす。LMP7(chr6\_dbb\_hap3:4089872~4093057)における低下は、おそらくは安定化の欠如を介して、細胞表面におけるMHCクラスIの量を低下させることが示されている(Fehlingら(1999年)Science 265巻:1234~1237頁を参照)。TAPおよびLMPに加えて、タバシン遺伝子(chr6:33271410~33282164)が存在し、その産物は、TAP複合体とHLAクラスI鎖との間に架橋を形成し、ペプチド負荷を増強する。タバシンにおける低下は、障害されたMHCクラスIアセンブリ、MHCクラスIの低下した細胞表面発現および障害された免疫応答を有する細胞を生じる(Grandeaら(2000年)Immunity 13巻:213~222頁およびGarbiら(2000年)Nat Immunol 1巻:234~238頁を参照)。クラスII MHC発現の調節は、MHCIIエンハンセオソーム複合体の活性に依存する。エンハンセオソームの構成成分(エンハンセオソーム複合体の最も高度に研究された構成成分のうちの1つは、RFX5遺伝子産物である(Villalardら(2000年)MCB 20巻(10号):3364~3376頁を参照))は、ほぼ普遍的に発現され、これらの構成成分の発現は、MHCクラスII遺伝子の組織特異的発現またはそれらのIFN-誘導される上方調節を制御しないようである。その代り、非DNA結合タンパク質であるCIITA(クラスIIトランス活性化因子)として公知のタンパク質は、MCHII発現のためのマスター制御因子として機能するようである。他のエンハンセオソームのメンバーとは対照的に、CIITAは、組織特異的発現を示し、IFN-によって上方調節され、MHCクラスII発現の下方調節(免疫監視を逃れるための細菌の試みの一部であると考えられる(Leibund Gut-Landmannら(2004年)Eur. J. Immunol. 34巻:1513~1525頁を参照))を引き起こし得るいくつかの細菌およびウイルスによって阻害されることが示されている。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAがヒトHLA遺伝子またはHLA調節遺伝子を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてHLA遺伝子またはHLA調節遺伝子を破壊するために使用され得る。sgRNAは、HLA-A、HLA-B、H

10

20

30

40

50

L A - C、H L A - D P A、H L A - D Q またはH L A - D R Aをコードする遺伝子配列が含まれるがこれらに限定されない、H L A 遺伝子座中のいずれかの場所の配列、および上で議論したこれらの遺伝子内の好ましい標的化領域に結合するように設計され得る。さらに、s g R N Aは、T A P 1、T A P 2、L M P 2、L M P 7 およびタパシンを含む、その産物がM H C タンパク質と相互作用する遺伝子中の配列、またはM H C I I エンハンセオソーム複合体(R F X 5 (c h r 1 : 1 5 1 3 1 3 1 1 6 ~ 1 5 1 3 1 9 7 6 9 ) およびC I I T A (c h r 1 6 : 1 0 9 7 1 0 5 5 ~ 1 1 0 0 2 7 4 4 ) 中のものを含む、その産物がこれらの遺伝子の発現を調節する遺伝子中の配列に結合するように、設計され得る。標的化に適切な配列の非限定的な例を、表1に示す。

## 【0082】

10

植物における遺伝子、特に植物におけるバラロガス遺伝子の発現のモジュレーションならびに標的化された開裂および変更のために有用な組成物および方法が、本明細書に開示される。バラロガス遺伝子の調節は、例えば、遺伝子操作された転写因子を使用すること、または遺伝子調節領域を修飾することによって、モジュレートされ得る。遺伝子は、例えば、標的化された開裂とその後の染色体内相同組換えとによって、または標的化された開裂とその後の外因性ポリヌクレオチド(遺伝子ヌクレオチド配列と相同性の1または複数の領域を含む)とゲノム配列との間の相同組換えとによって、変更され得る。植物におけるバラロガス遺伝子の非限定的な一例は、E P S P S 遺伝子である。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドR N Aが植物E P S P S 遺伝子を標的化するための配列を含むC R I S P R / C a s 系を用いてE P S P S 遺伝子を破壊するために使用され得る。

20

## 【0083】

20

本開示は、植物細胞においてZ p 1 5 遺伝子中に組み込まれた外因性核酸配列(即ち、タンパク質またはR N A分子)の1または複数の産物を発現させるための方法および組成物を提供する。共同所有された米国特許第8,329,986号に示されるように、Z p 1 5 遺伝子座またはその近傍における1または複数の外因性配列の組込みは、宿主植物が再生し、開花し、または種子を作出し、および任意選択で世代を超えた外因性配列(複数可)の遺伝性の伝達を可能にする能力を障害しないようである。これらの外因性核酸配列は、例えば、1もしくは複数の遺伝子もしくはc D N A分子、または任意の型のコード配列もしくは非コード配列、ならびに1もしくは複数の制御エレメント(例えば、プロモーター)を含み得る。例えば、除草剤耐性遺伝子が、所望の除草剤抵抗性を有する作物植物を作出するために、この遺伝子座中に組み込まれ得る。Z p 1 5 遺伝子座またはその近傍において外因性核酸を含む細胞は、配偶体(生殖系列)にも寄与し得、したがって、引き続く世代において後代に伝達され得る。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドR N Aが植物Z P 1 5 遺伝子を標的化するための配列を含むC R I S P R / C a s 系を用いてZ p 1 5 遺伝子を破壊するために使用され得る。

30

## 【0084】

30

本開示は、脂肪酸生合成に関する1または複数の植物遺伝子の、植物全体または植物細胞における発現をモジュレートするためおよび標的化された変更のための、組成物および方法を提供し、それによって、植物全体または植物細胞における脂肪酸組成を変更する。植物全体または植物細胞は、一部の特定の実施形態では油產生植物を含む单子葉(monocotyledonous / monocots)または双子葉(dicotyledonous / dicots)植物種由来であり得、これには、培養細胞、任意の発生段階にある植物中の細胞、および植物全体から取り出された植物細胞もまた含まれ、これらの細胞(またはそれらの子孫)は、植物へと再生される。植物細胞は、1または複数の相同なまたはバラロガスな遺伝子配列を含み得、それらの任意の数またはそれらの全てが、本明細書に開示される方法による修飾のために標的化され得る。

40

## 【0085】

一態様では、植物脂肪酸生合成経路に関する遺伝子に特異的に結合するD N A結合ドメイン(例えば、C a s タンパク質)が、本明細書に記載される。一部の実施形態では、

50

この遺伝子は、Brassica napus遺伝子である。一部の特定の実施形態では、このBrassica napus遺伝子は、アセチル-CoAカルボキシラーゼ(ACCase)、-ケトアシル-ACPシンテターゼ(KAS、例えば、KAS I~KAS IV)、脂肪酸チオエステラーゼB(FATB、例えば、FATB 1~FATB 5または他の色素体チオエステラーゼ)、脂肪酸シンターゼ(FAS)、脂肪酸エロンガーゼ(elongase)(FAE、例えば、FAE 1)、脂肪酸チオエステラーゼA(FatA)、脂肪酸デサチュラーゼ(Fad 2、Fad 3)、色素体G-3-Pデヒドロゲナーゼ(GPDH)、グリセロキナーゼ(GK)、ステアロイル-アシルキャリアタンパク質デサチュラーゼ(S-ACP-DES)およびオレオイル-ACPヒドロラーゼをコードし得る。一部の特定の実施形態では、この遺伝子は、他の油産生植物種におけるこれらの遺伝子のオルソログまたはホモログであり得る。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAが脂肪酸合成遺伝子を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いて、脂肪酸合成に関する遺伝子を破壊するために使用され得る。

#### 【0086】

リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)は、植物および哺乳動物の両方において中心的代謝およびオルガネラ区画間の酸化還元ホメオスタシスに関する可逆的NAD+依存的デヒドロゲナーゼ反応を触媒する。植物組織は、NADプールの還元または酸化に共役されたマレートおよびオキサロアセテート(OAA)の相互変換を触媒するリンゴ酸デヒドロゲナーゼ(1-リンゴ酸-NAD-オキシドレダクターゼ[MDH]; EC 1.1.1.37)の複数のアイソフォームを含む。特に、OAAは、この有機酸に対して本質的に不透過性である哺乳動物ミトコンドリアとは対照的に、単離された植物ミトコンドリアの内側へおよび外側への両方で、容易に輸送される。MDH突然変異体植物は、明らかな表現型を示さないか、またはより緩徐な成長速度および変更された光呼吸特徴を示すかのいずれかである。以下を参照されたいが、例えば、Tomazら(2010年)Plant Physiol. 154巻(3号): 1143~1157頁、Goodman, M.M., Newton K.J. および Stuber, C.W. (1981年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78巻: 1783~1785頁またはImssande, J.ら(2001年)J. Heredity 92巻: 333~338頁ならびに米国特許出願公開第20090123626号は、アスパラギンレベルを低下させるためのMDHアンチセンスの使用を記載しており、これは次いで、植物および植物産物の加工関連の加熱の際に蓄積するアクリルアミドのレベルを低下させる。したがって、本発明の方法および組成物は、単一ガイドRNAがMDH遺伝子を標的化するための配列を含むCRISPR/Cas系を用いてリンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)を破壊するために使用され得る。

#### 【0087】

このCRISPR/Cas系は、ゲノム中の所望の位置を標的化するための遺伝子操作されたsgRNA(またはその相当部分)を含む。このガイドRNAの12塩基対およびPAM配列の2塩基対のみ(合計14塩基対)が、CRISPR/Cas活性に重要であるようである。CRISPR/Cas構築物がこれら14塩基対に対して絶対的に特異的であると仮定して、本発明者らは、斯かる構築物がヒトゲノムにおいておよそ20回開裂すると予測するが、それは、所与の14ヌクレオチド配列が、268, 435, 456(4<sup>14</sup>)ヌクレオチド毎におよそ1回出現し、一倍体ヒトゲノムがおよそ3,000,000,000ヌクレオチドを含み、14ヌクレオチド配列が、ゲノムの2つの鎖のいずれか上に存在し得るからである。この数字は、認識の絶対的特異性もまた必要とする。したがって、オフターゲット開裂部位の実際の数は、より高い可能性がある。本発明は、その特異性を増加させるためにCRISPR/Cas系の標的サイズを増加させるための方法および組成物を提供する。このCasヌクレアーゼは、それぞれ、標的DNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖を開裂させるための、2つのヌクレアーゼドメインHNHおよびRuvC様を含む。したがって、このCasヌクレアーゼは、これらのヌクレアーゼドメインのうちの一方だけが機能的になるように遺伝子操作され得、そして、Casニッカー

10

20

30

40

50

ゼを生じる( Jinek ら、同書を参照)。ニッカーゼは、この酵素の触媒ドメイン中のアミノ酸の特異的突然変異によって、またはこのニッカーゼがもはや機能的でなくなるような、ドメインの一部もしくは全てのトランケーションによって、生成され得る。Cas は、2つのヌクレオーゼドメインを含むので、このアプローチは、いずれのドメインに対しても行われ得る。二本鎖切断は、斯かる2つのCas ニッカーゼの使用によって、標的DNAにおいて達成され得る。これらのニッカーゼは、各々DNA の一方の鎖を開裂させ、2つのニッカーゼの使用は、二本鎖切断を生じる。したがって、この系の特異性は、2つのCas ニッカーゼタンパク質を使用することによって大きく増加されるが、それは、標的の長さが、12 ~ 14ヌクレオチドから24 ~ 28ヌクレオチド(2つのサブ標的間にスペーサーを含まない)に増加されるからである。このアプローチを使用して、ヒトゲノム中の完璧にマッチしたオフターゲット部位の予測される数は、約20(上記の通り)から約<10<sup>-7</sup>(CRISPR/Cas ニッカーゼ二量体によって認識される28塩基対のDNA を仮定する)まで、4<sup>14</sup>倍低下する。

10

### 【0088】

#### 概要

本明細書に開示される方法、ならびに組成物の調製および使用の実施は、特に示さない限り、本技術分野の技術範囲内の、分子生物学、生化学、クロマチン構造および分析、計算機化学、細胞培養、組換えDNA ならびに関連分野における従来の技術を用いる。これらの技術は、文献中に完全に説明されている。例えば、SambrookらMOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年および第3版、2001年；Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、1987年および定期的更新；シリーズMETHODS IN ENZYMOLOGY、Academic Press、San Diego；Wolffe、CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION、第3版、Academic Press、San Diego、1998年；METHODS IN ENZYMOLOGY、304巻、「Chromatin」(P.M. WassarmanおよびA.P. Wolffe編)、Academic Press、San Diego、1999年；ならびにMETHODS IN MOLECULAR BIOLOGY、119巻、「Chromatin Protocols」(P.B. Becker編)Humana Press、Totowa、1999年を参照されたい。

20

30

40

### 【0089】

#### 定義

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、相互交換可能に使用され、直鎖状または環状コンフォメーションの、一本鎖形態または二本鎖形態のいずれかの、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのポリマーを指す。本開示の目的のため、これらの用語は、ポリマーの長さに関して限定的であると解釈すべきではない。これらの用語は、天然ヌクレオチドの公知のアナログ、ならびに塩基、糖および/またはリン酸部分(例えば、ホスホロチオエート骨格)において修飾されたヌクレオチドを包含し得る。一般に、特定のヌクレオチドのアナログは、同じ塩基対合特異性を有する；即ち、Aのアナログは、Tと塩基対合する。

### 【0090】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、相互交換可能に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、1または複数のアミノ酸が、対応する天然起源のアミノ酸の化学的アナログまたは修飾された誘導体である、アミノ酸ポリマーにも適用される。

### 【0091】

「結合」とは、巨大分子間(例えば、タンパク質と核酸との間、または2つの核酸の間)の配列特異的な非共有結合相互作用を指す。相互作用が全体として配列特異的である限

50

り、結合相互作用の全ての構成成分が配列特異的である（例えば、DNA骨格中のリン酸残基と接触する）必要はない。斯かる相互作用は一般に、 $10^{-6} M^{-1}$  またはそれ未満の解離定数 ( $K_d$ ) を特徴とする。「親和性」とは、結合の強度を指す：増加した結合親和性は、より低い  $K_d$  と相関する。

#### 【0092】

用語「キメラRNA」、「キメラガイドRNA」、「ガイドRNA」、「单一ガイドRNA」および「合成ガイドRNA」は、相互交換可能に使用され、ガイド配列、tracr配列およびtracr mate配列を含むポリヌクレオチド配列を指す。用語「ガイド配列」とは、標的部位を特定するガイドRNA内の約10～30（10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30）塩基対の配列を指し、用語「ガイド」または「スペーサー」と相互交換可能に使用され得る。用語「tracr mate配列」はまた、用語「ダイレクトリピート（複数可）」と相互交換可能に使用され得る。10

#### 【0093】

「相補性」とは、伝統的Watson-Crick型または他の非伝統的型のいずれかによって、別の核酸配列と水素結合（複数可）を形成する核酸の能力を指す。パーセント相補性は、第2の核酸配列（例えば、10のうち5、6、7、8、9、10が、50%、60%、70%、80%、90%および100%相補的である）と水素結合（例えば、Watson-Crick塩基対合）を形成し得る核酸分子中の残基のパーセンテージを示す。「完璧に相補的」は、核酸配列の連続する残基が全て、第2の核酸配列中の同数の連続する残基と水素結合することを意味する。「実質的に相補的」とは、本明細書で使用する場合、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50もしくはそれ超のヌクレオチドの領域にわたって、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%もしくは100%である相補性の程度を指し、またはストリングエントな条件下でハイブリダイズする2つの核酸を指す。「結合タンパク質」は、別の分子と結合できるタンパク質である。結合タンパク質は、例えば、DNA分子（DNA結合タンパク質）、RNA分子（RNA結合タンパク質）および/またはタンパク質分子（タンパク質結合タンパク質）に結合できる。タンパク質結合タンパク質の場合、これは、それ自体と結合でき（ホモ二量体、ホモ三量体等を形成する）および/または異なるタンパク質（単数もしくは複数）の1もしくは複数の分子に結合できる。結合タンパク質は、1つよりも多い型の結合活性を有し得る。例えば、ジンクフィンガータンパク質は、DNA結合活性、RNA結合活性およびタンパク質結合活性を有する。20

#### 【0094】

「ジンクフィンガーDNA結合タンパク質」（または結合ドメイン）は、タンパク質、またはより大きいタンパク質内のドメインであり、その構造が亜鉛イオンの配位を介して安定化される結合ドメイン内のアミノ酸配列の領域である1または複数のジンクフィンガーを介して配列特異的様式でDNAに結合する。用語、ジンクフィンガーDNA結合タンパク質は、多くの場合、ジンクフィンガータンパク質またはZFPと略される。30

#### 【0095】

「TALE DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1または複数のTALEリピートドメイン/単位を含むポリペプチドである。これらのリピートドメインは、その同族的DNA配列へのTALEの結合に関与する。単一の「リピート単位」（「リピート」とも呼ぶ）は、典型的には、33～35アミノ酸長であり、天然起源のTALEタンパク質内の他のTALEリピート配列と少なくともいくらかの配列相同性を示す。40

#### 【0096】

ジンクフィンガーおよびTALE結合ドメインは、例えば、天然起源のジンクフィンガーまたはTALEタンパク質の認識ヘリックス領域の遺伝子操作（1または複数のアミノ酸を変更する）を介して、所定のヌクレオチド配列に結合するように「遺伝子操作され」得る。したがって、遺伝子操作されたDNA結合タンパク質（ジンクフィンガーまたはT50

A L E ) は、非天然起源のタンパク質である。D N A 結合タンパク質を遺伝子操作するための方法の非限定的な例は、設計および選択である。設計されたD N A 結合タンパク質は、その設計 / 組成が合理的基準から主に生じる、天然起源でないタンパク質である。設計のための合理的基準には、置換ルールの適用、ならびに既存のZ F P および / またはT A L E の設計および結合データの情報を記憶するデータベース中の情報を処理するためのコンピューターアルゴリズムが含まれる。例えば、米国特許第8,586,526号、第6,140,081号；第6,453,242号；および第6,534,261号を参照されたい；W O 9 8 / 5 3 0 5 8 ; W O 9 8 / 5 3 0 5 9 ; W O 9 8 / 5 3 0 6 0 ; W O 0 2 / 0 1 6 5 3 6 およびW O 0 3 / 0 1 6 4 9 6 もまた参照されたい。

## 【0097】

10

「選択された」ジンクフィンガータンパク質またはT A L E は、その產生がファージディスプレイ、相互作用トラップまたはハイブリッド選択などの実験過程から主に生じる、天然には見出されないタンパク質である。例えば、米国特許第8,586,526号；第5,789,538号；第5,925,523号；第6,007,988号；第6,013,453号；第6,200,759号；ならびにW O 9 5 / 1 9 4 3 1 ; W O 9 6 / 0 6 1 6 6 ; W O 9 8 / 5 3 0 5 7 ; W O 9 8 / 5 4 3 1 1 ; W O 0 0 / 2 7 8 7 8 ; W O 0 1 / 6 0 9 7 0 、W O 0 1 / 8 8 1 9 7 ; W O 0 2 / 0 9 9 0 8 4 を参照されたい。

## 【0098】

20

「組換え」とは、2つのポリヌクレオチド間の遺伝情報の交換の過程を指す。本開示の目的のため、「相同組換え（H R ）」とは、例えば、相同性指向性の修復機構を介した細胞における二本鎖切断の修復の間に行われる、斯かる交換の特殊化された形態を指す。この過程は、ヌクレオチド配列の相同性を必要とし、「標的」分子（即ち、二本鎖切断を経験したもの）の鑄型修復のために「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝情報の移入をもたらすので、「非乗換え遺伝子変換」または「ショートトラクト（short tract）遺伝子変換」として様々に公知である。いかなる特定の理論に制約されることも望まないが、斯かる移入は、切断された標的とドナーとの間に形成するヘテロ二重鎖D N A のミスマッチ修正、および / もしくは標的の一部となる遺伝情報を再合成するためにドナーが使用される「合成依存的鎖アニーリング」、ならびに / または関連する過程に関与し得る。斯かる特殊化されたH R は、多くの場合、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全てが標的ポリヌクレオチド中に取り込まれるように、標的分子の配列の変更をもたらす。

