

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7611702号
(P7611702)

(45)発行日 令和7年1月10日(2025.1.10)

(24)登録日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55	Z N A
C 1 2 N 9/16 (2006.01)	C 1 2 N 9/16	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
請求項の数 18 (全104頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-563637(P2020-563637)	(73)特許権者	520433182 エmendバイオ インコーポレーテッド アメリカ合衆国 デラウェア州 1980 5, ウィルミントン, スイート 403 - ビー, センター ロード 1013
(86)(22)出願日	令和1年5月6日(2019.5.6)	(74)代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(65)公表番号	特表2021-522828(P2021-522828 A)	(74)代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(43)公表日	令和3年9月2日(2021.9.2)	(74)代理人	100196966 弁理士 植田 渉
(86)国際出願番号	PCT/US2019/030874	(72)発明者	バラム, デヴィッド イスラエル国 65255 テル アヴィ ヴ, シムタット ハタヴォール ストリー ト 5
(87)国際公開番号	WO2019/217294		
(87)国際公開日	令和1年11月14日(2019.11.14)		
審査請求日	令和4年4月12日(2022.4.12)		
(31)優先権主張番号	62/723,941		
(32)優先日	平成30年8月28日(2018.8.28)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/743,309		
(32)優先日	平成30年10月9日(2018.10.9)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘテロ接合性 E L A N E 遺伝子の対立遺伝子の差次的ノックアウト

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞の、重症先天性好中球減少症 (S C N) 又は周期性好中球減少症 (C y N) に関連している変異を有する好中球エラストラーゼ遺伝子 (E L A N E 遺伝子) 遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するための方法における使用のための、

C R I S P Rヌクレアーゼ又は前記 C R I S P Rヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子、及び

配列番号：352及び889の何れか1つに記載されているヌクレオチド配列を有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、

を含む組成物であって、前記細胞は、rs10414837及びrs1683564から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であり、

前記方法は、前記細胞に、前記組成物を導入することを含み、

前記 C R I S P Rヌクレアーゼ及び前記第1のRNA分子の複合体は、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) 部位の1~28ヌクレオチド上流又は下流の間の前記 E L A N E 遺伝子の前記変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、前記変異対立遺伝子は、前記1つ又は複数の多型部位に基づいて前記第1のRNA分子による二本鎖切断のための標的とされ、

前記1つ又は複数の多型部位の R E F 又は A L Tヌクレオチド塩基の1つを標的とするよう設計される、組成物。

【請求項2】

C R I S P Rヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子をさらに含む請求項1に記載の組成物であって、細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化する前記方法において、前記第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの前記複合体は、前記E L A N E遺伝子における第2の二本鎖切断に影響する、組成物。

【請求項3】

前記E L A N E遺伝子の前記変異対立遺伝子における前記二本鎖切断は、P A M部位の1～20ヌクレオチド上流又は下流の間にある、請求項1～2の何れか一項に記載の組成物。

【請求項4】

前記第2の二本鎖切断は、前記E L A N E遺伝子の非コード領域内である、請求項2に記載の組成物。

【請求項5】

細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化する前記方法において、前記細胞は、rs10414837でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの前記複合体は、前記E L A N E遺伝子のイントロン4における二本鎖切断に影響し、

細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化する前記方法において、前記細胞は、rs10414837でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの前記複合体は、前記E L A N E遺伝子のイントロン3における二本鎖切断に影響し、

細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化する前記方法において、前記細胞は、rs10414837でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの前記複合体は、前記E L A N E遺伝子の3' U T R領域における二本鎖切断に影響し、

細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化する前記方法において、前記細胞は、rs1683564でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの前記複合体は、前記E L A N E遺伝子のイントロン4における二本鎖切断に影響し、

細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化する前記方法において、前記細胞は、rs1683564でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの前記複合体は、前記E L A N E遺伝子のイントロン3における二本鎖切断に影響し、又は

細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化する前記方法において、前記細胞は、rs1683564でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの前記複合体は、前記E L A N E遺伝子の3' U T R領域における二本鎖切断に影響する、