## 【0099】

30

本開示の方法では、本明細書に記載される1または複数の標的化されたヌクレアーゼ（例えば、C R I S P R / C a s ）は、所定の部位において標的配列（例えば、細胞クロマチン）中に二本鎖切断を生じ、切断の領域中のヌクレオチド配列に対する相同性を有する「ドナー」ポリヌクレオチドが、細胞中に導入され得る。二本鎖切断の存在は、ドナー配列の組込みを容易にすることが示されている。このドナー配列は、物理的に組み込まれ得、またはあるいは、このドナーポリヌクレオチドは、相同組換えによる切断の修復のための鑄型として使用されて、細胞クロマチン中への、ドナーと同様のヌクレオチド配列の全てまたは一部の導入を生じる。したがって、細胞クロマチン中の第1の配列は、変更され得、ある特定の実施形態では、ドナーポリヌクレオチド中に存在する配列へと変換され得る。したがって、用語「置き換える」または「置き換え」の使用は、別のヌクレオチド配列による1つのヌクレオチド配列の置き換え（即ち、情報的な意味での配列の置き換え）を示すと理解され得、別のポリヌクレオチドによる1つのポリヌクレオチドの物理的または化学的置き換えを必ずしも必要としない。

40

## 【0100】

本明細書に記載される方法のいずれかでは、さらなるC R I S P R / C a s ヌクレアーゼおよび / またはジンクフィンガーもしくはT A L E N タンパク質のさらなる対は、細胞内のさらなる標的部位のさらなる二本鎖開裂に使用され得る。

## 【0101】

50

細胞クロマチン中の目的の領域中の配列の標的化された組換えおよび／または置き換えおよび／または変更のための方法のある特定の実施形態では、染色体配列は、外因性「ドナー」スクレオチド配列との相同組換えによって変更される。斯かる相同組換えは、切断の領域と相同的な配列が存在する場合、細胞クロマチン中の二本鎖切断の存在によって刺激される。

#### 【0102】

本明細書に記載される方法のいずれかでは、外因性スクレオチド配列（「ドナー配列」または「導入遺伝子」）は、目的の領域中のゲノム配列と相同ではあるが同一ではない配列を含み得、それによって、目的の領域において非同一配列を挿入するように相同組換えを刺激する。したがって、ある特定の実施形態では、目的の領域中の配列と相同的なドナー配列の一部は、置き換えられるゲノム配列に対して、約80～99%の間（またはそれらの間の任意の整数）の配列同一性を示す。他の実施形態では、ドナー配列とゲノム配列との間の相同性は、例えば、1スクレオチドのみが100個を超える連続する塩基対のドナー配列とゲノム配列との間で異なる場合、99%よりも高い。ある特定の場合、ドナー配列の非相同部分は、新たな配列が目的の領域中に導入されるように、目的の領域中に存在しない配列を含み得る。これらの例では、非相同配列には、一般に、目的の領域中の配列と相同または同一な、50～1,000塩基対（またはそれらの間の任意の整数値）または1,000よりも大きい任意の数の塩基対の配列が隣接する。他の実施形態では、このドナー配列は、第一の配列とは非相同であり、非相同組換え機構によってゲノム中に挿入される。

10

20

#### 【0103】

本明細書に記載される方法のいずれかは、目的の遺伝子（複数可）の発現を破壊するドナー配列の標的化された組込みによる、細胞中の1または複数の標的配列の部分的または完全な不活性化のために使用され得る。部分的または完全に不活性化された遺伝子を有する細胞株もまた、提供される。

#### 【0104】

さらに、本明細書に記載される標的化された組込みの方法は、1または複数の外因性配列を組み込むためにも使用され得る。この外因性核酸配列は、例えば、1もしくは複数の遺伝子もしくはcDNA分子、または任意の型のコード配列もしくは非コード配列、ならびに1もしくは複数の制御エレメント（例えば、プロモーター）を含み得る。さらに、この外因性核酸配列は、1または複数のRNA分子（例えば、小ヘアピンRNA（shRNA）、阻害的RNA（RNAi）、マイクロRNA（miRNA）等）を產生し得る。

30

#### 【0105】

「開裂」とは、DNA分子の共有結合骨格の切断を指す。開裂は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解が含まれるがこれらに限定されない種々の方法によって開始され得る。一本鎖開裂および二本鎖開裂の両方が可能であり、二本鎖開裂は、2つの個別の一本鎖開裂事象の結果として生じ得る。DNA開裂は、平滑末端または付着末端のいずれかの產生を生じ得る。ある特定の実施形態では、融合ポリペプチドが、標的化された二本鎖DNA開裂に使用される。

#### 【0106】

「開裂ハーフドメイン」は、第2のポリペプチド（同一または異なるのいずれか）と協同して、開裂活性（好ましくは二本鎖開裂活性）を有する複合体を形成する、ポリペプチド配列である。用語「第1および第2の開裂ハーフドメイン」；「+および-の開裂ハーフドメイン」ならびに「右および左の開裂ハーフドメイン」は、相互交換可能に使用されて、二量体形成する開裂ハーフドメインの対を指す。

40

#### 【0107】

「遺伝子操作された開裂ハーフドメイン」は、別の開裂ハーフドメイン（例えば、別の遺伝子操作された開裂ハーフドメイン）と偏性ヘテロ二量体を形成するように修飾された開裂ハーフドメインである。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2005/0064474号、第2007/0218528号、第2008/01

50

31962号および第2011/0201055号もまた参照されたい。

【0108】

用語「配列」は、DNAであってもRNAであってもよく；直鎖状であっても環状であっても分枝状であってもよく、一本鎖であっても二本鎖であってもよい、いずれかの長さのヌクレオチド配列を指す。用語「ドナー配列」は、ゲノムに挿入されるヌクレオチド配列を指す。ドナー配列は、いかなる長さであってもよく、例えば、2~10,000ヌクレオチドの間の長さ（またはその間もしくはそれを超えるいずれかの整数値）、好ましくは、約100~1,000ヌクレオチドの間の長さ（またはその間のいずれかの整数）、より好ましくは、約200~500ヌクレオチドの間の長さとなり得る。

【0109】

「相同非同一配列」は、第2の配列とある程度の配列同一性を共有するが、その配列が第2の配列と同一ではない第1の配列を指す。例えば、突然変異体遺伝子の野生型配列を含むポリヌクレオチドは、突然変異体遺伝子の配列と相同かつ非同一である。ある特定の実施形態において、2種の配列の間の相同性の程度は、正常な細胞機序を利用して、その間の相同組換えを可能にするために十分なものである。2種の相同非同一配列は、いかなる長さであってもよく、それらの非相同性の程度は、単一のヌクレオチドほどに小さくても（例えば、標的化相同組換えによるゲノム点突然変異の修正のため）、10キロベースまたはそれを超えるほどに大きくてもよい（例えば、染色体の所定の異所性部位における遺伝子の挿入のため）。相同非同一配列を含む2種のポリヌクレオチドは、同じ長さである必要はない。例えば、20~10,000ヌクレオチドまたはヌクレオチド対の間の外因性ポリヌクレオチド（即ち、ドナーポリヌクレオチド）を使用することができる。

【0110】

核酸およびアミノ酸配列同一性を決定するための技法は、本技術分野において公知である。典型的には、斯かる技法は、遺伝子のmRNAのヌクレオチド配列の決定および/またはそれにコードされるアミノ酸配列の決定、ならびに第2のヌクレオチドまたはアミノ酸配列とのこのような配列の比較を含む。この様式でゲノム配列を決定および比較することもできる。一般に、同一性は、それぞれ2種のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の、正確なヌクレオチド-対-ヌクレオチドまたはアミノ酸-対-アミノ酸の一致を指す。2種またはそれを超える配列（ポリヌクレオチドまたはアミノ酸）は、それらのパーセント同一性を決定することにより比較することができる。核酸であれアミノ酸配列であれ、2種の配列のパーセント同一性は、2種の整列した配列の間の正確なマッチの数を短い方の配列の長さで割り、100を乗じたものである。核酸配列のおよそのアライメントは、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2巻：482~489頁（1981年）の局的相同性アルゴリズムによって提供される。このアルゴリズムは、Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O. Dayhoff編、5巻、追補3号：353~358頁、National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.、USAにより開発され、Gribskov, Nucleic Acids Res. 14巻（6号）：6745~6763頁（1986年）により規格化されたスコアリング行列を使用することにより、アミノ酸配列に適用することができる。配列のパーセント同一性を決定するためのこのアルゴリズムの例示的な実行は、「Best Fit」ヨーティリティアプリケーションにおけるGenetics Computer Group (Madison, WI)により提供される。配列間のパーセント同一性または類似性を計算するための適したプログラムは、一般に、本技術分野において公知であり、例えば、別のアライメントプログラムは、デフォルトパラメータで使用したBLASTである。例えば、BLASTNおよびBLASTPは、次のデフォルトパラメータを使用して使用することができる：遺伝暗号 = 標準；フィルター = なし；鎖 = 兩方；カットオフ = 60；予想 = 10；行列 = BLOSUM62；記述 = 50配列；選別 = 高スコアによる；データベース = 非冗長、GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS翻訳 + SW

10

20

30

40

50

is s protein + S p u p d a t e + P I R。これらのプログラムの詳細は、インターネット上に見出すことができる。本明細書に記載されている配列に関して、配列同一性の所望の程度の範囲は、およそ 80% ~ 100% およびその間のいずれかの整数値である。典型的には、配列間のパーセント同一性は、少なくとも 70 ~ 75%、好ましくは 80 ~ 82%、より好ましくは 85 ~ 90%、さらにより好ましくは 92%、なおより好ましくは 95%、最も好ましくは 98% 配列同一性である。

#### 【0111】

あるいは、ポリヌクレオチド間の配列類似性の程度は、相同領域間に安定的二重鎖の形成を可能にする条件下におけるポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションと、続く一本鎖特異的ヌクレアーゼ（複数可）による消化および消化した断片のサイズ決定により決定することができる。上述の方法を使用して決定される通り、配列が、定義される長さの分子にわたり少なくとも約 70% ~ 75%、好ましくは 80% ~ 82%、より好ましくは 85% ~ 90%、さらにより好ましくは 92%、なおより好ましくは 95%、最も好ましくは 98% の配列同一性を提示する場合、2 種の核酸または 2 種のポリペプチド配列は、互いに実質的に相同である。本明細書において、実質的に相同とは、指定の DNA またはポリペプチド配列に対し完全な同一性を示す配列も指す。実質的に相同な DNA 配列は、例えば、このような特定の系に定義されるストリンジエントな条件下のサザンハイブリダイゼーション実験において同定することができる。適切なハイブリダイゼーション条件の定義は、当業者に公知である。例えば、Sambrookら、上記参照；Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach、編集者 B. D. Hames および S. J. Higgins (1985 年) Oxford；Washington, DC; IRL Press を参照されたい。

10

20

30

40

50

#### 【0112】

2 種の核酸断片の選択的ハイブリダイゼーションは、次の通り決定することができる。2 種の核酸分子間の配列同一性の程度は、斯かる分子間のハイブリダイゼーション事象の効率および強度に影響を与える。部分的に同一の核酸配列は、標的分子への完全に同一の配列のハイブリダイゼーションを少なくとも部分的に阻害する。完全に同一の配列のハイブリダイゼーションの阻害は、本技術分野において周知のハイブリダイゼーションアッセイを使用して評価することができる（例えば、サザン（DNA）プロット、ノーザン（RNA）プロット、溶液ハイブリダイゼーションその他、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第 2 版（1989 年）Cold Spring Harbor, N.Y. を参照）。斯かるアッセイは、変動する程度の選択性を使用して、例えば、低から高ストリンジエンシーに変動する条件を使用して行うことができる。低ストリンジエンシーの条件が用いられる場合、非特異的結合の非存在は、非特異的結合事象の非存在下で二次プローブが標的にハイブリダイズしないように、部分的な程度の配列同一性さえも欠く二次プローブ（例えば、標的分子と約 30% 未満の配列同一性を有するプローブ）を使用して評価することができる。

#### 【0113】

ハイブリダイゼーションに基づく検出系を利用する場合、参照核酸配列に相補的な核酸プローブが選択され、続いて適切な条件の選択により、プローブおよび参照配列は、互いに選択的にハイブリダイズまたは結合して、二重鎖分子を形成する。中程度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で参照配列に選択的にハイブリダイズすることができる核酸分子は、典型的に、選択された核酸プローブの配列と少なくともおよそ 70% 配列同一性を有する少なくとも約 10 ~ 14 ヌクレオチドの長さの標的核酸配列の検出を可能にする条件下でハイブリダイズする。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は、典型的に、選択された核酸プローブの配列と約 90 ~ 95% を超える配列同一性を有する少なくとも約 10 ~ 14 ヌクレオチドの長さの標的核酸配列の検出を可能にする。特異的な程度の配列同一性を有するプローブ / 参照配列ハイブリダイゼーションに有用なハイブリダイゼーション条件は、本技術分野において公知の通りに決定することができる（例えば、Nucleic Acid Hybridization: A Pract

ical Approach、編集者 B. D. Hames および S. J. Higginson (1985年) Oxford; Washington, DC; IRL Press を参照)。

#### 【0114】

ハイブリダイゼーションの条件は、当業者に周知のものである。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション条件が、ミスマッチしたヌクレオチドを含有するハイブリッドの形成を嫌う程度を指し、より高いストリンジェンシーは、ミスマッチしたハイブリッドに対するより低い耐容能と相關する。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える因子は、当業者に周知のものであり、その例として、温度、pH、イオン強度ならびに例えば、ホルムアミドおよびジメチルスルホキシド等の有機溶媒の濃度が挙げられるがこれらに限定されない。当業者に公知の通り、ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、より高い温度、より低いイオン強度およびより低い溶媒濃度により増加する。10

#### 【0115】

ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー条件に関して、多数の均等な条件を用いて、例えば、次の因子を変動させることにより、特定のストリンジェンシーを確立することができるこれが本技術分野において周知である：プローブ配列の長さおよび性質、様々な配列の塩基組成、塩および他のハイブリダイゼーション溶液構成成分の濃度、ハイブリダイゼーション溶液におけるプロッキング剤の有無(例えば、デキストララン硫酸およびポリエチレングリコール)、ハイブリダイゼーション反応温度および時間パラメータならびに変動する洗浄条件。ハイブリダイゼーション条件の特定のセットの選択は、本技術分野における標準方法に従って選択される(例えば、*Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第2版(1989年)Cold Spring Harbor, N.Y.を参照)。20

#### 【0116】

「クロマチン」は、細胞ゲノムを含む核タンパク質構造である。細胞クロマチンは、核酸、主にDNA、ならびにヒストンおよび非ヒストン染色体タンパク質を含むタンパク質を含む。真核生物細胞クロマチンの大部分は、ヌクレオソームの形態で存在し、ヌクレオソームコアは、各々2つのヒストンH2A、H2B、H3およびH4を含む八量体と会合したおよそ150塩基対のDNAを含む：リンカーDNA(生物に依存して変動する長さのもの)が、ヌクレオソームコア間に延びる。1分子のヒストンH1が、一般に、リンカーダNAと会合する。本開示の目的のため、用語「クロマチン」は、原核生物および真核生物の両方の、全ての型の細胞核タンパク質を包含することを意味する。細胞クロマチンには、染色体クロマチンおよびエピソームクロマチンの両方が含まれる。30

#### 【0117】

「染色体」は、細胞のゲノムの全てまたは一部を含むクロマチン複合体である。細胞のゲノムは、多くの場合、細胞のゲノムを構成する全ての染色体のコレクションであるその核型によって特徴付けられる。細胞のゲノムは、1または複数の染色体を含み得る。

#### 【0118】

「エピソーム」は、細胞の染色体核型の一部ではない核酸を含む、複製性の核酸、核タンパク質複合体または他の構造である。エピソームの例には、プラスミドおよびある特定のウイルスゲノムが含まれる。40

#### 【0119】

「到達できる領域」は、核酸に存在する標的部位が、該標的部位を認識する外因性分子に結合され得る、細胞クロマチンにおける部位である。いかなる特定の理論に制約されることも望まないが、到達できる領域が、ヌクレオソーム構造へとパッケージされない領域であることが考えられる。到達できる領域の明確な構造は、多くの場合、化学的および酵素的プローブ、例えば、ヌクレアーゼに対するその感受性により検出することができる。

#### 【0120】

「標的部位」または「標的配列」は、結合のための十分な条件が存在する場合に、結合

分子が結合する核酸の一部分を規定する核酸配列である。

【0121】

「外因性」分子は、細胞中に通常は存在しない分子であるが、1または複数の遺伝学的方法、生化学的方法または他の方法によって細胞中に導入され得る。「細胞中での通常の存在」は、特定の発生段階または細胞の環境条件に関して決定される。したがって、例えば、筋肉の胚発生の間にのみ存在する分子は、成人筋肉細胞に関して外因性分子である。同様に、ヒートショックによって誘導される分子は、ヒートショックされていない細胞に関して、外因性分子である。外因性分子は、例えば、機能障害性内因性分子の機能性バージョン、または正常に機能する内因性分子の機能障害性バージョンを含み得る。

【0122】

外因性分子は、とりわけ、例えば、コンビナトリアルケミストリー過程によって生成されるような小分子、または巨大分子、例えば、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質、多糖、上記分子の任意の修飾された誘導体、あるいは上記分子のうちの1または複数を含む任意の複合体であり得る。核酸には、DNAおよびRNAが含まれ、一本鎖または二本鎖であり得；直鎖状、分枝状または環状であり得；任意の長さのものであり得る。核酸には、二重鎖を形成することが可能な核酸、ならびに三重鎖形成性核酸が含まれる。例えば、米国特許第5,176,996号および第5,422,251号を参照されたい。タンパク質には、DNA結合タンパク質、転写因子、クロマチンリモデリング因子、メチル化DNA結合タンパク質、ポリメラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、アセチラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ジャイレースおよびヘリカーゼが含まれるがこれらに限定されない。したがって、この用語は、「導入遺伝子」または細胞中に導入された外因性配列である「目的の遺伝子」を含む。

【0123】

外因性分子は、内因性分子と同じ型の分子、例えば、外因性タンパク質または核酸であり得る。例えば、外因性核酸は、細胞中に導入された感染性ウイルスゲノム、プラスミドもしくはエピソーム、または細胞中に通常は存在しない染色体を含み得る。細胞中への外因性分子の導入のための方法は、当業者に公知であり、脂質媒介性移入（即ち、中性およびカチオン性脂質を含むリボソーム）、エレクトロポレーション、直接的注射、細胞融合、微粒子銃、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性移入およびウイルスベクター媒介性移入が含まれるがこれらに限定されない。外因性分子はまた、内因性分子と同じ型の分子であり得るが、細胞が由来するのとは異なる種に由来し得る。例えば、ヒト核酸配列は、マウスまたはハムスターに元々由来する細胞株中に導入され得る。植物細胞中への外因性分子の導入のための方法は、当業者に公知であり、プロトプラスト形質転換、シリコンカーバイド（例えば、WHISKERS（商標））、Agrobacterium媒介性形質転換、脂質媒介性移入（即ち、中性およびカチオン性脂質を含むリボソーム）、エレクトロポレーション、直接的注射、細胞融合、微粒子銃（例えば、「遺伝子銃」を使用する）、リン酸カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性移入およびウイルスベクター媒介性移入が含まれるがこれらに限定されない。

【0124】

対照的に、「内因性」分子は、特定の発生段階で特定の環境条件下で特定の細胞中に通常存在する分子である。例えば、内因性核酸は、染色体、ミトコンドリア、葉緑体もしくは他のオルガネラのゲノム、または天然起源のエピソーム核酸を含み得る。さらなる内因性分子には、タンパク質、例えば、転写因子および酵素が含まれ得る。

【0125】

本明細書で使用する場合、用語「外因性核酸の産物」には、ポリヌクレオチド産物およびポリペプチド産物の両方、例えば、転写産物（RNAなどのポリヌクレオチド）および翻訳産物（ポリペプチド）が含まれる。

【0126】

「融合」分子は、2つまたはそれ超のサブユニット分子が、好ましくは共有結合によっ

10

20

30

40

50

て連結された分子である。これらのサブユニット分子は、同じ化学型の分子であり得るか、または異なる化学型の分子であり得る。第1の型の融合分子の例には、融合タンパク質（例えば、ZFPまたはTAL-EのDNA結合ドメインと1または複数の活性化ドメインとの間の融合物）および融合核酸（例えば、上記融合タンパク質をコードする核酸）が含まれるがこれらに限定されない。第2の型の融合分子の例には、三重鎖形成性核酸とポリペプチドとの間の融合物、および副溝結合剤と核酸との間の融合物が含まれるがこれらに限定されない。「融合ポリペプチド」は、異種ポリペプチドに融合または結合されたポリペプチドまたはその一部（例えば、1または複数のドメイン）を含むポリペプチドである。融合ポリペプチドの例には、Casタンパク質の一部分を免疫グロブリン配列と組み合わせるイムノアドヘシン、および「タグポリペプチド」に融合したCasタンパク質、例えば、またはその一部分を含み得るエピトープタグ化ポリペプチドが含まれる。このタグポリペプチドは、それに対する抗体が産生され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有するが、Casのヌクレアーゼ活性を妨害しないように十分に短い。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6アミノ酸残基を有し、通常は、約6～60の間のアミノ酸残基を有する。

10

## 【0127】

細胞における融合タンパク質の発現は、細胞への融合タンパク質の送達から、または細胞への融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの送達によって生じ得、このポリヌクレオチドは転写され、この転写物は翻訳されて、融合タンパク質を生じる。トランス・スプライシング、ポリペプチド開裂およびポリペプチドライゲーションもまた、細胞におけるタンパク質の発現に関与し得る。細胞へのポリヌクレオチドおよびポリペプチドの送達のための方法は、本開示の他の場所に示される。

20

## 【0128】

「遺伝子」には、本開示の目的のために、遺伝子産物をコードするDNA領域（以下を参照）、ならびに斯かる調節配列がコード配列および/または転写された配列に隣接してもしなくても、遺伝子産物の産生を調節する全てのDNA領域が含まれる。したがって、遺伝子には、プロモーター配列、ターミネーター、翻訳調節配列、例えばリボソーム結合部位および内部リボソーム進入部位、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス結合部位ならびに遺伝子座制御領域が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。「遺伝子操作された遺伝子」とは、野生型遺伝子と同一でないよう、何らかの方法で変更された遺伝子を指す。変更は、標的化された欠失、挿入およびトランケーションの形態であり得る。遺伝子操作された遺伝子は、2つの異種遺伝子由来のコード配列を含み得るか、または合成遺伝子配列を含み得る。遺伝子操作された遺伝子はまた、タンパク質配列においてサイレントな（例えば、コドン最適化）変化をコード配列中に含み得る。遺伝子操作された遺伝子は、変更された調節配列を有する遺伝子もまた含み得る。

30

## 【0129】

「遺伝子発現」とは、遺伝子中に含まれる情報の、遺伝子産物への変換を指す。遺伝子産物は、遺伝子の直接的転写産物（例えば、mRNA、tRNA、rRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、構造的RNAまたは任意の他の型のRNA）、またはmRNAの翻訳によって産生されたタンパク質であり得る。遺伝子産物には、キャッピング、ポリアデニル化、メチル化および編集などの過程によって修飾されたRNA、ならびに例えば、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADP-リボシル化、ミリストイル化（myristylation）およびグリコシル化によって修飾されたタンパク質もまた含まれる。

40

## 【0130】

遺伝子発現の「モジュレーション」とは、遺伝子の活性における変化を指す。発現のモジュレーションには、遺伝子活性化および遺伝子抑制が含まれ得るが、これらに限定されない。ゲノム編集（例えば、開裂、変更、不活性化、ランダム突然変異）が、発現をモジュレートするために使用され得る。遺伝子不活性化とは、本明細書に記載されるCRIS

50

P R / C a s 系を含まない細胞と比較して、遺伝子発現における任意の低下を指す。したがって、遺伝子不活性化は、部分的または完全であり得る。

#### 【 0 1 3 1 】

「植物」細胞には、単子葉 (monocotyledonous / monocots) または双子葉 (dicotyledonous / dicots) 植物の細胞が含まれるがこれらに限定されない。単子葉の非限定的な例には、穀物植物、例えば、トウモロコシ、イネ、オオムギ、カラスムギ、コムギ、ソルガム、ライムギ、サトウキビ、パイナップル、タマネギ、バナナおよびココナツが含まれる。双子葉の非限定的な例には、タバコ、トマト、ヒマワリ、ワタ、サトウダイコン、ジャガイモ、レタス、メロン、ダイズ、キャノーラ（ナタネ）およびアルファルファが含まれる。植物細胞は、植物の任意の部分由来および／または植物の任意の発生段階由来であり得る。10

#### 【 0 1 3 2 】

「目的の領域」は、外因性分子に結合することが望まれる、細胞クロマチンの任意の領域、例えば、遺伝子または遺伝子内もしくは遺伝子に隣接した非コード配列などである。結合は、標的化されたDNA開裂および／または標的化された組換えを目的とすることができる。目的の領域は、例えば、染色体、エピソーム、オルガネラゲノム（例えば、ミトコンドリア、葉緑体）、または感染性ウイルスゲノム中に存在し得る。目的の領域は、遺伝子のコード領域内、例えばリーダー配列、トレーラー配列もしくはイントロンなどの転写された非コード領域内、またはコード領域の上流もしくは下流のいずれかの非転写領域内に存在し得る。目的の領域は、単一のヌクレオチド対ほどの小ささもしくは最大2,000ヌクレオチド対の長さ、または任意の整数値のヌクレオチド対であり得る。20

#### 【 0 1 3 3 】

「真核生物」細胞には、真菌細胞（例えば酵母）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞およびヒト細胞（例えば、T細胞）が含まれるがこれらに限定されない。

#### 【 0 1 3 4 】

「赤血球（red blood cell）」（RBC）または赤血球（erythrocyte）は、造血幹細胞由来の高分化型細胞である。これらは、ヌクレアーゼおよびほとんどの細胞オルガネラを欠いている。RBCは、肺から末梢組織に酸素を運搬するためのヘモグロビンを含む。実際、個々のRBCの33%が、ヘモグロビンである。これらはまた、代謝の間に細胞によって組織から生成されるCO<sub>2</sub>を運搬し、息を吐く間の放出のために肺に戻る。RBCは、腎臓によるエリスロポエチン（EPO）の放出によって媒介されて、血液低酸素に応答して骨髄において産生される。EPOは、前赤芽球の数の増加を引き起こし、完全なRBC成熟に必要な時間を短縮させる。およそ120日後、RBCは、核も任意の他の再生能も含まないので、これらの細胞は、肝臓、脾臓およびリンパ節におけるマクロファージの食作用活性（約90%）、または血漿における溶血（約10%）のいずれかによって、循環から除去される。マクロファージの貪食後、RBCの化学的構成成分は、リソソーム酵素の作用に起因して、マクロファージの液胞内で分解される。30

#### 【 0 1 3 5 】

「分泌組織」は、個々の細胞から、典型的には上皮由来のある型の内腔へと産物を分泌する、動物中の組織である。胃腸管に局在する分泌組織の例には、腸、胰臓および胆嚢を裏打ちする細胞が含まれる。他の分泌組織には、肝臓、眼に関連する組織、ならびに粘膜、例えば、唾液腺、乳腺、前立腺、脳下垂体、および内分泌系の他のメンバーが含まれる。さらに、分泌組織には、分泌が可能な組織型の個々の細胞が含まれる。40

#### 【 0 1 3 6 】

用語「作動可能な連結」および「作動可能に連結した（「operatively linked」または「operably linked」）」は、2つまたはそれ超の構成成分（例えば、配列エレメント）の並置に関して相互交換可能に使用され、ここで、これらの構成成分は、両方の構成成分が正常に機能し、他の構成成分のうちの少なくとも1つに対して発揮される機能をこれらの構成成分のうちの少なくとも1つが媒介し得る可能50

性を許容するように、配置される。例示として、転写調節配列、例えばプロモーターは、転写調節配列が、1または複数の転写調節因子の存在または非存在に応答してコード配列の転写のレベルを制御する場合、コード配列に作動可能に連結される。転写調節配列は、一般に、コード配列とシスで作動可能に連結されるが、このコード配列に直接隣接する必要はない。例えば、エンハンサーは、エンハンサーとコード配列とが連続していない場合であっても、コード配列に作動可能に連結した転写調節配列である。

#### 【0137】

融合ポリペプチドに関して、用語「作動可能に連結した」とは、構成成分の各々が、他の構成成分と連結して、そのように連結されていない場合にそれが果たすのと同じ機能を果たすという事実を指し得る。例えば、Cas DNA結合ドメインが活性化ドメインに融合された融合ポリペプチドに関して、このCas DNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、この融合ポリペプチド中で、Cas DNA結合ドメイン部分がその標的部位および/またはその結合部位に結合できるが、活性化ドメインは遺伝子発現を上方調節できる場合に、作動可能な連結状態にある。Cas DNA結合ドメインが開裂ドメインに融合した融合ポリペプチドの場合、Cas DNA結合ドメインおよび開裂ドメインは、この融合ポリペプチド中で、Cas DNA結合ドメイン部分がその標的部位および/またはその結合部位に結合できるが、開裂ドメインは標的部位の近位においてDNAを開裂できる場合に、作動可能な連結状態にある。

#### 【0138】

タンパク質、ポリペプチドまたは核酸の「機能的断片」は、その配列が全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同一ではないが、その全長タンパク質、ポリペプチドまたは核酸と同じ機能を保持する、タンパク質、ポリペプチドまたは核酸である。機能的断片は、対応する天然の分子よりも多い、より少ない、もしくは同じ数の残基を有し得、および/または、1もしくは複数のアミノ酸もしくはヌクレオチド置換を含み得る。核酸の機能（例えば、コード機能、別の核酸にハイブリダイズする能力）を決定するための方法は、本技術分野で周知である。同様に、タンパク質機能を決定するための方法は周知である。例えば、ポリペプチドのDNA結合機能は、例えば、フィルター結合、電気泳動移動度シフトまたは免疫沈降アッセイによって、決定され得る。DNA開裂は、ゲル電気泳動によってアッセイされ得る。Ausubelら、上記を参照されたい。タンパク質が別のタンパク質と相互作用する能力は、例えば、共免疫沈降、ツーハイブリッドアッセイまたは遺伝学的および生化学的の両方の補完によって、決定され得る。例えば、Fieldsら(1989年)Nature 340巻：245～246頁；米国特許第5,585,245号およびPCTWO98/44350を参照されたい。

#### 【0139】

「ベクター」は、標的細胞に遺伝子配列を移入させることが可能である。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」および「遺伝子移入ベクター」は、目的の遺伝子の発現を指向することが可能であり、標的細胞に遺伝子配列を移入させることができる、任意の核酸構築物を意味する。したがって、この用語は、クローニングビヒクルおよび発現ビヒクル、ならびに組込みベクターを含む。

#### 【0140】

「レポーター遺伝子」または「レポーター配列」とは、好ましくは、慣用的なアッセイにおいてである必要はないが、容易に測定されるタンパク質産物を产生する任意の配列を指す。適切なレポーター遺伝子には、抗生物質抵抗性（例えば、アンピシリン抵抗性、ネオマイシン抵抗性、G418抵抗性、ピューロマイシン抵抗性）を媒介するタンパク質をコードする配列、着色または蛍光もしくは発光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質、高感度緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）ならびに増強された細胞成長および/または遺伝子増幅を媒介するタンパク質（例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ）をコードする配列が含まれるがこれらに限定されない。エピトープタグには、例えば、FLAG、His、myc、Tap、HAまたは任意の検出可能なアミノ酸配列の1または複数のコピーが含まれる。「発現タグ」には、目的の遺伝子の発現をモニタリ

10

20

30

40

50

ングするために、所望の遺伝子配列に作動可能に連結され得るレポーターをコードする配列が含まれる。

#### 【0141】

用語「対象」および「患者」は、相互交換可能に使用され、哺乳動物、例えば、ヒト患者および非ヒト霊長類、ならびに実験動物、例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウスおよび他の動物を指す。したがって、用語「対象」または「患者」は、本明細書で使用する場合、本発明の幹細胞が投与され得る任意の哺乳動物の患者または対象を意味する。本発明の対象には、例えば神経毒を含む1または複数の化学的毒素に曝露された対象が含まれる。

C R I S P R / C a s 系

10

#### 【0142】

説得力のある証拠が、最近、真核生物RNAi経路と並行すると仮定されていた、古細菌および多くの細菌におけるRNA媒介性ゲノム防御経路の存在について浮かび上がってきた（概説については、GoddeおよびBickerton、2006年。J. Mol. Evol. 62巻：718～729頁；Lillestolら、2006年。Archaea 2巻：59～72頁；Makarovaら、2006年。Biol. Direct 1巻：7頁；Sorekら、2008年。Nat. Rev. Microbiol. 6巻：181～186頁を参照）。C R I S P R - C a s 系または原核生物RNAi（pRNAi）としても公知であるが、この経路は、2つの、進化的に、および多くの場合物理的に関連した遺伝子座から生じると提唱されている：この系のRNA構成成分をコードするC R I S P R（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）遺伝子座、およびタンパク質をコードするc a s（C R I S P R関連）遺伝子座（Jansenら、2002年。Mol. Microbiol. 43巻：1565～1575頁；Makarovaら、2002年。Nucleic Acids Res. 30巻：482～496頁；Makarovaら、2006年。Biol. Direct 1巻：7頁；Hافتら、2005年。P L O S Comput. Biol. 1巻：e60頁）。微生物宿主中のC R I S P R遺伝子座は、C R I S P R関連（C a s）遺伝子ならびにC R I S P R媒介性の核酸開裂の特異性をプログラムすることが可能な非コードRNAエレメントの組合せを含む。個々のC a sタンパク質は、真核生物RNAi機械のタンパク質構成成分と顕著な配列類似性を共有しないが、類似した予測された機能（例えば、RNA結合、スクレアーゼ、ヘリカーゼ等）を有する（Makarovaら、2006年。Biol. Direct 1巻：7頁）。C R I S P R関連（c a s）遺伝子は、多くの場合、C R I S P Rリピート-スペーサーアレイと関連する。40よりも多くの異なるC a sタンパク質ファミリーが記載されている。これらのタンパク質ファミリーのうち、C a s 1は、異なるC R I S P R / C a s 系の間で遍在するようである。c a s遺伝子およびリピート構造の特定の組合せは、8つのC R I S P Rサブタイプ（E c o l i 、Y p e s t 、N m e n i 、D v u l g 、T n e a p 、H m a r i 、A p e r n およびM t u b e ）を規定するために使用されており、そのうちいくつかは、リピート関連ミステリアスタンパク質（r e p e a t - a s s o c i a t e d m y s t e r i o u s p r o t e i n ( R A M P ) ）をコードするさらなる遺伝子モジュールと関連する。1つよりも多いC R I S P Rサブタイプが、単一のゲノム中に存在し得る。C R I S P R / C a s サブタイプの孤発性の分布は、この系が、微生物の進化の間の水平遺伝子移入に供されることを示唆する。

20

30

40

50

#### 【0143】

S . p y o g e n e s において最初に記載されたI I型C R I S P Rは、最もよく特徴付けられた系の1つであり、4つの逐次的ステップで、標的化されたDNA二本鎖切断を実施する。第1に、2つの非コードRNA、p r e - c r RNAアレイおよびt r a c r RNAが、C R I S P R遺伝子座から転写される。第2に、t r a c r RNAは、p r e - c r RNAのリピート領域にハイブリダイズし、個々のスペーサー配列を含む成熟c r RNAへのp r e - c r RNAのプロセシングを媒介し、このとき、プロセシングは、C

as 9 タンパク質の存在下で二本鎖特異的 RNase III によって起こる。第 3 に、成熟 c r R N A : t r a c r R N A 複合体は、標的認識のためのさらなる要求、c r R N A 上のスペーサーとプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) の隣の標的DNA上のプロトスペーサーとの間の Watson - Crick 塩基対合を介して、標的DNAにCas 9 を指向させる。さらに、この t r a c r R N A は、その 3' 末端において c r R N A と塩基対合するようにも存在していなければならず、この会合は、Cas 9 活性を誘発する。最後に、Cas 9 は、標的DNAの開裂を媒介して、プロトスペーサー内の二本鎖切断を生じる。C R I S P R / Cas 系の活性は、3つのステップから構成される：( i ) 「適応」と呼ばれる過程における、将来の攻撃を防止するための、C R I S P R アレイ中への異質DNA配列の挿入、( ii ) 関連タンパク質の発現、ならびにアレイの発現およびプロセシング、その後の、( iii ) 異質核酸によるRNA媒介性の干渉。したがって、細菌細胞では、いわゆる「Cas」タンパク質のいくつかが、C R I S P R / Cas 系の天然機能と関連する。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 4 】

I I 型 C R I S P R 系は、多くの異なる細菌において見出されている。F on f a r a l a ( ( 2 0 1 3 年 ) Nuc Acid Res 4 2 卷 ( 4 号 ) : 2 3 7 7 ~ 2 5 9 0 頁 ) によって公に入手可能なゲノムに対する B L A S T 検索は、3 4 7 種の細菌において Cas 9 オルソログを見出した。さらに、この群は、S . p y o g e n e s 、S . m u t a n s 、S . t h e r o p h i l u s 、C . j e j u n i 、N . m e n i n g i t i d e s 、P . m u l t o c i d a および F . n o v i c i d a 由来の Cas 9 オルソログを使用した、DNA 標的の in vitro での C R I S P R / Cas 開裂を実証した。したがって、用語「Cas 9」とは、1 つのDNA結合ドメインおよび2 つのヌクレアーゼドメインを含むRNAガイドされるDNAヌクレアーゼを指し、Cas 9 をコードする遺伝子は、任意の適切な細菌に由来し得る。

## 【 0 1 4 5 】

この Cas 9 タンパク質は、少なくとも2 つのヌクレアーゼドメインを有する：一方のヌクレアーゼドメインは、H N H エンドヌクレアーゼと類似するが、他方は、R u v エンドヌクレアーゼドメインと似ている。H N H 型ドメインは、c r R N A と相補的なDNA鎖を開裂させることを担うようであるが、R u v ドメインは、非相補鎖を開裂させる。この Cas 9 ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼドメインの1 つのみが機能的であるように遺伝子操作され得、Cas ニッカーゼを生じる ( J i n e k l a 、同書を参照 ) 。ニッカーゼは、酵素の触媒ドメイン中のアミノ酸の特異的突然変異によって、またはそれがもはや機能的でなくなるような、ドメインの一部もしくは全てのトランケーションによって、生成され得る。Cas 9 は、2 つのヌクレアーゼドメインを含むので、このアプローチは、いずれのドメインに対しても行われ得る。二本鎖切断は、斯かる2 つの Cas 9 ニッカーゼの使用によって、標的DNAにおいて達成され得る。これらのニッカーゼは、各々DNAの一方の鎖を開裂させ、2 つのニッカーゼの使用は、二本鎖切断を生じる。

## 【 0 1 4 6 】

C R I S P R 遺伝子座の一次産物は、侵入者標的化配列を含む短いRNAであるようであり、この経路における仮定されたそれらの役割に基づいて、ガイドRNAまたは原核生物サイレンシングRNA (psiRNA) と称される ( M a k a r o v a l a 、 2 0 0 6 年 . B i o l . D i r e c t 1 卷 : 7 頁 ; H a l e l a 、 2 0 0 8 年 . R N A 、 1 4 卷 : 2 5 7 2 ~ 2 5 7 9 頁 ) 。RNA分析は、C R I S P R 遺伝子座の転写物が、個々の侵入者標的化配列および隣接するリピート断片を含む約 6 0 n t ~ 7 0 n t のRNA中間体を放出するように、リピート配列内で開裂されることを示している ( T a n g l a 2 0 0 2 年 . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 9 9 卷 : 7 5 3 6 ~ 7 5 4 1 頁 ; T a n g l a 、 2 0 0 5 年 . M o l . M i c r o b i o l . 5 5 卷 : 4 6 9 ~ 4 8 1 頁 ; L i l l e s t o l a 2 0 0 6 年 . A r c h a e a 2 卷 : 5 9 ~ 7 2 頁 ; B r o u n s l a 2 0 0 8 年 . S c i e n c e 3 2 1 卷 : 9 6 0 ~ 9 6 4 頁 ; H a l e l a 、 2 0 0 8 年 . R N A 、 1 4 卷 : 2 5 7 2 ~ 2 5 7 9 頁 ) 。古細菌 Pyrococcus

*c c u s f u r i o s u s*では、これらの中間体RNAは、豊富で安定な約35nt～45ntの成熟psiRNAへとさらにプロセシングされる(Haleら 2008年).