請求項2に記載の組成物。

【請求項6】

細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化する前記方法において、重症先天性好中球減少症(S C N)若しくはC y Nに関連しているE L A N E遺伝子変異を有する前記細胞が、S C N若しくはC y Nに関連しているE L A N E遺伝子変異を有する及び/又はS C N若しくはC y Nに苦しむ対象から取得され、前記対象は、rs10414837及びrs1683564から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である、請求項1～5の何れか一項に記載の組成物。

【請求項7】

細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化する前記方法において、前記細胞が前記対象から動員によって及び/又はアフエレシスによって、又は骨髓穿刺法によって取得される、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化する前記方法において、前記組成物を前記

10

20

30

40

50

細胞に導入する前に前記細胞を予備刺激する、請求項 1 ~ 7 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

細胞の変異 E L A N E 対立遺伝子を不活性化する前記方法が、前記細胞を培養増殖して細胞群を取得することをさらに含む、請求項 6 ~ 8 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記細胞を、幹細胞因子 (S C F)、 I L - 3 及び G M - C S F のうちの 1 つ又は複数とともに培養する、及び / 又は

前記細胞を少なくとも 1 つのサイトカインとともに培養する、
請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つのサイトカインは、組換えヒトサイトカインである、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 の何れか一項に記載の組成物を用いて取得される、 E L A N E 遺伝子の不活性化された対立遺伝子を含む、改変細胞。

【請求項 13】

S C N 又は C y N を治療、寛解又は防止するための、請求項 1 ~ 11 の何れか一項に記載の組成物、若しくは請求項 12 に記載の改変細胞を含む薬物であって、 S C N 又は C y N を有する又は有するリスクがある対象に、請求項 1 ~ 11 の何れか一項に記載の組成物、又は請求項 12 に記載の改変細胞を送達することにより前記薬物を投与する、薬物。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 11 の何れか一項に記載の組成物、並びに前記細胞の前記変異 E L A N E 対立遺伝子を不活性化するために、前記 R N A 分子、及び C R I S P R ヌクレアーゼ若しくは前記 C R I S P R ヌクレアーゼをコードする配列を含む核酸分子を前記細胞に送達するための説明書を備える、前記細胞の変異 E L A N E 対立遺伝子を不活性化するためのキットであって、前記 R N A 分子と前記 C R I S P R ヌクレアーゼは、前記変異 E L A N E 対立遺伝子における二本鎖切断に影響する複合体を形成することができる、キット。

【請求項 15】

t r a c r R N A 分子若しくは前記 t r a c r R N A 分子をコードする配列を含む核酸分子をさらに含む請求項 14 に記載のキットであって、前記 t r a c r R N A 分子は、 R N A 分子とハイブリッドすることができる配列を含み、前記 R N A 分子、 t r a c r R N A 分子、及び前記 C R I S P R ヌクレアーゼは、前記変異 E L A N E 対立遺伝子における二本鎖切断に影響する複合体を形成することができる、キット。

【請求項 16】

前記 P A M 部位が、 N G G、 N A G、 N N G R R T、 N N N V R Y M、 N G A N、 N G N G、 N G C G、 N G A G、 N N N N G A T T、または T T T V の群の何れかから選択されるヌクレオチド配列である、請求項 1 ~ 2 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記第 1 の R N A 分子が、配列番号 8 8 9 に記載されているヌクレオチド配列からなるガイド配列部を含み、前記 1 つ又は複数の多型部位が、 r s 1 6 8 3 5 6 4 である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記第 1 の R N A 分子が、配列番号 3 5 2 に記載されているヌクレオチド配列からなるガイド配列部を含み、前記 1 つ又は複数の多型部位が、 r s 1 0 4 1 4 8 3 7 である、請求項 1 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2018年10月9日に提出された米国仮出願第 62 / 743 , 309 号、

10

20

30

40

50

2018年8月28日に出願された米国仮出願第62/723,941号、2018年5月6日に出願された米国仮出願第62/667,536号の利益を主張するものであり、その各々の内容を参照により本明細書に援用される。