RNA、14巻：2572～2579頁)。crRNA-tracrRNA複合体の要求は、crRNAおよびtracrRNAのアニーリングによって通常形成されるヘアピンを含む遺伝子操作された「単一ガイドRNA」(sgRNA)の使用によって回避され得る(Jinekら(2012年)Science 337巻：816頁およびCongら(2013年)Science express/10.1126/science.1231143を参照)。S.pyrogenesでは、遺伝子操作されたtracrRNA:crRNA融合物またはsgRNAは、二本鎖RNA:DNAへテロ二量体がCas関連RNAと標的DNAとの間で形成する場合、Cas9が標的DNAを開裂するようにガイドする。Cas9タンパク質とPAM配列を含む遺伝子操作されたsgRNAとを含むこの系は、RNAガイドされるゲノム編集に使用されており(Ramalingam同書を参照)、ZFNおよびTALENと類似の編集効率で、in vivoでゼブラフィッシュ胚ゲノム編集に有用である(Hwangら(2013年)Nature Biotechnology 31巻(3号)：227頁を参照)。

他のCasタンパク質

#### 【0147】

「Cas1」ポリペプチドとは、CRISPR関連(Cas)タンパク質1を指す。Cas1(タンパク質分類系のClusters of Orthologous Group中のCOG1518)は、CRISPR関連系(CASS)の最良のマーカーである。系統発生学的比較に基づいて、7つの個別のバージョンのCRISPR関連免疫系が同定されている(CASS1～7)。

#### 【0148】

本明細書に記載される方法で使用されるCas1ポリペプチドは、任意の原核生物中に存在する任意のCas1ポリペプチドであり得る。ある特定の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、古細菌微生物のCas1ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、Euryarchaeota微生物のCas1ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、Crenarchaeota微生物のCas1ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、細菌のCas1ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、グラム陰性細菌またはグラム陽性細菌のCas1ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、*Pseudomonas aeruginosa*のCas1ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、*Aquifex aeolicus*のCas1ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、CASS1～7のうちの1つのメンバーであるCas1ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、CASS3のメンバーであるCas1ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、CASS7のメンバーであるCas1ポリペプチドである。ある特定の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、CASS3またはCASS7のメンバーであるCas1ポリペプチドである。

#### 【0149】

一部の実施形態では、Cas1ポリペプチドは、例えば、GeneID番号：2781520、1006874、9001811、947228、3169280、2650014、1175302、3993120、4380485、906625、3165126、905808、1454460、1445886、1485099、4274010、888506、3169526、997745、897836もしくは1193018においてGenBank中に提供されるスクレオチド配列、および/またはこれらのポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸に対して相同性(例えば、80%よりも高い、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%を含む90～99%)を示すアミノ酸配列によってコードされ、これらのポリペプチドは、C

10

20

30

40

50

a s 1 ポリペプチドとして機能する。

【 0 1 5 0 】

C a s 6 は、別の C a s ポリペプチドであり、エンドリボヌクレアーゼ活性は、本明細書では、C a s 6 エンドリボヌクレアーゼ活性と呼ばれる。適切な C a s 6 ポリペプチドの非限定的な例は、G e n b a n k アクセッション番号 A A L 8 1 2 5 5 に示される。C a s 6 ポリペプチドは、例えば P y r o c o c c u s f u r i o s u s であるがそれに限定されない、C R I S P R 遺伝子座および c a s ( C R I S P R 関連) 遺伝子座を有する微生物から、濃縮、単離もしくは精製され得、または組換え技法を使用して生成され得る、または慣用的な方法を使用して化学的もしくは酵素的に合成され得る。一部の態様では、C a s 6 ポリペプチドは、C R I S P R 遺伝子座を有さない微生物から濃縮、単離もしくは精製され得る。C a s 6 ポリペプチドは、C 末端の近くに G h G x x x x x G h G (配列番号 2 1 6 ) モチーフ (ここで、「h」は、疎水性アミノ酸を示す) を含み得る。A r g または L y s は、5 アミノ酸の中心的ストレッチ内に見出され得、多くの場合、見出される。C a s 6 ポリペプチドは、触媒において役割を果たし得る少なくとも 1 つの残基またはその保存的置換を含む。C a s 6 ポリペプチドは、触媒においても役割を果たし得る他の残基またはその保存的置換を含み得る。触媒において役割を果たすと予測される残基 (複数可) は、タンパク質の 3 D 構造中に C a s 6 シグネチャー モチーフを含む G リ ッチループの近くに位置し得る。C a s 6 ポリペプチドは、アクセッション番号 T I G R 0 1 8 7 7 および P F 0 1 8 8 1 において T I G R F A M データベース中に存在するドメインを含み得る。この T I G R F A M データベースは、機能が保存されるポリペプチドのファミリーを含む (H a f t ら、N u c l . A c i d s R e s . 、2 0 0 3 年、3 1 卷：3 7 1 ~ 3 7 3 頁、B a t e m a n および H a f t 、2 0 0 2 年、B r i e f i n g s B i o i n f o r m a t i c s 、3 卷：2 3 6 ~ 2 4 5 頁、ならびに H a f t ら、2 0 0 5 年、P L o S C o m p u t a t i o n a l B i o l . 、1 卷 (6 号) : e 6 0 頁)。

【 0 1 5 1 】

本明細書に提供される C a s 6 ポリペプチドの他の例には、C R I S P R 遺伝子座および c a s 遺伝子座を有する原核生物微生物中に存在するものが含まれる。C a s 6 ポリペプチドは、C R I S P R 遺伝子座を含む任意の微生物において容易に同定され得る。C a s 6 ポリペプチドをコードするコード領域は、典型的には、C R I S P R 遺伝子座の近位に位置する c a s 遺伝子座中に存在する。H a f t ら (2 0 0 5 年、P L o S C o m p u t a t i o n a l B i o l . 、1 卷 (6 号) : e 6 0 頁) は、C a s タンパク質ファミリーを概説しており、C R I S P R / C a s 系の特定のサブタイプの同定のための規則を作りだした。H a f t らは、少なくとも 4 つの別々の C R I S P R / C a s サブタイプ (T ne a p 、H m a r i 、A p e r n および M t u b e ) と会合して見出され、典型的には、C R I S P R 遺伝子座に対して最も遠位に位置する c a s コード領域である、C a s 6 ポリペプチドをコードするコード領域を記載している。C a s 6 ポリペプチドは、J C V I C o m p r e h e n s i v e M i c r o b i a l R e s o u r c e において入手可能な資源を使用して同定され得る。したがって、本明細書に記載される方法において有用な C a s 6 ポリペプチドは、慣用的な方法を使用して当業者によって同定され得る。

【 0 1 5 2 】

C a s 6 ポリペプチドをコードすると予測されるコード領域を含む公知の全ゲノム配列を有する原核生物微生物の例には、T h e r m o t o g a m a r i t i m a M S B 8 、C a m p y l o b a c t e r f e t u s s u b s p . f e t u s 8 2 - 4 0 、F u s o b a c t e r i u m n u c l e a t u m A T C C 2 5 5 8 6 、S t r e p t o c o c c u s t h e r m o p h i l u s L M G 1 8 3 1 1 、T h e r m o a n a e r o b a c t e r t e n g c o n g e n s i s M B 4 ( T ) 、M o o r e l l a t h e r m o a c e t i c a A T C C 3 9 0 7 3 、D e s u l f i t o b a c t e r i u m h a f n i e n s e Y 5 1 、C l o s t r i d i u m t e t a n i E 8 8

10

20

30

40

50

、*Clostridium perfringens* SM101、*Clostridium difficile* QCD-32g58、*Clostridium botulinum* Hall A Sanger、*Clostridium botulinum* F Langeland、*Clostridium botulinum* B1 Okra株、*Clostridium botulinum* A3 Loch Maree株、*Clostridium botulinum* A Hall、*Clostridium botulinum* A ATCC 19397、*Carboxydotermus hydrogenoformans* Z-2901、*Staphylococcus epidermidis* RP62A、*Thermus thermophilus* HB8、*Thermus thermophilus* HB27、*Nostoc* sp. PCC 7120、*Anabaena variabilis* ATCC 29413、*Synechococcus* sp. OS Type B prime、*Synechococcus* sp. OS Type A、*Porphyromonas gingivalis* W83、*Bacteroides fragilis* YCH46、*Bacteroides fragilis* NCTC9343、*Aquifex aeolicus* VF5、*Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv(実験室株)、*Mycobacterium tuberculosis* CDC1551、*Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* AF2122/97、*Frankia alni* ACN14a、*Thermoplasma volcanium* GSS1、*Picrophilus torridus* DSM 9790、*Thermococcus kodakarensis* KOD1、*Pyrococcus horikoshii shinkaij* OT3、*Pyrococcus furiosus* DSM 3638、*Pyrococcus abyssi* GE5、*Methanosaarcina barkeri fusaro*、*Methanosaarcina acetylivorans* C2A、*Methanococcoides burtonii* DSM 6242、*Methanococcus jannaschii* DSM2661、*Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H、*Haloarcula marismortui* ATCC 43049、*Archaeoglobus fulgidus* DSM4304、*Pyrobaculum aerophilum* 1M2、*Sulfolobus tokodaii* 株7、*Sulfolobus solfataricus* P2、*Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639、*Aeropyrum pernix* K1が含まれる。Cas6ポリペプチドの他の例は、当業者に公知であり、例えば、COG1583群のポリペプチドのメンバー(National Center for Biotechnology Informationのインターネットサイトを通じて、タンパク質のClusters of Orthologous Groups(COG)ウェブページにおいて入手可能、Tatusovら(1997年)、Science、278巻：631～637頁、およびTatusovら(2003年)、BMC Bioinformatics、4巻(1号)：41頁もまた参照)、アクセション番号IPRO10156を有するInterProファミリーのメンバー、Makarovaら(2002年)、Nuc. Acids Res.、30巻：482～496頁およびHافتら(2005年)、PLoS Comput. Biol.、1巻(6号)：e60、474～483頁)を参照されたい。

### 【0153】

ある特定の実施形態では、Casタンパク質は、天然起源のCasタンパク質の「機能的誘導体」であり得る。天然配列ポリペプチドの「機能的誘導体」は、天然配列ポリペプチドと共に定性的な生物学的特性を有する化合物である。「機能的誘導体」には、対応する天然配列ポリペプチドと共に生物学的活性を有することを条件として、天然配列の断片ならびに天然配列ポリペプチドおよびその断片の誘導体が含まれるがこれらに限

10

20

30

40

50

定されない。本明細書で企図される生物学的活性は、D N A 基質を断片に加水分解する機能的誘導体の能力である。用語「誘導体」は、ポリペプチドのアミノ酸配列バリエント、共有結合的修飾、およびその融合物の両方を包含する。一部の態様では、機能的誘導体は、天然起源のC a s タンパク質の単一の生物学的特性を含み得る。他の態様では、機能誘導体は、天然起源のC a s タンパク質の生物学的特性のサブセットを含み得る。

#### 【0154】

「C a s 1 ポリペプチド」は、全長C a s ポリペプチド、C a s ポリペプチドの酵素的に活性な断片、およびC a s ポリペプチドまたはその断片の酵素的に活性な誘導体を包含する。C a s ポリペプチドまたはその断片の適切な誘導体には、C a s タンパク質またはその断片の突然変異体、融合物、共有結合的修飾が含まれるがこれらに限定されない。C a s タンパク質またはその断片を含むC a s タンパク質、ならびにC a s タンパク質またはその断片の誘導体は、細胞から取得可能であり得るか、もしくは化学的に合成され得るか、またはこれらの2つの手順の組合せによって、取得可能であり得る。この細胞は、C a s タンパク質を天然に産生する細胞、またはC a s タンパク質を天然に産生し、より高い発現レベルで内因性C a s タンパク質を産生するように、もしくは外因的に導入された核酸からC a s タンパク質を産生するように遺伝子操作された細胞であり得、この核酸は、内因性C a s と同じまたは異なるC a s をコードする。ある場合には、この細胞は、C a s タンパク質を天然には産生せず、C a s タンパク質を産生するように遺伝子操作される。

10

#### 【0155】

このC R I S P R / C a s 系は、遺伝子発現を阻害するためにも使用され得る。Leiら((2013年)Cell、152巻、(5号):1173~1183頁を参照)は、エンドヌクレアーゼ活性を欠く触媒的に死んだC a s 9が、ガイドR N Aと同時発現される場合、転写的伸長、R N Aポリメラーゼ結合または転写因子結合を特異的に妨害できるD N A認識複合体を生成することを示している。C R I S P R干渉(C R I S P R i)と呼ばれるこの系は、標的化された遺伝子の発現を効率的に抑制できる。

20

#### 【0156】

本発明のC a s タンパク質は、機能性を変更するために突然変異され得る。ファージディスプレイおよびツーハイブリッドシステムを含む例示的な選択方法は、米国特許第5,789,538号; 第5,925,523号; 第6,007,988号; 第6,013,453号; 第6,410,248号; 第6,140,466号; 第6,200,759号; および第6,242,568号; ならびにWO98/37186; WO98/53057; WO00/27878; WO01/88197およびGB2,338,237に開示されている。さらに、ジンクフィンガー結合ドメインに対する結合特異性の増強は、例えば、共同所有されたWO02/077227に記載されている。

30

#### 【0157】

標的部位の選択; 融合タンパク質(およびそれをコードするポリヌクレオチド)の設計および構築のためのD N A結合ドメインおよび方法は、当業者に公知であり、米国特許第8,586,526号; 第6,140,081号; 第5,789,538号; 第6,453,242号; 第6,534,261号; 第5,925,523号; 第6,007,988号; 第6,013,453号; 第6,200,759号; WO95/19431; WO96/06166; WO98/53057; WO98/54311; WO00/27878; WO01/60970; WO01/88197; WO02/099084; WO98/53058; WO98/53059; WO98/53060; WO02/016536およびWO03/016496に詳細に記載されている。

40

#### B. 機能的ドメイン

#### 【0158】

本明細書に記載される系は、標的遺伝子に対して作用するために、单一ガイドR N Aと会合する任意の適切な機能的ドメインを含み得る。機能的ドメインの非限定的な例には、転写活性化ドメイン、転写抑制ドメインおよび/またはヌクレアーゼドメインが含まれる

50

。例えば、米国特許第6,534,261号；および第8,409,861号を参照されたい。

### 【0159】

ある特定の実施形態では、この機能的ドメインは、1または複数の開裂ドメインを含む。例えばCRISPR/Cas系の单一ガイドRNAにとって異種の機能的ドメインなど、この機能的ドメイン（例えば、開裂ドメイン）は、DNA結合ドメインにとって異種であり得る。異種開裂ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得られ得る。開裂ドメインが由来し得る例示的なエンドヌクレアーゼには、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼが含まれるがこれらに限定されない。例えば、2002～2003年カタログ、New England Biolabs, Beverly, MA；およびBel fortら(1997年)Nucleic Acids Res. 25巻：3379～3388頁を参照されたい。DNAを開裂するさらなる酵素が公知である（例えば、S1ヌクレアーゼ；リヨクトウヌクレアーゼ；臍臓DNase I；小球菌ヌクレアーゼ；酵母HOエンドヌクレアーゼ；Linnら(編)Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press、1993年もまた参照）。これらの酵素（またはその機能的断片）のうちの1または複数は、開裂ドメインおよび開裂ハーフドメインの供給源として使用され得る。一部の実施形態では、Casタンパク質は、異種ヌクレアーゼドメインに連結され得る。一部の様では、このCasタンパク質は、二本鎖開裂がFokIヌクレアーゼドメインの二量体形成に依存するようにFokIヌクレアーゼドメインに連結された、ヌクレアーゼ活性を欠くCas9タンパク質である。  
10

### 【0160】

同様に、開裂ハーフドメインは、開裂活性のために二量体形成を必要とする、上記のような任意のヌクレアーゼまたはその一部に由来し得る。一般に、融合タンパク質が開裂ハーフドメインを含む場合、2つの融合タンパク質が、開裂に必要とされる。あるいは、2つの開裂ハーフドメインを含む单一のタンパク質が使用され得る。これら2つの開裂ハーフドメインは、同じエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来し得、または各開裂ハーフドメインは、異なるエンドヌクレアーゼ（またはその機能的断片）に由来し得る。さらに、2つの融合タンパク質についての標的部位は、好ましくは、互いにに関して配置され、その結果、そのそれぞれの標的部位への2つの融合タンパク質の結合は、例えば二量体形成によって開裂ハーフドメインに機能的開裂ドメインを形成させる互いに対する空間的配向に、これらの開裂ハーフドメインを置く。したがって、ある特定の実施形態では、標的部位の近くの端は、5～8ヌクレオチドまたは15～18ヌクレオチド離れている。しかし、任意の整数のヌクレオチドまたはヌクレオチド対が、2つの標的部位間に介在し得る（例えば、2～50ヌクレオチド対またはそれ超）。一般に、開裂の部位は、標的部位間に存在する。  
20

### 【0161】

制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素）は、多くの種に存在しており、（認識部位における）DNAへの配列特異的結合が可能であり、結合の部位またはその近傍でDNAを開裂させることができ。ある特定の制限酵素（例えば、IIS型）は、認識部位から取り出された部位においてDNAを開裂させ、分離可能な結合ドメインおよび開裂ドメインを有する。例えば、IIS型酵素FokIは、一方の鎖上のその認識部位から9ヌクレオチドおよび他方の鎖上のその認識部位から13ヌクレオチドの場所において、DNAの二本鎖開裂を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号；第5,436,150号および第5,487,994号；ならびにLinn(1992年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89巻：4275～4279頁；Linn(1993年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻：2764～2768頁；Kimら(1994年a)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻：883～887頁；Kimら(1994年b)J. Biol. Chem. 269巻：31,978～31,982頁を参照されたい。したがって、一実施形  
30

態では、融合タンパク質は、遺伝子操作されてもされなくともよい、少なくとも1つのIIS型制限酵素および1または複数のジンクフィンガー結合ドメイン由来の開裂ドメイン（または開裂ハーフドメイン）を含む。

#### 【0162】

その開裂ドメインが結合ドメインから分離可能である例示的なIIS型制限酵素は、Fok Iである。この特定の酵素は、二量体として活性である。Britten et al. (1998年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95巻: 10, 570~10, 575頁。したがって、本開示の目的のため、開示された融合タンパク質において使用されるFok I酵素の一部は、開裂ハーフドメインとみなされる。したがって、ジンクフィンガー-Fok I融合物を使用した細胞配列の標的化された二本鎖開裂および/または標的化された置き換えのために、各々がFok I開裂ハーフドメインを含む2つの融合タンパク質が、触媒的に活性な開裂ドメインを再構成するために使用され得る。あるいは、1つのDNA結合ドメインおよび2つのFok I開裂ハーフドメインを含む単一のポリペプチド分子もまた、使用され得る。

10

#### 【0163】

開裂ドメインまたは開裂ハーフドメインは、機能的開裂ドメインを形成するために、開裂活性を保持するまたは多量体形成する（例えば、二量体形成する）能力を保持する、タンパク質の任意の部分であり得る。

#### 【0164】

例示的なIIS型制限酵素は、その全体が本明細書に組み込まれる、国際公開第07/014275号に記載されている。さらなる制限酵素もまた、分離可能な結合および開裂ドメインを含み、これらは、本開示によって企図される。例えば、Roberts et al. (2003年) Nucleic Acids Res. 31巻: 418~420頁を参照されたい。

20

#### 【0165】

ある特定の実施形態では、この開裂ドメインは、例えば、その全ての開示が参考によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第7,914,796号；第8,034,598号；および第8,623,618号に記載されるように、ホモ二量体形成を最小化または防止する1または複数の遺伝子操作された開裂ハーフドメイン（二量体形成ドメイン突然変異体とも呼ばれる）を含む。Fok Iの446位、447位、479位、483位、484位、486位、487位、490位、491位、496位、498位、499位、500位、531位、534位、537位および538位におけるアミノ酸残基は、全て、Fok I開裂ハーフドメインの二量体形成に影響を与えるための標的である。

30

#### 【0166】

偏性ヘテロ二量体を形成するFok Iの例示的な遺伝子操作された開裂ハーフドメインには、第1の開裂ハーフドメインが、Fok Iの490位および538位のアミノ酸残基において突然変異を含み、第2の開裂ハーフドメインが、アミノ酸残基486および499において突然変異を含む、対が含まれる。

#### 【0167】

したがって、一実施形態では、490位における突然変異は、Glu(E)をLys(K)で置き換える；538位における突然変異は、Isoleucine(I)をLys(K)で置き換える；486位における突然変異は、Gln(Q)をGlu(E)で置き換える；499位における突然変異は、Isoleucine(I)をLys(K)で置き換える。具体的には、本明細書に記載される遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、1つの開裂ハーフドメイン中の490位(E-K)および538位(I-K)を突然変異させて、「E490K:I538K」と称される遺伝子操作された開裂ハーフドメインを产生することによって、および別の開裂ハーフドメイン中の486位(Q-E)および499位(I-L)を突然変異させて、「Q486E:I499L」と称される遺伝子操作された開裂ハーフドメインを产生することによって、調製された。本明細書に記載される遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、異常な開裂が最小化または消失される、偏性ヘテロ二量体突然変異体である。ある特

40

50

定の実施形態では、この遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、486位、499位および496位における突然変異（野生型 F o k I に対して番号を付けた）、例えば、486位の野生型 G l n ( Q ) 残基を G l u ( E ) 残基で置き換える突然変異、499位の野生型 I s o ( I ) 残基を L e u ( L ) 残基で置き換える突然変異、および496位の野生型 A s n ( N ) 残基を A s p ( D ) または G l u ( E ) 残基で置き換える突然変異（それぞれ、「E L D」ドメインおよび「E L E」ドメインとも呼ばれる）を含む。他の実施形態では、この遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、490位、538位および537位における突然変異（野生型 F o k I に対して番号を付けた）、例えば、490位の野生型 G l u ( E ) 残基を L y s ( K ) 残基で置き換える突然変異、538位の野生型 I s o ( I ) 残基を L y s ( K ) 残基で置き換える突然変異、および537位の野生型 H i s ( H ) 残基を L y s ( K ) 残基または A r g ( R ) 残基で置き換える突然変異（それぞれ、「K K K」ドメインおよび「K K R」ドメインとも呼ばれる）を含む。他の実施形態では、この遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、490位および537位における突然変異（野生型 F o k I に対して番号を付けた）、例えば、490位の野生型 G l u ( E ) 残基を L y s ( K ) 残基で置き換える突然変異、および537位の野生型 H i s ( H ) 残基を L y s ( K ) 残基または A r g ( R ) 残基で置き換える突然変異（それぞれ、「K I K」ドメインおよび「K I R」ドメインとも呼ばれる）を含む（参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第201110201055号を参照）。本明細書に記載される遺伝子操作された開裂ハーフドメインは、例えば、野生型開裂ハーフドメイン（F o k I ）の部位指定突然変異誘発によって、任意の適切な方法を使用して調製できる。

10

20

30

40

## 【0168】

あるいは、ヌクレアーゼは、いわゆる「開裂酵素（s p l i t - e n z y m e）」技術を使用して、核酸標的部位において i n v i v o でアセンブルされ得る（例えば、米国特許出願公開第20090068164号を参照）。斯かる開裂酵素の構成成分は、別々の発現構築物のいずれか上に発現され得るか、または、例えば、自己開裂性 2 A ペプチドもしくは I R E S 配列によって個々の構成成分が分離されて、1つのオープンリーディングフレームで連結され得る。構成成分は、個々のジンクフィンガー結合ドメインまたはメガヌクレアーゼ核酸結合ドメインのドメインであり得る。

## 【0169】

ヌクレアーゼは、例えば、米国特許第8,563,314号に記載される酵母ベースの染色体系における使用の前に、活性についてスクリーニングされ得る。ヌクレアーゼ発現構築物は、本技術分野で公知の方法を使用して容易に設計され得る。ヌクレアーゼの発現は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター、例えば、ラフィノースおよび／またはガラクトースの存在下で活性化（抑制解除）され、グルコースの存在下で抑制されるガラクトキナーゼプロモーターの制御下にあり得る。

C R I S P R / C a s の R N A 構成成分

## 【0170】

C a s 9 関連の C R I S P R / C a s 系は、同一のダイレクトリピート（D R ）によって空間が置かれたヌクレアーゼガイド配列（スペーサー）を含む、2つの R N A 非コード構成成分：t r a c r R N A および p r e - c r R N A アレイを含む。ゲノム遺伝子操作を達成するために C R I S P R / C a s 系を使用するために、これらの R N A の両方の機能が存在しなければならない（C o n g ら（2013年）S c i e n c e x p r e s s 1 / 1 0 . 1 1 2 6 / s c i e n c e 1 2 3 1 1 4 3 を参照）。一部の実施形態では、t r a c r R N A および p r e - c r R N A は、別々の発現構築物を介して、または別々の R N A として、供給される。他の実施形態では、遺伝子操作された成熟 c r R N A（標的特異性を付与する）が t r a c r R N A（C a s 9との相互作用を供給する）に融合されてキメラ c r - R N A - t r a c r R N A ハイブリッド（単一ガイド R N A とも呼ぶ）を生じる、キメラ R N A が構築される（J i n e k 同書およびC o n g 、同書を参照）。

## 【0171】

キメラまたは s g R N A は、任意の所望の標的に対して相補的な配列を含むように、遺

50

伝子操作され得る。これらのRNAは、形態G[n19]とその後の形態NGGのプロトスペーサー-隣接モチーフ(PAM)の、標的に相補的な22塩基を含む。したがって、1つの方法では、sgRNAは、(i)ZFNへテロ二量体の認識配列を、関連ゲノム(ヒト、マウス、または特定の植物種)の参照配列とアラインメントし；(ii)ZFNハーフ部位(half-site)間のスペーサー領域を同定し；(iii)スペーサー領域に最も近いモチーフG[N20]GGの位置を同定し(1つよりも多いそのようなモチーフがスペーサーと重複する場合、このスペーサーに対して中心にあるモチーフが選択される)；(iv)sgRNAのコアとしてそのモチーフを使用することによって、目的の遺伝子中の既知のZFN標的の利用によって設計され得る。この方法は、有利には、証明されたスクレアーゼ標的に依存する。あるいは、sgRNAは、G[n20]GG式に従う適切な標的配列を同定することによって、任意の目的の領域を簡単に標的化するために設計され得る。相補性領域に沿って、sgRNAは、sgRNAのtracrRNA部分のテイル領域まで延びるさらなるスクレオチドを含み得る(Hsula(2013年)Nature Biotech doi:10.1038/nbt.2647を参照)。テイルは、+67～+85スクレオチドのもの、またはそれらの間の任意の数のものであり得、+85スクレオチドが好み長い長さである。トランケートされたsgRNA、「tru-gRNA」もまた使用され得る(Fuら(2014年)Nature Biotech 32巻(3号)：279頁を参照)。tru-gRNAでは、相補性領域は、17または18スクレオチド長まで減少される。

10

20

30

さらに、代替的PAM配列もまた利用され得、このとき、PAM配列は、*S. pyogenes Cas9*を使用して、NGGの代替としてNAGであり得る(Hsula 2014年、同書)。さらなるPAM配列には、最初のGを欠くものも含まれ得る(SanderおよびJoung(2014年)Nature Biotech 32巻(4号)：347頁)。*S. pyogenes*がコードするCas9のPAM配列に加えて、他の細菌供給源由来のCas9タンパク質に特異的な他のPAM配列が使用され得る。例えば、以下に示すPAM配列(SanderおよびJoung、同書、ならびにEsveltら(2013年)Nat Meth 10巻(11号)：1116頁から適応させた)が、これらのCas9タンパク質に特異的である：

## 【化1】

種	PAM
<i>S. pyogenes</i>	NGG
<i>S. pyogenes</i>	NAG
<i>S. mutans</i>	NGG
<i>S. thermophilicus</i>	NGGNG
<i>S. thermophilicus</i>	NNAAAW
<i>S. thermophilicus</i>	NNAGAA
<i>S. thermophilicus</i>	NNNGATT
<i>C. jejuni</i>	NNNNACA
<i>N. meningitidis</i>	NNNNGATT
<i>P. multocida</i>	GNNNCNNA
<i>F. novicida</i>	NG

40

## 【0173】

したがって、*S. pyogenes* CRISPR/Cas系との使用に適切な標的配

50

列は、以下のガイドラインに従って選択され得る：[ n 1 7 、 n 1 8 、 n 1 9 または n 2 0 ] ( G / A ) G。あるいは、この P A M 配列は、ガイドライン G [ n 1 7 、 n 1 8 、 n 1 9 、 n 2 0 ] ( G / A ) G に従い得る。非 S . p y o g e n e s 細菌由来の C a s 9 タンパク質について、代替的 P A M が S . p y o g e n e s の P A M 配列を置換した、同じガイドラインが使用され得る。

#### 【 0 1 7 4 】

潜在的なオフターゲット配列を回避する最も高い尤度の特異性を有する標的配列を選択することが、最も好ましい。これらの望ましくないオフターゲット配列は、以下の特質を考慮することによって同定され得る： i ) 利用されている C a s 9 タンパク質と共に機能することが公知の P A M 配列が後に続く標的配列における類似性； i i ) 所望の標的配列からの 3 つよりも少ないミスマッチを有する、同様の標的配列； i i i ) i i ) のような類似の標的配列であって、ここで、ミスマッチは、 P A M 近位領域ではなく P A M 遠位領域中に全て位置する（「シード」領域（ W u r a ( 2 0 1 4 年 ) N a t u r e B i o t e c h d o i : 1 0 . 1 0 3 8 / n b t 2 8 8 9 ）と呼ばれることがある、 P A M に直ぐに隣接するまたは P A M に近位のヌクレオチド 1 ~ 5 が、認識にとって最も重要であり、したがって、シード領域中に位置するミスマッチを有する推定オフターゲット部位が、 s g R N A によって認識される可能性が最も低い可能性があるという、いくつかの証拠が存在する）；ならびに i v ) ミスマッチが連続的には離れていない、または 4 よりも多いヌクレオチド離れた、類似の標的配列（ H s u 2 0 1 4 年、同書）。したがって、上記これらの中の潜在的なオフターゲット部位の数の分析を実施することによって、 s g R N A に適切な標的配列が同定され得る。

ドナー

#### 【 0 1 7 5 】

上述した通り、例えば、変異遺伝子を修正するための、または野生型遺伝子の発現を増加させるための、外因性配列（「ドナー配列」または「ドナー」または「導入遺伝子」とも言う）の挿入。ドナー配列は、典型的には、それが配置されるゲノム配列と同一ではないことが容易に明らかとなる。ドナー配列は、2つの相同な領域に隣接する非相同配列を含有し、目的の位置での効率的な H D R を可能とする。あるいは、ドナーは、 D N A の標的位置に相同な領域を持っていなくともよく、標的部位での切断に続く N H E J 依存的末端結合によって組み込まれていてもよい。さらに、ドナー配列は、細胞クロマチン内の目的の領域に相同でない配列を含有するベクター分子を含むことができる。ドナー分子は、細胞クロマチンに相同ないくつかの不連続な領域を含有することができる。例えば、常態では目的の領域に存在しない標的化された配列を挿入するために、前記配列を、ドナー核酸分子中に存在させることができ、目的の領域中の配列に相同な領域を隣接させることができる。

#### 【 0 1 7 6 】

ドナーポリヌクレオチドは、 D N A であっても R N A であってもよく、一本鎖および／または二本鎖であってもよく、直鎖状または環状の形態で細胞内に導入することができる。米国特許出願公開第 2 0 1 0 0 0 4 7 8 0 5 号および第 2 0 1 1 0 2 0 7 2 2 1 号を参照されたい。直鎖状の形態で導入される場合、当業者に公知の方法によって、ドナー配列の末端を保護する（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）ことができる。例えば、1つまたは複数のジデオキシヌクレオチド残基を直鎖状分子の 3' 端に添加する、および／または自己相補的なオリゴヌクレオチドを一端または両端にライゲーションする。例えば、 C h a n g ら、 1 9 8 7 年、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、 8 4 卷： 4 9 5 9 ~ 4 9 6 3 頁、 N e h l s ら、 1 9 9 6 年、 S c i e n c e 、 2 7 2 卷： 8 8 6 ~ 8 8 9 頁を参照されたい。分解から外因性ポリヌクレオチドを保護するための追加的な方法としては、末端アミノ基（複数可）の追加、および例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミダートや O - メチルリボースもしくはデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間の結合の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【0177】

ポリヌクレオチドは、例えば、複製起点、プロモーターや抗生物質耐性をコードしている遺伝子などの追加的な配列を有するベクター分子の部分として、細胞内に導入することができる。さらに、ドナーポリヌクレオチドを、ネイキッド核酸として、リボソームやポロキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として、導入することができ、また、ウイルス（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスおよびインテグラーゼ欠損レンチウイルス（IDLV））によって送達することができる。

## 【0178】

ドナーは、一般に、組み込み部位の内因性プロモーター、即ちドナーが挿入されている内因性遺伝子（例えば、グロビン、AAVS1など）の発現を駆動するプロモーターによって、発現が駆動されるように挿入される。しかし、ドナーが、プロモーターおよび／またはエンハンサー、例えば、構成性のプロモーターまたは誘導可能なもしくは組織特異的なプロモーターを含み得ることが明らかとなる。

10

## 【0179】

ドナー分子は、内因性遺伝子の全てもしくは一部が発現するか、または発現しないように、内因性遺伝子内に挿入されていてもよい。他の実施形態では、導入遺伝子（グロビンをコードする配列があるものまたはないもの）は、任意の内因性遺伝子座、例えば、セーフハーバー遺伝子座に組み込まれる。例えば、米国特許出願公開第20080299580号、第20080159996号および第201000218264号を参照されたい。

20

## 【0180】

さらに、発現を必要としていなくとも、外因性配列は、転写調節配列または翻訳調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インスレーター、内部リボソーム進入部位、2Aペプチドをコードする配列および／またはポリアデニル化シグナルも含み得る。

送達

20

## 【0181】

ヌクレアーゼ、これらのヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチド、ならびに本明細書に記載されているタンパク質および／またはポリヌクレオチドを含む組成物を、任意の適当な手段によって、in vivoまたはex vivoで送達してもよい。

30

## 【0182】

本明細書に記載されているようなヌクレアーゼの送達方法は、例えば、米国特許第6,453,242号、第6,503,717号、第6,534,261号、第6,599,692号、第6,607,882号、第6,689,558号、第6,824,978号、第6,933,113号、第6,979,539号、第7,013,219号および第7,163,824号に記載されており、それらの全ての開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられている。

## 【0183】

また、本明細書に記載されているようなヌクレアーゼおよび／またはドナー構築物を、1種または複数のCRISPR/Cas系（複数可）をコードする配列を含有するベクターを使用して送達してもよい。以下に限定されないが、プラスミドベクター、DNAミニサークル、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターおよびアデノ関連ウイルスベクターなど、ならびにそれらの組合せを含めた任意のベクター系を使用してもよい。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第6,534,261号、第6,607,882号、第6,824,978号、第6,933,113号、第6,979,539号、第7,013,219号および第7,163,824号、ならびに米国特許出願第14/271,008号も参照されたい。さらに、任意のこれらのベクターが、処置に求められる1種または複数の配列を含んでもよいことは明らかである。そのため、1種また

40

50

は複数のヌクレアーゼおよびドナー構築物を細胞内に導入する際に、ヌクレアーゼおよび／またはドナーポリヌクレオチドを同じベクターまたは異なるベクターに保有させてよい。複数のベクターを使用する際には、各ベクターは、1種または複数種のヌクレアーゼおよび／またはドナー構築物をコードする配列を含んでもよい。

#### 【0184】

従来のウイルスおよび非ウイルスに基づく遺伝子移入方法は、細胞（例えば、哺乳動物細胞）および標的組織に、ヌクレアーゼおよびドナー構築物をコードする核酸を導入するために使用することができる。非ウイルスベクター送達系としては、DNAプラスミド、DNAミニサークル、ネイキッド核酸、およびリポソームやポロキサマーなどの送達ビヒクルと複合体を形成している核酸が挙げられる。ウイルスベクター送達系としては、DNAおよびRNAウイルスが挙げられ、これらは細胞へ送達された後に、エピソームゲノムまたは組み込まれたゲノムのどちらかを有する。遺伝子治療の手順については、Anderson、Science、256巻：808～813頁（1992年）、NabelおよびFelgner、TIBTECH、11巻：211～217頁（1993年）、MitaniおよびCaskey、TIBTECH、11巻：162～166頁（1993年）、Dillon、TIBTECH、11巻：167～175頁（1993年）、Miller、Nature、357巻：455～460頁（1992年）、Van Brunt、Biotechnology、6巻（10号）：1149～1154頁（1988年）、Vigne、Restorative Neurology and Neurosciences、8巻：35～36頁（1995年）、KremerおよびPerricaudet、British Medical Bulletin、51巻（1号）：31～44頁（1995年）、Haddadaら、Current Topics in Microbiology and Immunology中のDoerflerおよびBohm著（1995年）およびYula、Gene Therapy、1巻：13～26頁（1994年）を参照されたい。10

#### 【0185】

核酸の非ウイルス送達方法としては、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン、または脂質：核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、ネイキッドRNA、キャップされたRNA、人工ビリオン、および薬剤で増強されたDNA取り込みが挙げられる。例えば、Sonitron 2000システム（Rich-Marr）を使用するソノポレーションも、核酸の送達に使用することができる。20