【0002】

本出願を通じて、丸括弧で参照されることを含んで、各種出版物が参照される。本出願において言及される全ての出版物の開示は、本発明が属する当該技術及び本発明とともに利用されることができる当該技術分野の特徴の追加の記述を提供するために、その全体を参照により本出願に援用される。

【0003】

配列リストに対する参照

本出願は、「190506__90522 - A - PCTj Sequence Listing_ADR.txt」と名前をつけたファイルに存在するヌクレオチド配列を参照により援用し、このファイルはサイズが249キロバイトであり、MS-Windowsと互換性があるオペレーションシステムを有する、IBM-PC機械フォーマットにおいて2019年5月3日に作成され、2019年5月6日に本出願の一部として提出されたテキストファイルに含まれる。

【背景技術】

【0004】

ヒトゲノムには、挿入及び欠失、反復配列のコピー数の差並びに一塩基多型(SNP)を含む、いくつかの種類の変動がある。SNPは、ゲノム中の一塩基(アデニン(A)、チミン(T)、シトシン(C)又はグアニン(G))がヒト対象間又は個人の一対の染色体間で異なるときに生じるDNA配列の変動である。長年にわたって、種々のタイプのDNAの変動はピンポイントの遺伝形質若しくは疾患因果関係についての研究のマーカーとして又は遺伝性障害の潜在的原因としてのいずれかで研究コミュニティの中心となってきた。SNPは通常、良性で疾患の原因ではないと考えられている。

【0005】

遺伝性障害は、ゲノム中の1つ又は複数の異常によって起こる。遺伝性障害は、「ドミナントな」又は「潜性」のいずれかとみなされてもよい。潜性遺伝性障害は、提示されるためには2コピーの(すなわち2個の対立遺伝子の)異常/欠損遺伝子が必要となる障害である。対照的に、ドミナントな遺伝性障害では、正常な(機能性の/健康な)遺伝子又は遺伝子群にわたって優位を示す遺伝子又は遺伝子群が関与する。このように、ドミナントな遺伝性障害においては、特定の遺伝性障害の症状を引き起こす又は寄与するためには1コピー(すなわち対立遺伝子)のみの異常欠損遺伝子しか必要とされない。このような変異には、例えば変化した遺伝子産物が新しい分子機能又は遺伝子発現の新しいパターンを持つ機能獲得型変異が含まれる。機能獲得型変異は、一般的にドミナントネガティブ変異である。ドミナントネガティブ変異の例は、1個の対立遺伝子が突然変異して機能を失い、残された単一の野生型対立遺伝子が特定の細胞機能に十分なほどの必要なタンパク質を作成しないハプロ不全である。他の例には、野生型対立遺伝子に対して拮抗的に働く遺伝子産物を有するドミナントネガティブ変異が含まれる。

【0006】

好中球減少症

好中球減少症は、血液循環中の好中球の絶対数の減少と定義され、通常末梢血液中の好中球絶対数(ANC)を測定することにより診断される。好中球減少症の重症度は、ANCが1000~1500/ μ Lであると軽度、ANCが500~1000/ μ Lであると中等度、又はANCが500/ μ L未満であると重度とみなされる(Boxer 2012)。

【0007】

好中球減少症は、先天性(遺伝性)又は後天性に分類することができる。先天性条件での、通常常染色体性優性遺伝の2つの主要なタイプは、周期性好中球減少症(CyN)及び重症先天性好中球減少症(SCN)である。周期性好中球減少症は、好中球数が正常レ

10

20

30

40

50

ベルからゼロまで変動することにより特徴づけられる一方、重症先天性好中球減少症（SCN）は、出生時に非常に低いANC（500/mT）が認められ、前骨髄球/骨髄球ステージで骨髄中の骨髄造血の成熟化が停止し、細菌感染症を早期発症することにより特徴づけられる（Carlsson et al. 2012；Horwitzら、2013）。

【0008】

SCNを、血液中の非常に低いANCを測定し、骨髄穿刺法を検査して骨髄成熟の停止を同定することにより診断してもよい（Dale 2017）。SCNは、通常生後6か月前に診断される一方、CyNの診断は、概して生後2年の間、又はそれ以降になされ、主要な臨床所見は反復性急性口腔医学的疾患である。SCNが疑われるとき、悪性血液疾患を除外し、細胞充実度を決定し、骨髄成熟度を評価し、正確な原因の徴候を検出するために、今では細胞遺伝学的骨髄試験が決定的である、骨髄検査が必要となることが多い。SCN及びCyNを評価する際、抗好中球抗体アッセイ、免疫グロブリンアッセイ（IgGAM）、リンパ球免疫表現型検査、脾臓マーカー（血清トリプシノーゲン及び糞便エラスターゼ）並びに脂溶性ビタミンレベル（ビタミンA、E及びD）も関心事項である（Donadieu 2011を参照）。

10

【0009】

SCNは、常染色体性 潜性（HAX1、G6PC3）、常染色体性 ドミナント（ELANE、GFI1）又はX染色体連鎖（WAS）型の遺伝であることができ、又は孤発性に生じることにもできる（Carlssonら、2012；Boxer 2012）。

【0010】

周期性及び先天性好中球減少症は、「好中球エラスターゼ遺伝子」（ELANE遺伝子）好中球エラスターゼのための遺伝子の突然変異によって引き起こされることが最も多い。ELANE遺伝子変異は、SCN患者の40～55%で同定され、男性と女性は等しく発症する（Donadieuら、2011；Dale 2017）。ELANE遺伝子中の突然変異は、常染色体性及び孤発性のSCNの症例と関連している（Carlssonら、2012）。今日までに、200種類を超える様々なELANE突然変異が同定されてきており、全てのエキソン並びにイントロン3及びイントロン4にわたってランダムに分布している（Skokowara、2017）。例えば予後不良に特に関連づけられるC151Y及びG214Rなどの、CyN及びSCNに関連する120種類を超える別個のELANE遺伝子変異が今では知られている（CyN及びSCNに関連するELANE遺伝子の包括的リストについては、Makaryanら、2012を参照；またGermechausenら、2013を参照）。

20

30

【0011】

ELANEは、好中球細胞外トラップ（病原体と結合する繊維のネットワーク）の機能に關与する好中球エラスターゼ（NE）をコードする。いくつかの研究から、変異ELANEの産物は、骨髄での好中球の産出を妨害し、好中球減少症を引き起こすことが示唆されている。これらの研究から、NEでの突然変異は、小胞体ストレス応答（UPR）を惹起し、骨髄での好中球形成プロセスにおける細胞損失につながるということが分かる（Makaryanら、2017）。

【0012】

現在の治療

顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）は、SCNの第一選択治療とみなされる（Connolly, Choi及びLevine 2012）。G-CSFは、より多い好中球の生産を刺激し、アポトーシスを遅延させる（Schaffer及びKlein 2007）。SCN患者の10%はまだ重度の細菌性感染症又は敗血症で死亡するけれども、悪性病変が発生している患者を含めて、全体の生存率は今では80%を超えると推定される（Skokowara、2017）。G-CSF療法は敗血症での死亡数を防止することに成功しているけれども、長期治療するとSCN患者に骨髄異形成症候群（MDS）又は白血病が発生するリスクが高まることと関連することが明らかになった。SCNにおいて最も一般的な白血病は、AMLであるが、急性リンパ性白血病（ALL）、若年性骨髄単球

40

50

性白血病 (JMML)、慢性骨髄単球性白血病 (CMML) 及び二重表現型白血病も文献に報告されている (Connelly, Choi, 及び Levine 2012)。G-CSF に強い応答がある (投与量 $8 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 未満) 患者は、G-CSF 時から 15 年後 MDS / 白血病の発症について累積発症率が 15% だった一方、高投与量にも関わらず G-CSF に対して応答不良だった患者の発症率は 34% だったとこれまでに報告された (Rosenbergら、2010)。