#### 【0186】

追加的な例示の核酸送達系としては、Amaxa Biosystems（ケルン、ドイツ）、Maxcyte, Inc.（ロックビル、メリーランド州）、BTX Molecular Delivery Systems（ホリストン、マサチューセッツ州）、およびCopernicus Therapeutics Inc.（例えば、米国特許第6,008,336号を参照されたい）によって提供されるものが挙げられる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、第4,946,787号、および第4,897,355号に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている（例えば、Transfectam（商標）およびLipofection（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適した陽イオン性および中性脂質としては、FelgnerのWO91/17424、WO91/16024の脂質が挙げられる。30

#### 【0187】

免疫脂質複合体などの標的化されたリポソームを含めた脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、Crystal、Science、270巻：404～410頁（1995年）、Blaeseら、Cancer Gene Ther.、2巻：291～297頁（1995年）、Behrら、Bioconjugate Chem.、5巻：382～389頁（1994年）；Remyら、Bioconjugate Ch

10

20

30

40

50

em.、5巻：647～654（1994年）、Gaoら、Gene Therapy、2巻：710～722頁（1995年）、Ahmadら、Cancer Res.、52巻：4817～4820頁（1992年）、ならびに米国特許第4,186,183号、第4,217,344号、第4,235,871号、第4,261,975号、第4,485,054号、第4,501,728号、第4,774,085号、第4,837,028号および第4,946,787号を参照されたい）。

#### 【0188】

追加的な送達方法としては、送達される核酸のEngene IC送達ビヒクル（EDV）内へのパッケージングを使用することが挙げられる。これらのEDVは、抗体の1つのアームが標的組織に対する特異性を有し、かつ他方がEDVに対する特異性を有する二重特異性抗体を使用して、標的組織に特異的に送達される。抗体は、EDVを標的細胞の表面に運び、次いでEDVは、エンドサイトーシスにより細胞内に運ばれる。細胞内に取り込まれると、内容物が放出される（MacDiarmidら、（2009年）、Nature Biotechnology、27巻（7号）、643頁を参照されたい）。

10

#### 【0189】

遺伝子操作されたCRISPR/Cas系をコードする核酸を送達するためのRNAまたはDNAウイルスに基づく系の使用は、ウイルスに体内の特定の細胞を標的とさせ、ウイルスペイロードを核に輸送するための高度に進化した過程を利用する。ウイルスペクターは、対象に直接投与（in vivo）することができるか、またはインビトロで細胞を処置するために使用することができ、修飾された細胞は対象に投与される（ex vivo）。CRISPR/Cas系を送達するための従来のウイルスに基づく系としては、遺伝子移入のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクチン、および単純ヘルペスウイルスのベクターが挙げられるが、これらに限定されない。宿主ゲノム内の組込みは、レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ関連ウイルスの遺伝子移入方法を用いて可能であり、多くの場合、挿入された導入遺伝子の長期発現をもたらす。さらに、高い形質導入効率が、多くの異なる細胞型および標的組織において観察されている。

20

#### 【0190】

レトロウイルスの向性は、外来のエンベロープタンパク質を組み入れることによって変更することができ、標的細胞の潜在的な標的集団を拡大させる。レンチウイルスペクターは、非分裂細胞を形質導入または感染させることができるレトロウイルスペクターであり、典型的には高ウイルス力価を生じる。レトロウイルス遺伝子移入系の選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスペクターは、最大6～10kbの外来配列に用いるパッケージング能力を有する、シス作用性の長い末端反復からなる。最小限のシス作用性LTRが、ベクターの複製およびパッケージングには十分であり、それらは、次いで、治療遺伝子を標的細胞内に組み込むために使用されて、導入遺伝子の永続的な発現を提供する。広く使用されているレトロウイルスペクターとしては、マウス白血病ウイルス（MuLV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、およびそれらの組合せに基づくものが挙げられる（例えば、Buchschelerら、J. Virol.、66巻：2731～2739頁（1992年）、Johannら、J. Virol.、66巻：1635～1640頁（1992年）、Sommerfeltら、Virol.、176巻：58～59頁（1990年）、Wilsonら、J. Virol.、63巻：2374～2378頁（1989年）、Millerら、J. Virol.、65巻：2220～2224頁（1991年）、PCT/US94/05700を参照されたい）。

30

40

#### 【0191】

一過性発現が好適な用途では、アデノウイルスに基づく系を使用することができる。アデノウイルスに基づくベクターは、多くの細胞型で非常に高い効率で形質移入が可能であり、細胞分裂を必要としない。そのようなベクターを用いて、高力価および高レベルの発現を得ている。このベクターは、比較的単純な系で大量に产生することができる。また、

50

アデノ関連ウイルス（「AAV」）ベクターを使用して、例えば、核酸およびペプチドの *in vitro* 産生において、ならびに *in vivo* および *ex vivo* の遺伝子治療の手順（例えば、Westら、*Virology*、160巻：38～47頁（1987年）、米国特許第4,797,368号、WO93/24641、Kotin、Human Gene Therapy、5巻：793～801頁（1994年）、Muzychuk、J. Clin. Invest. 94巻：1351頁（1994年）を参照されたい）に用いるために、細胞に標的核酸を形質導入することもできる。組換えAAVベクターの構築は、米国特許第5,173,414号、Tratschinskiら、Mol. Cell. Biol. 5巻：3251～3260頁（1985年）、Tratschinskiら、Mol. Cell. Biol. 4巻：2072～2081頁（1984年）、HermonatおよびMuzychuk、PNAS、81巻：6466～6470頁（1984年）、およびSamulskiら、J. Virol. 63巻：03822～3828頁（1989年）を含めた多数の刊行物に記載されている。  
10

#### 【0192】

少なくとも6つのウイルスベクターアプローチが、現在、臨床試験の遺伝子移入に利用可能であり、それらは、形質導入薬剤を生成するために、ヘルパー細胞株内に挿入された遺伝子による欠損ベクターの相補性を含むアプローチを利用する。

#### 【0193】

pLASNおよびMFG-Sは、臨床試験で使用されているレトロウイルスベクターの例である（Dunbarら、Blood、85巻：3048～305頁（1995年）、Kohnら、Nat. Med. 1巻：1017～102頁（1995年）、Malekら、PNAS、94巻：22号、12133～12138頁（1997年））。PA317/pLASNは、遺伝子治療試験で使用された最初の治療ベクターであった。（Blaeseら、Science、270巻：475～480頁（1995年））。MFG-Sでパッケージされたベクターについて、50%またはそれ超の形質導入効率が観察されている。（Ellemら、Immunol Immunother. 44巻（1号）：10～20頁（1997年）、Dranoffら、Hum. Gene Ther. 1巻：111～2頁（1997年）。）  
20

#### 【0194】

組換えアデノ関連ウイルスベクター（rAAV）は、欠損型および非病原性のバルボウイルスアデノ関連2型ウイルスに基づく有望な代替の遺伝子送達システムである。全てのベクターは、導入遺伝子発現力セットに隣接するAAV145塩基対（bp）の逆方向末端反復のみを保持するプラスミドに由来する。形質導入された細胞のゲノム内への組込みに起因する効率的な遺伝子移入および安定な導入遺伝子送達は、このベクター系の鍵となる特長である（Wagnerら、Lancet 351巻：9117号 1702～3頁（1998年）、Kearnsら、Gene Ther. 9巻：748～55頁（1996年））。AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9およびAAVrh10、ならびにそれらの全てのバリエントを含めた他のAAV血清型も、本発明に従って使用することができる。  
30

#### 【0195】

複製欠損性組換えアデノウイルスベクター（Ad）は、高力価で産生することができ、多数の異なる細胞型を容易に感染させる。アデノウイルスベクターのほとんどは、導入遺伝子がAdE1a、E1b、および/またはE3遺伝子を置き換えて、その後、複製欠損性ベクターが、欠失した遺伝子機能をトランスに供給するヒト293細胞で増殖するよう、遺伝子操作される。Adベクターは、肝臓、腎臓、および筋肉で見出されるものなど非分裂性の分化細胞を含む、複数の種類の組織を*in vivo*で形質導入することができる。従来のAdベクターは、大きな保有能力を有する。臨床試験でAdベクターを使用する例では、筋肉内注入を用いた抗腫瘍免疫化のポリヌクレオチド治療が含められた（Stermannら、Hum. Gene Ther. 7巻：1083～9頁（1998年））。臨床試験における遺伝子移入に用いるアデノウイルスベクターの使用の追加的な例と  
40

しては、Rosenackerら、Infection、24巻：1号、5～10頁（1996年）、Stermanら、Hum. Gene Ther.、9巻：7号、1083～1089頁（1998年）、Welshら、Hum. Gene Ther.、2巻：205～18頁（1995年）、Alvarezら、Hum. Gene Ther.、5巻：597～613頁（1997年）、Topfら、Gene Ther.、5巻：507～513頁（1998年）、Stermanら、Hum. Gene Ther.、7巻：1083～1089頁（1998年）が挙げられる。

## 【0196】

パッケージング細胞を使用して、宿主細胞を感染させることが可能なウイルス粒子を形成する。そのような細胞としては、アデノウイルスをパッケージングする293細胞、およびレトロウイルスをパッケージングする2細胞またはPA317が含まれる。遺伝子治療で使用されるウイルスベクターは、通常、ウイルス粒子内に核酸ベクターをパッケージングする生産細胞株によって生成される。これらのベクターは、典型的に、パッケージングおよびその後の宿主への組込みに必要とされる最小限のウイルス配列（適用可能な場合）、発現させるタンパク質をコードする発現カセットによって置き換えられている他のウイルス配列を含有する。欠けているウイルス機能は、パッケージング細胞株によってトランスに供給される。例えば、遺伝子治療に使用するAAVベクターは、典型的には、宿主ゲノム内へのパッケージングおよび組込みに必要とされるAAVゲノム由来の逆方向末端反復（ITR）配列のみを具える。ウイルスDNAは、細胞株中にパッケージングされ、他のAAV遺伝子即ち、repおよびcapをコードするもののITR配列を欠失したヘルパープラスミドを含有する。細胞株はまた、ヘルパーとしてアデノウイルスに感染する。ヘルパーウィルスは、AAVベクターの複製、およびヘルパープラスミド由来のAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ITR配列を欠失しているため、有意な量にはパッケージングされない。アデノウイルスによる夾雜は、例えば、AAVよりも感受性があるアデノウイルスに対する熱処理によって低減することができる。

## 【0197】

多くの遺伝子治療用途では、遺伝子治療ベクターが、高度な特異性で特定の細胞型に送達されることが望ましい。したがって、ウイルスの外表面上でウイルス外被タンパク質との融合タンパク質としてリガンドを発現することによって、ウイルスベクターを所与の細胞型に対する特異性を有するように修飾することができる。リガンドは、目的の細胞型上に存在することが公知の受容体に対する親和性を有するように選ばれる。例えば、Hanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92巻：9747～9751頁（1995年）は、モロニーマウス白血病ウイルスを修飾して、gp70に融合されたヒトヘレグリンを発現することができ、その組換えウイルスが、ヒト上皮成長因子受容体を発現しているある特定のヒト乳がん細胞を感染させることを報告した。この原理は、標的細胞が受容体を発現し、細胞表面受容体に対するリガンドを含む融合タンパク質をウイルスが発現する、他のウイルス・標的細胞の対にまで及び得るものである。例えば、線状ファージを遺伝子操作して、事実上いかなる選ばれた細胞受容体にも特異的な結合親和性を有する抗体断片（例えば、FABまたはFv）を提示することができる。上記の記載は、主にウイルスベクターに適用されるが、同じ原理を非ウイルスベクターに適用することができる。そのようなベクターを遺伝子操作して、特異的な標的細胞による取り込みに好都合な特異的な取り込み配列を含有させることができる。

## 【0198】

遺伝子治療ベクターは、下記に説明するように、個々の対象への投与によって、典型的には、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下もしくは頭蓋内注入）または局所適用によって、in vivoで送達することができる。あるいは、個々の患者から移植された細胞（例えば、リンパ球、骨髄穿刺液、組織生検）や万能ドナーの造血幹細胞などの細胞に、ベクターをex vivoで送達し、続いて、通常はベクターを組み入れた細胞を選択した後に、患者への細胞の再移植を行うことができる。

## 【0199】

10

20

30

40

50

また、ヌクレアーゼおよび／またはドナー構築物を含有するベクター（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、リポソーム等）を、*in vivo*での細胞の形質導入のために、生物に直接投与することもできる。あるいは、ネイキッドDNAを投与することができる。投与は、血液または組織の細胞との最終的な接触の内に分子を導入するために通常使用される経路のいずれかに依り、そのような経路としては、注射、注入、局所適用、およびエレクトロポレーションが挙げられるが、これらに限定されない。そのような核酸を投与する適当な方法は、利用可能であり、当業者に周知であり、そして、1つよりも多い経路を使用して特定の組成物を投与することができるが、多くの場合、特定の経路は、別の経路よりも速やかかつ有効な反応を提供することができる。

## 【0200】

10

本明細書に記載されているポリヌクレオチドの導入に適したベクターとしては、非組み込み型レンチウイルスベクター（IDLV）が挙げられる。例えば、Oryら（1996年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻：11382～11388頁、Dullら（1998年）、J. Virol.、72巻：8463～8471頁、Zufferyら（1998年）、J. Virol.、72巻：9873～9880頁、Follenziら（2000年）、Nature Genetics、25巻：217～222頁、米国特許出願公開第2009/054985号を参照されたい。

## 【0201】

20

薬学的に許容される担体は、投与されている特定の組成物によって、ならびに組成物を投与するために使用される特定の方法によって、ある程度は決定される。したがって、下記に記載するように、利用可能な医薬組成物の実に様々な適当な製剤が存在する（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第17版、1989年を参照されたい）。

## 【0202】

30

ヌクレアーゼをコードする配列とドナー構築物とを、同じまたは異なる系を使用して送達することができることが明らかである。例えば、ドナーポリヌクレオチドをベクターによって保有することができ、一方、1種または複数のヌクレアーゼをAAVベクターによって保有することができる。さらに、これらの異なるベクターを、同じまたは異なる経路（筋肉内注射、尾静脈注射、他の静脈内注射、腹腔内注射および／または筋肉内注射）によって投与することができる。これらのベクターを、同時にまたは任意の順番で、送達することができる。

## 【0203】

*ex vivo*と*in vivo*との両方の投与に用いる製剤としては、液体中懸濁液物または乳濁液が挙げられる。多くの場合、活性成分は、薬学的に許容され、かつ活性成分に適合する賦形剤と混合される。適当な賦形剤としては、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどおよびそれらの組合せが挙げられる。さらに、組成物は、湿潤剤もしくは乳濁剤、pH緩衝剤、安定化剤または医薬組成物の効果を高める他の試薬などの微量の補助的な物質を含有していてもよい。

植物の送達

## 【0204】

40

上述したように、DNAおよび／またはRNAを、種々の従来の技法によって、所望の植物宿主（例えば、そのゲノム）内に導入することができる。そのような技法の総説については、例えば、Weissbach & Weissbach Methods for Plant Molecular Biology（1988年、Academic Press、N.Y.）、第8節、421～463頁およびGrierson & Corey, Plant Molecular Biology（1988年、第2版）、Blackie、ロンドン、第7～9章を参照されたい。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20090205083号、第2010/0199389号、第20110167521号および第20110189775号も参照されたい。

50

## 【0205】

例えば、ポリヌクレオチドを、植物プロトプラストのエレクトロポレーションやマイクロインジェクションなどの技法を使用して、植物細胞のゲノムDNAへ直接的に導入することができ、または、ポリヌクレオチドを、DNA粒子衝撃などの遺伝子銃法を使用して、植物組織に直接的に導入することができる（例えば、Kleinら（1987年）、Nature、327巻：70～73頁を参照されたい）。あるいは、ポリヌクレオチド（複数可）を、ナノ粒子形質転換を介して植物細胞内へ導入することができる（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20090104700号を参照されたい）。あるいは、DNA/RNA構築物を、適当なT-DNA境界/隣接領域と組み合わせて、従来のAgrobacterium tumefaciens宿主ベクターへ導入することができる。Agrobacterium tumefaciens媒介性トランسفェクション技法は、癌遺伝子の無害化ならびにバイナリーベクターの開発および使用を含めて、科学文献に詳しく記載されている。例えば、Horschら（1984年）、Science、233巻：496～498頁およびFraleyら（1983年）、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、80巻：4803頁を参照されたい。10

## 【0206】

また、遺伝子移入を、Rhizobium sp. NGR234、Sinorhizobium meliloti、Mesorhizobium loti、ジャガイモXウイルス、カリフラワー・モザイクウイルスおよびキャッサバ葉脈モザイクウイルスならびに／またはタバコモザイクウイルスなどの非アグロバクテリウム細菌またはウイルスを使用して達成することができる。例えば、Chungら（2006年）、Trends Plant Sci.、11巻（1号）：1～4頁を参照されたい。20

## 【0207】

Agrobacterium tumefaciens宿主の病原性機能は、バイナリ-T-DNAベクター（Bevan（1984年）、Nuc. Acid Res.、12巻：8711～8721頁）または共培養手法（Horschら（1985年）、Science、227巻：1229～1231頁）を使用して細胞を細菌に感染させる際に、構築物および隣接マーカーを含有するT鎖が植物細胞のDNAに挿入されるように誘導する。一般に、アグロバクテリウム形質転換系は、双子葉植物を遺伝子操作するために使用される（Bevanら（1982年）、Ann. Rev. Genet.、16巻：357～384頁、Rogersら（1986年）、Methods Enzymol.、118巻：627～641頁）。アグロバクテリウム形質転換系はまた、ポリヌクレオチドを単子葉植物および植物細胞に形質転換および移入するために使用することができる。米国特許第5,591,616号、Hernalsteenら（1984年）、EMBOJ3巻：3039～3041頁、Hooykass-Van Slooterenら（1984年）、Nature、311巻：763～764頁、Grimsleyら（1987年）、Nature、325巻：1677～179頁、Boultonら（1989年）、Plant Mol. Biol.、12巻：31～40頁およびGouldら（1991年）、Plant Physiol.、95巻：426～434頁を参照されたい。30

## 【0208】

代替的な遺伝子移入および形質転換の方法としては、ネイキッドDNA/RNAのカルシウム媒介性、ポリエチレングリコール（PEG）媒介性またはエレクトロポレーション媒介性の取り込みを介したプロトプラストの形質転換（Paszkowskiら（1984年）、EMBOJ3巻：2717～2722頁、Potrykusら（1985年）、Mol. Gen. Genet.、199巻：169～177頁、Frommら（1985年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻：5824～5828頁およびShimamoto（1989年）、Nature、338巻：274～276頁を参照のこと）、および植物組織のエレクトロポレーション（D' Hall

10

20

30

40

50

l u i n ら ( 1 9 9 2 年 ) 、 P l a n t C e l l 、 4 卷 : 1 4 9 5 ~ 1 5 0 5 頁 ) が挙げられるが、これらに限定されない。植物細胞の形質転換に用いる追加的な方法としては、マイクロインジェクション、炭化ケイ素(例えば、WHISKERS(商標))媒介性DNA取り込み(Kaepplerら(1990年)、Plant Cell Reporter、9卷:415~418頁)および微粒子銃(Kleinら(1988年)、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、85卷:4305~4309頁およびGordon-Kammら(1990年)、Plant Cell、2卷:603~618頁を参照されたい)が挙げられる。

## 【0209】

上記の任意の形質転換技法によって作製された形質転換植物細胞を培養して、形質転換された遺伝子型と、それゆえ所望の表現型とを具えている全植物体を再生することができる。そのような再生技法は、組織培養増殖培地中のある特定の植物ホルモンを操作することに依り、典型的には、所望のヌクレオチド配列と共に導入されている殺生物剤マーカーおよび/または除草剤マーカーに依る。培養プロトプラストからの植物の再生は、Evansら、「Protoplasts Isolation and Culture」、Handbook of Plant Cell Culture、124~176頁、Macmillian Publishing Company、ニューヨーク、1983年、およびBinding、Regeneration of Plants、Plant Protoplasts、21~73頁、CRC Press、Boca Raton、1985年に記載されている。また、再生を、植物のカルス、外植片、器官、花粉、胚またはそれらの一部から得ることもできる。そのような再生技術は、Kleeeら(1987年)、Ann. Rev. of Plant Phys.、38卷:467~486頁に概ね記載されている。