【0013】

造血幹細胞移植 (HSCT) は、G-CSF 療法に応答しない又は AML / MDS が発症した患者に対しての代替的な根治療法である。しかしながら、HSCT を受ける慢性好中球減少症患者には、真菌及び移植片対宿主病などの感染性合併症が発症するリスクが高い (Skokowaraら、2017)。さらに、HSCT では、生存率を改善するためには適合血縁ドナーが必要となるが、ほとんどの患者には利用可能な適合ドナーがない (Connelly, Choi, 及び Levine 2012)。

10

【発明の概要】

【0014】

開示されるのは、ドミナントな変異対立遺伝子を破壊する又は生じた mRNA を分解することによりドミナントな変異対立遺伝子の発現をノックアウトする手法である。

【0015】

本開示は、一方の対立遺伝子は変異が疾患表現型を生じる変異タンパク質をコードするような変異を保持し (「変異対立遺伝子」)、他方の対立遺伝子は機能性タンパク質をコードする (「機能性対立遺伝子」、遺伝子の 2 個の対立遺伝子間を識別 / 区別するために少なくとも 1 つの自然発生のヘテロ接合性ヌクレオチドの差又は遺伝子多型 (一塩基多型 (SNP) 等) を利用する方法を提供する。

20

【0016】

本発明の実施形態は、ある一定の細胞又は対象においてドミナントな変異対立遺伝子を発現する遺伝子の少なくとも 1 つのヘテロ接合性 SNP を利用する方法を提供する。本発明の実施形態において、利用される SNP は、疾患表現型と関連してもしなくてもよい。本発明の実施形態において、ガイド配列を含む RNA 分子は、遺伝子の変異対立遺伝子中のヘテロ接合性 SNP に存在し、したがって遺伝子の機能性対立遺伝子中の異なるヌクレオチド塩基を有するヌクレオチド塩基を標的とすることにより遺伝子の変異対立遺伝子を標的とする。

30

【0017】

いくつかの実施形態において、方法は、変異タンパク質の発現をノックアウトし、機能性タンパク質の発現を許容するステップをさらに含む。

【0018】

本発明は、細胞の、重症先天性好中球減少症 (SCN) 又は周期性好中球減少症 (CyN) に関連している変異を有する好中球エラスターゼ遺伝子 (ELANE 遺伝子) 遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するための方法であって、細胞は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470 及び rs78302854 から成る群から選択される 1 つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であり、方法は、

40

細胞に、

CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び 17 ~ 20 個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第 1 の RNA 分子を含む組成物を導入することを含み、

CRISPRヌクレアーゼ及び第 1 の RNA 分子の複合体は、ELANE 遺伝子の変異

50

対立遺伝子における二本鎖切断に影響する、方法を提供する。

【0019】

本発明は、本発明の方法によって取得される改変細胞を提供する。

【0020】

本発明は、ELANE 遺伝子の1つの対立遺伝子の少なくとも一部を欠いている改変細胞を提供する。

【0021】

本発明は、改変細胞及び薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

【0022】

本発明は、本発明の細胞と薬学的に許容される担体とを混合することを含む、組成物のインビトロ又はエクスピボ調製方法を提供する。

10

【0023】

本発明は、インビトロ又はエクスピボで改変細胞を含む組成物を調製する方法であって、方法は、

a) SCN又はCyNに関連しているELANE 遺伝子変異を有する及び/又はSCN又はCyNに苦しむ対象から取得した細胞からHSPCを単離することであって、対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である、単離すること、及び対象から細胞を取得すること、

20

b) 1つ又は複数の細胞におけるELANE 遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するよう、ステップ(a)の細胞に、

CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組成物を導入することであって、

CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、1つ又は複数の細胞におけるELANE 遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、

30

任意選択で、細胞にCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体は、1つ又は複数の細胞におけるELANE 遺伝子における第2の二本鎖切断に影響し、

それにより改変細胞を取得する、導入すること、任意選択で

c) ステップ(b)の改変細胞を培養増殖することであって、改変細胞は生着することができ、生着後に子孫細胞を生じることができ、培養増殖すること、を含む、方法を提供する。

【0024】

40

本発明は、

a) SCN又はCyNに関連しているELANE 遺伝子変異を有する及び/又はSCN又はCyNに苦しむ対象から取得した細胞からHSPCを単離することであって、対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である、単離すること、

50

b) 1つ又は複数の細胞における E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するよう、ステップ (a) の細胞に、

C R I S P Rヌクレアーゼ又はC R I S P Rヌクレアーゼをコードする配列、及び17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組成物を導入することであって、

C R I S P Rヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、1つ又は複数の細胞における E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、

任意選択で、細胞にC R I S P Rヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの複合体は、1つ又は複数の細胞の E L A N E 遺伝子における第2の二本鎖切断に影響し、

それにより改変細胞を取得する、導入すること、任意選択で

c) ステップ (b) の細胞を培養増殖することであって、改変細胞は生着することができる、生着後に子孫細胞を生じることができる、培養増殖すること、及び

d) 対象の S C N又はC y Nを治療するために対象にステップ (b) 又はステップ (c) の細胞を投与すること、を含む方法によってインビトロで調製される組成物の使用を提供する。

【0025】

本発明は、治療有効量の本発明の改変細胞、組成物又は方法によって調製された組成物を投与することを含む、S C N又はC y Nで苦しんでいる対象の治療方法を提供する。

【0026】

本発明は、S C N又はC y Nに関連している E L A N E 遺伝子変異を有する治療を必要とする対象におけるS C N又はC y Nの治療方法であって、対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs7400211、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であり、方法は、

a) 対象から取得した細胞からH S P Cを単離すること、

b) 1つ又は複数の細胞における E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するよう、ステップ (a) の細胞に、

C R I S P Rヌクレアーゼ又はC R I S P Rヌクレアーゼをコードする配列、及び17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組成物を導入することであって、

C R I S P Rヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、1つ又は複数の細胞における E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、

任意選択で、細胞にC R I S P Rヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの複合体は、1つ又は複数の細胞の E L A N E 遺伝子における第2の二本鎖切断に影響し、

それにより改変細胞を取得する、導入すること、任意選択で

c) ステップ (b) の細胞を培養増殖することであって、改変細胞は生着することができる、生着後に子孫細胞を生じることができる、培養増殖すること、及び

d) 対象にステップ (b) 又はステップ (c) の細胞を投与し、それにより対象のS C N又はC y Nを治療すること、を含む、方法を提供する。

【0027】

本発明は、S C N又はC y Nに関連している E L A N E 遺伝子変異を有する治療を必要とする対象におけるS C N又はC y Nの治療方法であって、対象は、rs1041483

7、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であり、方法は、

対象に自家改変細胞又は自家改変細胞の子孫を投与することであって、自家改変細胞は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子が二本鎖切断するように改変され、

上記二本鎖切断は、CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列及び第1のRNA分子を含む組成物を細胞に導入することから生じ、CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、細胞におけるELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するよう、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子が二本鎖切断することに影響する、投与すること、を含み、

それにより対象のSCN又はCyNを治療する、方法を提供する。

【0028】

本発明は、SCN又はCyNと診断された対象のプールから治療のための対象を選択する方法であって、方法は、

a) 対象のプールにおける各対象から細胞を取得するステップ、
b) 各対象の細胞をSCN又はCyNに関連するELANE遺伝子変異を求めて選別し、SCN又はCyNに関連するELANE遺伝子変異を有する対象のみを選択するステップ、

c) ステップ(b)において選択された対象の細胞を配列決定することによりrs10414837、rs3761005、rs1683564から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でのヘテロ接合性を選別するステップ、そして

d) 治療のために1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である細胞を有する対象のみを選択するステップ、を含む方法を提供する。

【0029】

本発明の実施形態は、

e) 対象の骨髄から末梢血液の吸引によるか又は動員及びアフェレシスによるかのいずれかにより造血幹細胞及び前駆細胞(HSPC)を取得すること、

f) ステップ(e)のHSPC細胞に
1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼ又は1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼをコードする配列