## 【0210】

植物細胞内へ導入される核酸は、本質的に任意の植物に、所望の形質を付与するために使用することができる。実に様々な植物および植物細胞系を、本開示の核酸構築物および上述の様々な形質転換方法を使用して、本明細書に記載されている所望の生理学的および農学的特徴のために遺伝子操作することができる。好適な実施形態では、遺伝子操作のための標的植物および植物細胞としては、穀物作物(例えば、コムギ、トウモロコシ、イネ、アワ、オオムギ)、果実作物(例えば、トマト、リンゴ、ナシ、イチゴ、オレンジ)、飼料作物(例えば、アルファルファ)、根菜作物(例えば、ニンジン、ジャガイモ、サトウダイコン、ヤムイモ)、葉菜作物(例えば、レタス、ホウレンソウ)を含む作物；顕花植物(例えば、ペチュニア、バラ、キク)、針葉樹およびマツ(例えば、マツ、モミ、トウヒ)；ファイトレメディエーションで使用される植物(例えば、重金属蓄積植物)；油料作物(例えば、ヒマワリ、ナタネ)や実験目的のために使用される植物(例えば、アラビドプシス)などの、单子葉植物および双子葉植物が挙げられるが、これらに限定されない。そのため、開示されている方法および組成物は、以下に限定されないが、アスパラガス属(*Asparagus*)、カラスマギ属(*Avena*)、アブラナ属(*Brassicaceae*)、ミカン属(*Citrus*)、スイカ属(*Citrullus*)、トウガラシ属(*Capsicum*)、カボチャ属(*Cucurbita*)、ニンジン属(*Daucus*)、ムカシヨモギ属(*Erigeron*)、ダイズ属(*Glycine*)、ワタ属(*Gossypium*)、オオムギ属(*Hordeum*)、アキノノゲシ属(*Lactuca*)、ドクムギ属(*Lolium*)、トマト属(*Lycopersicon*)、リンゴ属(*Malus*)、キャッサバ属(*Manihot*)、タバコ属(*Nicotiana*)、オオアラセイトウ属(*Orychophragmus*)、イネ属(*Oryza*)、ワニナシ属(*Persea*)、インゲンマメ属(*Phaseolus*)、エンドウ属(*Pisum*)、ナシ属(*Pyrus*)、サクラ属(*Prunus*)、ダイコン属(*Raphanus*)、ライムギ属(*Secale*)、ナス属(*Solanum*)、モロコシ属(*Sorghum*)、コムギ属(*Triticum*)、ブドウ属(*Vitis*)、ササゲ属(*Vigna*)およびトウモロコシ属(*Zea*)に由来する種(これらに限定されない)を含めて、広範

10

20

30

40

50

な植物にわたって使用されている。

【0211】

植物細胞へ導入された核酸の導入を、本質的に任意の植物に所望の形質を付与するため 10  
に使用することができる。ある特定の実施形態では、植物細胞中の変更された M D H 発現 / 機能は、果実の収量の増加、植物（またはその植物の果実）のバイオマスの増加、より高い果肉含量、着果の集中、より大きな植物体、新鮮重の増加、乾燥重の増加、固体肉質の増加、より高い収穫時総重量、作物の色合いの強度および / または均一性の向上、化学物質（例えば、油、脂肪酸、炭水化物、タンパク質）の特性の変更などを有する植物をもたらす。

【0212】

当業者は、外因性の配列を植物細胞内へ一過的に組み入れることを認識することになる。外因性ポリヌクレオチド配列の導入は、当該配列が導入されている植物細胞の細胞機構を利用することができる。植物細胞内へ一過的に組み入れられた Z F N を含む外因性のポリヌクレオチド配列の発現は、標的配列のゲノム D N A を解析することによってアッセイされて、任意のインデル、逆位または挿入を同定し決定することができる。これらの再編成の種類は、ゲノム D N A 配列内の標的部位の切断、およびそれに続く D N A 修復に起因する。さらに、当業者に公知のマークー遺伝子発現の試験を可能にする方法を使用して、外因性ポリヌクレオチド配列の発現をアッセイすることができる。種々の植物、組織および D N A 送達系を使用したマークー遺伝子の一過的発現が、報告されている。一過的解析系としては、目的の任意の植物種を使用した任意の一過的な植物アッセイに際しての、エレクトロポレーションまたは組織の粒子衝撃を介した直接的な遺伝子送達が挙げられるが、これらに限定されない。そのような一過的な系としては、種々の組織源由來のプロトプラストのエレクトロポレーション、または目的の特異的な組織の粒子衝撃が挙げられるが、これらに限定されない。本開示は、部位特異的なエンドヌクレアーゼ（例えば、Z F N ）を評価するための、および M D H 標的遺伝子内に変異を導入するための、任意の一過的発現系の使用を包含する。適切な送達系を介した一過的発現体を試験することが想定される植物組織の例としては、葉脚組織、カルス、子葉、根、内胚乳、胚、花組織、花粉および表皮組織が挙げられるが、これらに限定されない。

【0213】

当業者は、外因性ポリヌクレオチド配列を形質転換植物に安定に組み入れることができるということを認識する。外因性ポリヌクレオチド配列は、作動可能であることが確認されると、雌雄間交配によって他の植物体へ導入することができる。交配させる種に応じて、多くの任意の標準的な育種技法を使用することができる。

【0214】

形質転換した植物細胞、カルス、組織または植物体は、形質転換している D N A 上に存在するマークー遺伝子によってコードされている形質について、遺伝子操作された植物材料を選択またはスクリーニングすることによって、同定または単離されてもよい。例えば、形質転換している遺伝子構築物が抵抗性を付与する、阻害量の抗生物質または除草剤を含有する培地上に、遺伝子操作した植物材料を増殖させることによって、選択を行うことができる。さらに、形質転換された植物体または植物細胞は、組換え核酸構築物上に存在し得る任意の可視マークー遺伝子（例えば、 - グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、B または C 1 遺伝子）の活性をスクリーニングすることによって、同定することもできる。そのような選択またはスクリーニングの方法論は、当業者に周知である。

【0215】

また、物理学的または生化学的方法を、安定に挿入された遺伝子構築物を含有する植物体もしくは植物細胞の形質転換体、または部位特異的なエンドヌクレアーゼ（例えば、Z F N ）の一過的発現によって生じる標的遺伝子を変更したゲノム D N A を含有する植物細胞を同定するために、使用することができる。これらの方法としては、1) 組換え D N A 挿入物の構造を検出して決定するためのサザン解析または P C R 増幅、2) 遺伝子構築物の R N A 転写物を検出して調べるためのノーザンプロット、S 1 R N a s e 保護、プ

10

20

30

40

50

ライマー伸長または逆転写酵素 - P C R 増幅、3) 酵素またはリボザイム活性を検出するための、当該遺伝子産物が遺伝子構築物によってコードされている酵素アッセイ、4) 遺伝子構築物の産物がタンパク質である、タンパク質ゲル電気泳動、ウェスタンプロット技法、免疫沈降または酵素結合免疫アッセイ( E L I S A )が挙げられるが、これらに限定されない。in situハイブリダイゼーション、酵素染色や免疫染色などの追加的な技法もまた、特異的な植物器官および組織での組換え構築物の存在または発現を検出するために、使用することができる。全てのこれらのアッセイを行うための方法は、当業者に周知である。

#### 【 0 2 1 6 】

本明細書に開示されている方法を使用した遺伝子操作の効果は、例えば、目的の組織から単離されたRNA( 例えは、mRNA )のノーザンプロットによって、観察することができる。典型的には、mRNAが存在するか、またはmRNA量が増える場合に、対応の導入遺伝子が発現していることが推察され得る。遺伝子および/またはコードされたポリペプチドの活性を測定する他の方法を使用することができる。使用された基質に応じて、および、反応産物または副産物の増加または減少を検出する方法に応じて、異なる種類の酵素アッセイを使用することができる。発現されているポリペプチドのレベルを、免疫化学的に、例えは、E L I S A 、R I A 、E I A 、および電気泳動検出アッセイによる( または染色もしくはウェスタンプロッティングを用いてのどちらか )などの抗体に基づく当業者に周知の他のアッセイなどで測定することもできる。非限定的な一例として、E L I S A アッセイを使用したAAD-1およびPATタンパク質の検出が、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20090093366に記載されている。導入遺伝子は、植物の一部の組織中でもしくは一部の生育ステージで選択的に発現するか、または、導入遺伝子は、実質的に全ての植物組織中で、実質的に全ての生活サイクルに合わせて、発現する場合がある。しかし、任意の組合せの発現様式もまた利用可能である。

10

20

30

40

#### 【 0 2 1 7 】

本願の開示は、先に記載されている形質転換植物の種子をも包含し、ここで、種子は導入遺伝子または遺伝子構築物を有する。本開示は、さらに、先に記載されている形質転換植物の子孫、クローン、細胞株または細胞を包含し、ここでは、前記子孫、クローン、細胞株または細胞は、導入遺伝子または遺伝子構築物を有する。

#### 【 0 2 1 8 】

融合タンパク質( 例えは、ZFN )および融合タンパク質をコードする発現ベクターは、遺伝子調節、標的化された切断および/または組換えに用いる植物に、直接的に投与することができる。ある特定の実施形態では、植物は、複数のパラロガスなMDH標的遺伝子を含有する。そのため、植物中のこれらの1種または複数のパラロガスな遺伝子を標的化するために、1種または複数の異なる融合タンパク質または融合タンパク質をコードする発現ベクターを、植物に投与することができる。

#### 【 0 2 1 9 】

有効量の投与は、処理する植物細胞に最大に接触させるよう融合タンパク質を導入するために通常使用される任意の経路に依る。ZFPは、任意の適当な方式で、好ましくは許容可能な担体を用いて投与される。そのようなモジュレーターを投与する適当な方法は利用可能であり、当業者に周知であり、そして、特定の組成物を投与するために、1種よりも多い経路を利用することができるものの、多くの場合、特定の経路は、別の経路よりも速やかかつ有効な反応を提供する。

#### 【 0 2 2 0 】

また、担体が使用されてもよく、投与されている特定の組成物によって、および組成物を投与するために使用する特定の方法によって、ある程度は決定される。したがって、利用可能な担体の実に様々な適当な製剤が存在する。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 2 2 1 】

50

## (実施例 1) : s g R N A の設計

所与の Z F N に指定された遺伝子座のゲノム編集の際に使用するためのガイド R N A ( s g R N A または g R N A ) の配列は、( i ) Z F N ヘテロ二量体の認識配列を、関連ゲノム (ヒト、マウスまたは特定の植物種) の参照配列とアライメントし、( i i ) Z F N - ハーフ部位間のスペーサー領域を同定し、( i i i ) スペーサー領域に最も近いモチーフ G [ N 2 0 ] G G の位置を同定し (1つよりも多いそのようなモチーフがスペーサーと重複する場合、このスペーサーに対して中心にあるモチーフが選択された) 、( i v ) g R N A のコアとしてそのモチーフを使用することによって同定された。表 1 は、C R I S P R / C a s 系を用いて使用するための一連の s g R N A を示す。目的の細胞を、表 1 の s g R N A と接触させて遺伝子操作する。

## 【表1 - 1】

表1 ZFN標的遺伝子の標的化のために設計されたsgRNA

標的 遺伝子	ZFNに用いる標的配列	配列 番号	sgRNAをコードする配列	配列 番号
ヒトβ グロビン	GGGCAGTAACGGCAGACTTCTCCTCAGG	1	GTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGG	149
"	TGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTG	2	GTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGG	149
"	AGAGTCAGGTGACCATGGTGTCTGTTT	3	GTAACGGCAGACTTCACCTCAGG	150
"	GTGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGT	4	GTAACGGCAGACTTCACCTCAGG	150
"	ACAGGAGTCAGGTGACCATGGTGTCTG	5	GTAACGGCAGACTTCACCTCAGG	150
"	GAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGG	6	GTAACGGCAGACTTCACCTCAGG	150
"	TAACGGCAGACTTCTCCACAGGAGTCAG	7	GTAACGGCAGACTTCACCTCAGG	150
"	GCCTGTGGGCAAGGTGAACGTGGATG	8	GTAACGGCAGACTTCACCTCAGG	150
"	GGGCAGTAACGGCAGACTTCTCCTCAGG	1	GTAACGGCAGACTTCACCTCAGG	150
"	TGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTG	2	GTAACGGCAGACTTCACCTCAGG	150
"	CACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCCT	9	GTAACGGCAGACTTCACCTCAGG	150
"	GGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGT	10	GTAACGGCAGACTTCACCTCAGG	150
ヒト BCL11A	ATCCCATGGAGAGGTGGCTGGGAAGGAC	11	GCAATATGAATCCCATGGAGAGG	151
"	ATATTGCAGACAATAACCCCTTAACCT	12	GCAATATGAATCCCATGGAGAGG	151
"	CATCCCAGGCGTGGGGATTAGAGCTCCA	13	GCATATTCTGCACACTCATCCCAGG	152
"	GTGCAGAAATGCCCCGAGGGTATTTG	14	GCATATTCTGCACACTCATCCCAGG	152
ヒトKLF1	GGGAAGGGGCCAGGGCGTCAGTGTGC	15	GGGCCCTTCCGGACACACAGG	153
"	ACACACAGGTGACTTCCTCAAGGTGGG	16	GGGCCCTTCCGGACACACAGG	153
"	CGCCACCGGGCTCCGGGCCCAGAAC	17	GCAGGTCTGGGGCGCGCCACCGG	154
"	CCCCAGACCTGCGCTCTGGCGCCCAGCG	18	GCAGGTCTGGGGCGCGCCACCGG	154
"	GGCTGGGGGCCGGGCTGGAGCCAGGG	19	GGCCCCCGAGCCCAAGGCCTGG	155
"	AAGGCCTGGCGCTGCAACCGGTGTACC	20	GGCCCCCGAGCCCAAGGCCTGG	155
"	TTGCAGCGCCAGCGCCTGGCTGGG	21	GCGCTGCAACCCTGTGTACCCGGG	156
"	CGGTGTACCCGGGCCGGCGCCGGCTC	22	GCGCTGCAACCCTGTGTACCCGGG	156
ヒト γ調節	TTGCATTGAGATAGTGTGGGAAGGGC	23	GCATTGAGATAGTGTGGGAAGG	157
"	ATCTGTCTGAAACGGTCCCTGGCTAAC	24	GCATTGAGATAGTGTGGGAAGG	157
"	TTTGATTGAGATAGTGTGGGAAGGGG	25	GCATTGAGATAGTGTGGGAAGG	157
"	CTGTCTGAAACGGTCCCTGGCTAAC	26	GCATTGAGATAGTGTGGGAAGG	157
"	TATTGATTGAGATAGTGTGGGAAGG	27	GCATTGAGATAGTGTGGGAAGG	157
"	CTGTCTGAAACGGTCCCTGGCTAAC	26	GCATTGAGATAGTGTGGGAAGG	157
	CTTGACAAGGCAAC	28	GCTATTGGTCAAGGCAAGGCTGG	158
	GTCAAGGCAAGGCTG	29	GCTATTGGTCAAGGCAAGGCTGG	158
ヒト CCR5	GATGAGGATGAC	30	GTGTCATCTTGGTTGTGGG	159
"	GATGAGGATGAC	30	GTGTCATCTTGGTTGTGGG	159
"	GATGAGGATGAC	30	GTGTCATCTTGGTTGTGGG	159
"	GATGAGGATGAC	30	GTGTCATCTTGGTTGTGGG	159
"	GATGAGGATGAC	30	GTGTCATCTTGGTTGTGGG	159
"	GATGAGGATGAC	30	GTGTCATCTTGGTTGTGGG	159
"	AAACTGAAAAG	31	GTGTCATCTTGGTTGTGGG	159
"	AAACTGAAAAG	31	GTGTCATCTTGGTTGTGGG	159
"	AAACTGAAAAG	31	GTGTCATCTTGGTTGTGGG	159
"	AAACTGAAAAG	31	GTGTCATCTTGGTTGTGGG	159

10

20

30

40

【表1-2】

"	AAACTGAAAAG	31	GTGTCATCTTGGTTTG	159
"	AAACTGAAAAG	31	GTGTCATCTTGGTTTG	159
"	AAACTGAAAAG	31	GTGTCATCTTGGTTTG	159
"	GACAAGCAGCG	32	GGTCCTGCCGCTGCTG	160
"	CATCTGCTACTCG	33	GGTCCTGCCGCTGCTG	160
ヒト CXCR4	ATGACTTGTGGGTGGTGTTCAGTT	34	GCTTCTACCCCAATGACTTGTGG	161
"	GGGTAGAAGCGGTACAGATATATCTGT	35	GCTTCTACCCCAATGACTTGTGG	161
"	AGTCAGAGGCCAAGGAAGCTGTTGGCTG	36	GCCTCTGACTGTTGGTGGCGTGG	162
"	TTGGTGGCGTGGACGATGCCAGGTAGC	37	GCCTCTGACTGTTGGTGGCGTGG	162
"	CAGTTGATGCCGTGGCAAACGGTACTT	38	GCCGTGGCAAACGGTACTTGG	163
"	CCAGAAGGGAAAGCGTGTGACAAAGAGG	39	GCCGTGGCAAACGGTACTTGG	163
PPP1R 12C	ACTAGGGACAGGATTG	40	GGGGCCACTAGGGACAGGATTGG	164
"	CCCCACTGTGGGTGG	41	GGGGCCACTAGGGACAGGATTGG	164
PPP1R 12C	ACTAGGGACAGGATTG	40	GTCACCAATCCTGTCCTAGTGG	165
"	CCCCACTGTGGGTGG	41	GTCACCAATCCTGTCCTAGTGG	165
PPP1R 12C	ACTAGGGACAGGATTG	40	GTGGCCCCACTGTGGGTGGAGG	166
"	CCCCACTGTGGGTGG	41	GTGGCCCCACTGTGGGTGGAGG	166
マウス および ヒト HPRT	ACCCGCAGTCCCAGCGTCGTGGTGAGCC	42	GTCGGCATGACGGGACCGGTCGG	167
"	GCATGACGGGACCGGTCGGCTCGCGCA	43	GTCGGCATGACGGGACCGGTCGG	167
"	TGATGAAGGAGATGGAGGCCATCACAT	44	GATGTGATGAAGGAGATGGGAGG	168
"	ATCTCGAGCAAGACGTTCACTACAG	45	GATGTGATGAAGGAGATGGGAGG	168
"	AAGCACTGAATAGAAATAGTGTAGATC	46	GTGTTGATGTAATCCAGCAGG	169
"	ATGTAATCCAGCAGGTCAAGAAAGAATT	47	GTGTTGATGTAATCCAGCAGG	169
"	GGCCGGCGCGCGGGCTGACTGCTCAGGA	48	GTCGCCATAACGGAGCCGGCCGG	170
"	GCTCGTTATGGCGACCCGAGCCCTGG	49	GTCGCCATAACGGAGCCGGCCGG	170
"	TGCAAAAGGTAGGAAAAGGACCAACCAG	50	GTATTGCAAAGGTAGGAAAAGG	171
"	ACCCAGATACAAACAATGGATAGAAAAC	51	GTATTGCAAAGGTAGGAAAAGG	171
"	CTGGGATGAACTTGGCAGAATTACA	52	GCATATCTGGGATGAACTCTGG	172
"	ATGCAGTCAAGAACATACAGACAGTCAG	53	GCATATCTGGGATGAACTCTGG	172
"	TGACAGGGCTGAAGTTGCCCACAGG	54	GCCTCTGGCATGTGCACAGGG	173
"	TGGCCAGGAGGCTGGTTGCAAACATT	55	GCCTCTGGCATGTGCACAGGG	173
"	TTGAATGTGATTTGAAAGGTAAATTAGT	56	GAAGCTGATGATTAAGCTTGG	174
"	AAGCTGATGATTTAACGCTTGGCGTT	57	GAAGCTGATGATTTAACGCTTGG	174
"	GTGGGGTAATTGATCCATGTATGCCATT	58	GATCAATTACCCACCTGGGTGG	175
"	GGGTGGCCAAGGAAGCTGCGCGAACCTC	59	GATCAATTACCCACCTGGGTGG	175
"	ATCAACTGGAGTTGACTGTAATACCAG	60	GATGTTTACAGAGACAAGAGG	176
"	CTTACAGAGACAAGAGGAATAAGGAA	61	GATGTTTACAGAGACAAGAGG	176
ヒト アルブ ミン	CCTATCCATTGCACTATGCTTATTAA	62	GATCACAGCACAGGTTTG	177
"	CCTATCCATTGCACTATGCTTATTAA	62	GATCACAGCACAGGTTTG	177
"	CCTATCCATTGCACTATGCTTATTAA	62	GATCACAGCACAGGTTTG	177
"	CCTATCCATTGCACTATGCTTATTAA	62	GATCACAGCACAGGTTTG	177
"	CCTATCCATTGCACTATGCTTATTAA	62	GATCACAGCACAGGTTTG	177
"	TTTGGGATAGTTGAAATTCAATCTCA	63	GATCACAGCACAGGTTTG	177
"	TTTGGGATAGTTGAAATTCAATCTCA	63	GATCACAGCACAGGTTTG	177
"	TTTGGGATAGTTGAAATTCAATCTCA	63	GATCACAGCACAGGTTTG	177
"	CCTGTGCTGTTGATCTATAAGAAC	64	GATCACAGCACAGGTTTG	177

10

20

30

40

【表1-3】

"	CCTGTGCTGTTGATCTCATAAATAGAAC	64	GATCAACAGCACAGGTTTG	177
"	TTGTGGTTTAAATAAAGCATAGTGC	65	GATCAACAGCACAGGTTTG	177
"	TTGTGGTTTAAATAAAGCATAGTGC	65	GATCAACAGCACAGGTTTG	177
"	ACCAAGAAGACAGACTAAAATGAAAATA	66	GATCAACAGCACAGGTTTG	177
"	CTGTTGATAGACACTAAAAGAGTATTAG	67	GATCAACAGCACAGGTTTG	177
ヒト 第IX 因子	TGACACAGTACCTGGCACCATAGTTGA	68	GTCAGGGTACTAGGGGTATGGGG	178
"	GTACTAGGGTATGGGGATAAACCAGAC	69	GTCAGGGTACTAGGGGTATGGGG	178
ヒト LRRK2	GCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTC	70	GTCAGCAATCTTGCATGATGG	179
"	TGATGGCAGCATTGGGATACAGTGTGAA	71	GTCAGCAATCTTGCATGATGG	179
"	GCAAAGATTGCTGACTACAGCATTGCTC	72	GTCAGCAATCTTGCATGATGG	179
ヒト Htt	GGGGCGATGCTGGGGACGGGGACATTAG	73	?	
"	ACGCTGCGCCGGCGAGGGGGGCCGCG	74	GTCTGGGACGCAAGGCGCCGTG	180
"	AAGGCGCCGTGGGGCTGCCGGACGGG	75	GTCTGGGACGCAAGGCGCCGTG	180
"	AGTCCCCGGAGGCCTCGGGCCGACTCGC	76	GGAGGCCTCGGGCCGACTCGCGG	181
"	GCGCTCAGCAGGTGGTACCTTGAC	77	GCCGGTATATGGGCTTCTGGG	182
"	ATGGTGGAGAGACTGTGAGGCAGCAGC	78	GAGACTGTGAGGCAGCTGGG	183
"	ATGGCGCTCAGCAGGTGGTACCTTG	79	GAGACTGTGAGGCAGCTGGG	183
"	TGGGAGAGACTGTGAGGCAGCTGGG	80	GAGACTGTGAGGCAGCTGGG	183
ヒト RHO	GCCAGGTAGTACTGTGGTACTCGAAGG	81	GGCTCAGCCAGGTAGTACTGTG	184
"	GAGCCATGGCAGTTCTCATGCTGGCCG	82	GGCTCAGCCAGGTAGTACTGTG	184
"	CAGTGGGTTCTGCCGCAGCAGATGGT	83	GAACCCACTGGGTGACGATGAGG	185
"	GTGACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGT	84	GAACCCACTGGGTGACGATGAGG	185
"	GGGGAGACAGGGCAAGGCTGGCAGAGAG	85	GCCCTGTCTCCCCATGTCCAGG	186
"	ATGTCCAGGCTGCTGCCTGGTCCATT	86	GCCCTGTCTCCCCATGTCCAGG	186
CFTR	ATTAGAAGTGAATCTGAAATAAAACC	87	GGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGG	187
"	AGTGATTATGGGAGAACTGGATGTTACAG TCAGTCCACACGTC	88	GGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGG	187
"	CATCATAGGAAACACCAAAGATGATT	89	GAGGGTAAATTAAGCACAGTGG	188
"	ATATAGATACAGAAGCGTCATCAAAGCA	90	GAGGGTAAATTAAGCACAGTGG	188
"	GCTTGATGACGCTCTGTATCTATATT	91	GAGGGTAAATTAAGCACAGTGG	188
"	CCAAGTAAAGAGGTAAAGAAACTATGTG	92	GAGGGTAAATTAAGCACAGTGG	188
"	CCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGT	93	GAGGGTAAATTAAGCACAGTGG	188
"	ACACCAATGATATTTCTTAATGGTGC	94	GAGGGTAAATTAAGCACAGTGG	188
TRAC	CTATGGACTCAAGAGCAACAGTGT	95	GAGAATCAAATCGGTGAATAGG	189
"	CTCATGTCTAGCACAGTTGTCTGTGA	96	GAGAATCAAATCGGTGAATAGG	189
"	GTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGA	97	GAGAATCAAATCGGTGAATAGG	189
"	TTGCTCTGAAGTCCATAGACCTCATGT	98	GAGAATCAAATCGGTGAATAGG	189
"	GCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	99	GACACCTCTTCCCCAGCCCAGG	190
"	CTGTTGCTCTGAAGTCCATAGACCTCA	100	GACACCTCTTCCCCAGCCCAGG	190
"	CTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTT	101	GACACCTCTTCCCCAGCCCAGG	190
"	CTGACTTGCATGTGCAAACGCCTCAA	102	GACACCTCTTCCCCAGCCCAGG	190
"	TTGTTGCTCCAGGCCACAGCACTGTTGC	103	GACACCTCTTCCCCAGCCCAGG	190
"	TGAAAGTGGCCGGTTAATCTGCTCAT	104	GACACCTCTTCCCCAGCCCAGG	190

10

20

30

40

【表1-4】

"	AGGAGGATTCGGAACCAATCACTGACA	105	GATTAACCCGGCCACTTCAGG	191
"	GAGGAGGATTCGGAACCAATCACTGAC	106	GATTAACCCGGCCACTTCAGG	191
"	TGAAAGTGGCGGGTTAACATGCTCAT	104	GATTAACCCGGCCACTTCAGG	191
TRBC	CCGTAGAACTGGACTTGACAGCGGAAGT	107	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	192
"	TCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGA	108	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	192
"	TCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGA	108	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	192
"	TCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGA	108	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	192
"	CCGTAGAACTGGACTTGACAGCGGAAGT	107	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	192
"	CCGTAGAACTGGACTTGACAGCGGAAGT	107	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	192
"	CCGTAGAACTGGACTTGACAGCGGAAGT	107	GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGG	192
ヒト PD1	CCAGGGCGCTGTGGATCTGCATGCCT	109	GGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGG	193
"	CAGTCGTCTGGCGGTGCTACAACCTGGG	110	GGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGG	193
"	GAACACAGGCACGGCTGAGGGGCTCTCC	111	GTCCACAGAGAACACAGGCACGG	194
"	CTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTCCA	112	GTCCACAGAGAACACAGGCACGG	194
"	CAGTCGTCTGGCGGTGCT	113	GGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGG	193
ヒト CTLA- 4	ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGG	114	GCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGG	195
"	ACCCGGACCTCAGTGGCTTGCCTGGAG	115	GCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGG	195
"	ACTACCTGGCATAGGCAACGGAACCCA	116	GTACCCACGCCATACTACCTGG	196
"	TGGCGGTGGGTACATGAGCTCCACCTG	117	GTACCCACGCCATACTACCTGG	196
HLA CI 1: HLA A2	GTATGGCTGCGACGTGGGTGGACGGG	118	GCTGCGACGTGGGTGGACGGG	197
"	TTATCTGGATGGTGTGAGAACCTGGCCC	119	GCAGCCATACATTATCTGGATGG	198
"	TCCTCTGGACGGTGTGAGAACCTGGCCC	120	GCAGCCATACATCCTCTGGACGG	199
HLA A3	ATGGAGCCCGGGCGCGTGGATAGAGC	121	GTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGG	200
"	CTGGCTCGCGGCGTCGCTGCGAACCGC	122	GAGCCAGAGGATGGAGCCGCCGG	201
HLA B	TCCAGGAGCTCAGGTCTCGTCAGGGC	123	GGACCTGAGCTCCTGGACCGCGG	202
"	CGGCGGACCGCGGCTCAGATACCCA	124	GGACCTGAGCTCCTGGACCGCGG	202
"	AGGTGGATGCCAGGACGAGCTTGAGG	125	GATGCCAGGACGAGCTTGAGG	203
"	AGGGAGCAGAACAGCGCAGCAGCGCA	126	GCGCTGCTCTGCTCCCTGGAGG	204
"	CTGGAGGTGGATGCCAGGACGAGCTT	127	GCGCTGCTCTGCTCCCTGGAGG	204
"	GAGCAGAACAGCGCAGCAGCGCACCT	128	GCGCTGCTCTGCTCCCTGGAGG	204
HLA C	CCTCAGTTTCTGGGATCAAGGGAAC	129	GGGGATTCAAGGGAACACCCCTGG	205
"	CCTAGGAGGTCTGGCATTGCCATGC	130	GCAAATGCCATGACCTCTAGG	206
"	TCGGCGCGTCGCTGTCGAACCGACGAA	131	GAGCCAGAGGATGGAGCCGCCGG	201
"	CCAAGAGGGAGCCCGGGAGCCGTGGG	132	GGCGCCCGCGCTCCCTCTGG	207

## 【表1-5】

HLA cl. II: DBP2	GAAATAAGGCATACTGGTATTACTAATG	133	GTTCACATCTCCCCGGGCCTGG	208
"	GAGGAGAGCAGGCCGATTACCTGACCCA	134	GTTCACATCTCCCCGGGCCTGG	208
DRA	TCTCCCAGGGTGGTTCAGTGGCAGAATT	135	GGAGAACATGCGGGGGAAAGAGAGG	209
"	GCGGGGGAAAGAGAGGAGGAGAGAAGGA	136	GGAGAACATGCGGGGGAAAGAGAGG	209
TAP1	AGAAGGCTGTGGGCTCCTCAGAGAAAAT	137	GCCCACAGCCTCTGTACTCTGG	210
"	ACTCTGGGGTAGATGGAGAGCAGTACCT	138	GCCCACAGCCTCTGTACTCTGG	210
TAP2	TTGCGGATCGGGAGCAGCTTTCTCCT	139	GTTGATTGAGACATGGTGTAGG	211
"	TTGATTGAGACATGGTGTAGGTGAAGC	140	GTTGATTGAGACATGGTGTAGG	211
タバシン	CCACAGCCAGAGCCTCAGCAGGAGCCTG	141	GCTCTGGCTGTGGTCGCAAGAGG	212
"	CGCAAGAGGCTGGAGAGGCTGAGGACTG	142	GCTCTGGCTGTGGTCGCAAGAGG	212
"	CTGGATGGGGCTTGGCTGATGGTCAGCA	143	GCAGAACTGCCCCGGGCCCTGG	213
"	GCCCCGGCGAGTTCTGCGCGGGGGTCA	144	GCAGAACTGCCCCGGGCCCTGG	213
CIITA	GCTCCCAGGCAGCGGGCGGGAGGCTGGA	145	GCTGCCTGGGAGCCCTACTCGGG	214
"	CTACTCGGGCCATCGCGGCTGCCTCGG	146	GCTGCCTGGGAGCCCTACTCGGG	214
RFX5	TTGATGTCAGGGAAAGATCTCTGTAGTA	147	GCCTTCGAGCTTGTAGTCAGGG	215
"	GCTCGAAGGCTTGGTGGCGGGGCCAGT	148	GCCTTCGAGCTTGTAGTCAGGG	215

10

## 【0222】

(実施例2)：目的遺伝子に対するsgRNAおよびtru-RNA

20

実施例1に記載されているように、sgRNAの設計は、種々の考慮、即ち(i)ZFNへテロ二量体の認識配列を、関連ゲノム(ヒト、マウスまたは特定の植物種)の参照配列とアラインメントし、(ii)ZFN-ハーフ部位間のスペーサー領域を同定し、(iii)使用されているCas9タンパク質に関連し、スペーサー領域に最も近いPAMモチーフ(例えば、S.pyogenesのCas9を使用している場合のG[N17-20](G/A)G)の位置を同定し(1つよりも多いそのようなモチーフがスペーサーと重複する場合、スペーサーに対して中心にあるモチーフが選択された)、(iv)sgRNAのコアとしてそのモチーフを使用することを通して達成される。

## 【0223】

下記の表2に示されているのは、CRISPR/Cas系と本発明のsgRNAとを用いた標的化のための遺伝子例である。また標示しているのは、これらの遺伝子に関するcDNAの代表例のアクセッション番号である。

30

## 【表2-1】

表2 CRISPR/Cas系を用いた標的化のための遺伝子例

遺伝子名	UCSCゲノムブラウザ位置	代表アクセッション番号 (cDNA)参照配列
HBB	chr11:5246696-5248301	(NM_000518)
BCL11A	chr2:60684329-60780633	(NM_022893)
KLF1	chr19:12995237-12998017	(NM_006563)
HBG1	chr11:5269502-5271087	(NM_000559)
CCR5	chr3:46411633-46417697	(NM_000579)
CXCR4	chr2:136871919-136873813	(NM_001008540)
PPP1R12C	chr19:55602281-55628968	(NM_017607)
HPRT	chrX:133594175-133634698	(NM_000194)
マウス HPRT	chrX:52988078-53021660	(NM_013556)

40

【表2-2】

	(アセンブリ GRCm38/mm10)	
ALB	chr4:74269972-74287129	(NM_000477)
第VIII因子	chrX:154064064-154250998	(NM_000132.3)
第IX因子	chrX:138612895-138645617	(NM_000133)
LRRK2	chr12:40618813-40763086	(NM_198578)
Htt	chr4:3076237-3245687	(NM_002111)
RHO	chr3:129247482-129254187	(NM_000539)
CFTR	chr7:117120017-117308718	(NM_000492)
TCRA	chr6:42883727-42893575	(NM_001243168)
TCRB	chr7:142197572-142198055	L36092.2
PD-1	chr2:242792033-242795132	(NM_005018)
CTLA-4	chr2:204732511-204738683	(NM_001037631)
HLA-A	chr6:29910247-29912868	(NM_002116)
HLA-B	chr6:31236526-31239913	NM_005514.6
HLA-C	chr6:31236526-31239125	(NM_001243042)
HLA-DPA	chr6:33032346-33048555	(NM_033554.3)
HLA-DQ	chr6:32605183-32611429	(NM_002122)
HLA-DRA	chr6_ssto_hap7:3754283-3759493	(NM_019111)
LMP7	chr6_dbb_hap3:4089872-4093057	(X66401)
タバシン	chr6:33271410-33282164	(NM_172208)
RFX5	chr1:151313116-151319769	(NM_001025603)
CIITA	chr16:10971055-11002744	(NM_000246)
TAP1	chr6:32812986-32821748	(NM_000593)
TAP2	chr6:32793187-32806547	(NM_000544)
TAPBP	chr6:33267472-33282164	
DMD	chrX:31137345-33229673	(NM_004006)
RFX5	chr1:151313116-151319769	(NM_000449)
B. napus FAD3	PCT出願公開 WO2014/039684を参照	JN992612
B. napus FAD2	PCT出願公開 WO2014/039692を参照	JN992609
ダイズ FAD2	US20140090116を参照	
トウモロコシ ZP15	US 8329986 を参照	GBWI-61522 (MaizeCyc)
β-ケトアシルACPシンターゼ II (KASII)	US8592645 を参照	
トマト MDH	US 20130326725 を参照	AY725474
B. napus EPSPS パラログ C+D	US8399218 を参照	
パラログ D	US8399218 を参照	
パラログ A+B	US8399218 を参照	
PPP1R12C (AAVS1)	chr19:55602840-55624858	(NM_017607)
GR	5: 142646254- 142783254	(NM_000176)
IL2RG	chrX:70327254-70331481	(NM_000206)
SFTPB	chr2:85884440-85895374	(NM_198843)

10

20

30

40

【0224】

次いで、標的遺伝子を修飾するため、単鎖ガイドRNAを、1つまたは複数の機能ドメインをコードするポリヌクレオチドおよび任意選択でドナー配列と併せて、細胞内へ導入する。

【0225】

本明細書にて言及されている全ての特許、特許出願および刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0226】

開示は、理解を明確にする目的で、説明および例によっていくらか詳細に提供されているが、本開示の精神または範囲を逸脱することなく様々な変形および改変が実践され得る

50

ことは、当業者にとって明らかである。したがって、前出の記載および実施例は、限定として解釈されるべきものではない。

【配列表】

2016521975000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/038216
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12N 15/11 (2014.01) CPC - C12N 15/85 (2014.09) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12N 15/11, 15/63, 15/82, 15/85; C12P19/34 (2014.01) USPC - 435/1.1, 320.1, 325, 366, 375, 419; 536/23.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A01K 67/0275; C12N1 5/85, 9/22, 15/63, 15/807, 15/8213; C12Q 1/68 (2014.09) (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed Search term used: CRISPR CAS CAS9 transcription activation repression guide RNA gRNA plant		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MALI et al. "RNA-guided human genome engineering via Cas9," Science. 03 January 2013 (03.01.2013), Vol.339, Pgs. 823-826. entire document	1-3, 6-10
Y		4, 5, 14
Y	QI et al. "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression," Cell, 28 February 2013 (28.02.2013), Vol. 152, Pgs.1173-1183. entire document	4, 5
Y	MCCONIGLE et al. "C4 Isoform of NADP-Malate Dehydrogenase: cDNA Cloning and Expression In Leaves of C4, C3, and C3-C4 Intermediate Species of Faveria," Plant Physiol. 01 July 1995 (01.07.1995), Vol. 108, Pgs. 1119-1126. entire document	14
X	WO 2012/083240 A2 (REINHERZ et al) 21 June 2012 (21.06.2012) entire document	13, 15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document-member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  05 November 2014	Date of mailing of the international search report  18 NOV 2014	
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2014/038216

**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.: 11, 12 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**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.

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,H,R,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 コンウェイ, アントニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 501, ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 コスト, グレゴリー ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 501, ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 デケルヴェル, ラッセル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 501, ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 レバー, エドワード ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 501, ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 レイク, アンドレアス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 501, ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 ウルノフ, フョードル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 501, ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 ワン, ジアンピン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 501, ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 ザン, エイチ. スティーブ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94804, リッチモンド, カナル ブールバード 501, ポイント リッチモンド テク センター, スート エー100, サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド 気付

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA08 AA20 CA11 DA01 DA02 GA11 HA08 HA20