ELANE遺伝子の変異対立遺伝子に存在する1つ又は複数の多型部位のヘテロ接合性対立遺伝子のヌクレオチド塩基を標的とする配列番号1~1192のいずれか1つに記載されている17~20個の近接しているヌクレオチドの配列中の17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、及び

ELANE遺伝子のイントロン3、イントロン4又は3'UTRにおける配列を標的とするガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、

第1のRNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体は、1つ又は複数のHSPC細胞のELANE遺伝子の変異対立遺伝子における第1の二本鎖切断に影響し、第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体は、第1のRNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体が第1の二本鎖切断することに影響した1つ又は複数のHSPC細胞におけるELANE遺伝子の両対立遺伝子のイントロン3、イントロン4又は3'UTRが第2の二本鎖切断することに影響し、それにより改変細胞を取得する、導入すること、

g) 対象にステップ(f)の改変細胞を投与し、それにより対象のSCN又はCyNを治療すること、を含む、選択された対象におけるSCN又はCyNを治療することをさらに含む。

【0030】

10

20

30

40

50

本発明は、配列番号 1 ~ 1 1 9 2 のいずれか 1 つに記載されている 1 7 ~ 2 0 個の近接しているヌクレオチドの配列中の 1 7 ~ 2 0 個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む RNA 分子を提供する。

【 0 0 3 1 】

本発明は、細胞の、変異 E L A N E 対立遺伝子を不活性化するための方法であって、方法は、細胞に本発明の RNA 分子又は組成物を送達することを含む、方法を提供する。

【 0 0 3 2 】

本発明は、細胞の、変異 E L A N E 対立遺伝子を不活性化するための、本発明の RNA 分子、本発明の組成物又は本発明の方法により調製された組成物の使用を提供する。

【 0 0 3 3 】

本発明は、細胞の、変異 E L A N E 対立遺伝子を不活性化するための、本発明の RNA 分子、本発明の組成物又は本発明の方法により調製された組成物を含む薬物であって、細胞に本発明の RNA 分子、本発明の組成物又は本発明の方法により調製された組成物を送達することにより薬物を投与する、薬物を提供する。

【 0 0 3 4 】

本発明は、S C N 又は C y N を有する又は有するリスクがある対象における S C N 又は C y N を治療、寛解又は防止するための、本発明の方法、本発明の改変細胞、本発明の組成物又は本発明の方法により調製された組成物、又は本発明の RNA 分子の使用を提供する。

【 0 0 3 5 】

本発明は、S C N 又は C y N を治療、寛解又は防止するための、本発明の RNA 分子、本発明の組成物、本発明の方法により調製された組成物又は本発明の改変細胞を含む薬物であって、S C N 又は C y N を有する又は有するリスクがある対象に、本発明の RNA 分子、本発明の組成物、本発明の方法により調製された組成物又は本発明の改変細胞を送達することにより薬物を投与する、薬物を提供する。

【 0 0 3 6 】

本発明は、本発明の RNA 分子、C R I S P R ヌクレアーゼ又は C R I S P R ヌクレアーゼをコードする配列、及び / 又は t r a c r RNA 分子又は t r a c r RNA 分子をコードする配列、及び細胞の変異 E L A N E 対立遺伝子を不活性化するために、RNA 分子、C R I S P R ヌクレアーゼ又は C R I S P R ヌクレアーゼをコードする配列、及び / 又は t r a c r RNA 又は t r a c r RNA 分子をコードする配列を細胞に送達するための説明書を備える、細胞の変異 E L A N E 対立遺伝子を不活性化するためのキットを提供する。

【 0 0 3 7 】

本発明は、本発明の RNA 分子、C R I S P R ヌクレアーゼ又は C R I S P R ヌクレアーゼをコードする配列、及び / 又は t r a c r RNA 分子又は t r a c r RNA 分子をコードする配列、及び S C N 又は C y N を治療するよう RNA 分子、C R I S P R ヌクレアーゼ及び / 又は t r a c r RNA を S C N 又は C y N を有する又は有するリスクがある対象に送達するための説明書を備える、対象の S C N 又は C y N を治療するためのキットを提供する。

【 0 0 3 8 】

本発明は、本発明の組成物、本発明の方法により調製された組成物、又は本発明の改変細胞、及び細胞の E L A N E 遺伝子を不活性化するよう組成物を細胞に送達するための説明書を備える、細胞の変異 E L A N E 対立遺伝子を不活性化するためのキットを提供する。

【 0 0 3 9 】

本発明は、本発明の組成物、本発明の方法により調製された組成物、又は本発明の改変細胞、及び S C N 又は C y N を治療するよう本発明の組成物、本発明の方法により調製された組成物、又は本発明の改変細胞を S C N 又は C y N を有する又は有するリスクがある対象に送達するための説明書を備える、対象の S C N 又は C y N を治療するためのキットを提供する。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】図1。SNP位置の上流からイントロン3、イントロン4又は3'UTRまでのプロモーター領域を切除する。1つの実施例において、第1のガイド配列は変異対立遺伝子の上流領域のヘテロ接合性SNP位置の特異的配列を標的とし(戦略1a-rs10414837、戦略1b-rs3761005)、第2のガイド配列は遺伝子の2個の対立遺伝子に共通するイントロン4の配列を標的とする。

【図2】図2。SNP位置の上流からイントロン3、イントロン4又は3'UTRまでのプロモーター領域を切除する。1つの実施例において、第1のガイド配列は変異対立遺伝子の上流領域のヘテロ接合性SNP位置の特異的配列を標的とし(戦略1a-rs10414837、戦略1b-rs3761005)、第2のガイド配列は遺伝子の2個の対立遺伝子に共通するイントロン3の配列を標的とする。別の実施例において、第1のガイド配列は変異対立遺伝子の上流領域ヘテロ接合性SNP位置の特異的配列を標的とし(戦略1a-rs10414837、戦略1b-rs3761005)、第2のガイド配列は遺伝子の2個の対立遺伝子に共通する3'UTRの配列を標的とする。

【図3】図3。イントロン3、イントロン4又は3'UTRから3'UTRの下流の領域までを切除する。1つの実施例において、第1のガイド配列は変異対立遺伝子の上流領域ヘテロ接合性SNP位置の特異的配列を標的とし(戦略2-rs1683564)、第2のガイド配列は遺伝子の2個の対立遺伝子に共通するイントロン4の配列を標的とする。別の実施例において、第1のガイド配列は変異対立遺伝子の上流領域のヘテロ接合性SNP位置の特異的配列を標的とし(戦略2-rs1683564)、第2のガイド配列は遺伝子の2個の対立遺伝子に共通するイントロン3の配列を標的とする。さらなる実施例において、第1のガイド配列は変異対立遺伝子の上流領域のヘテロ接合性SNP位置の特異的配列を標的とし(戦略2-rs1683564)、第2のガイド配列は遺伝子の2個の対立遺伝子に共通する3'UTRの配列を標的とする。

【図4】図4。イントロン3、イントロン4又は3'UTRから3'UTRの下流の領域までを切除する。この戦略は、健常な対立遺伝子は無傷のままにする一方、疾患発症性対立遺伝子(「変異対立遺伝子」)を特異的にノックアウトするよう設計される。対立遺伝子特異的編集は、集団におけるヘテロ接合頻度が比較的高い区別する(ヘテロ接合性)SNP位置を標的とするガイドを使用することにより達成される。

【図5】図5。ヘテロ接合性頻度及び選択ヘテロ接合性SNP間の重複/連鎖に基づく集団内の予想される適用範囲。3個の治療戦略の代替解決策を設計すると、集団の約80%を含めることができてもよい。集団の約80%は、上記リストから1つ又は複数のヘテロ接合性SNPを保持していると評価される。そのうち33%は1つのヘテロ接合性SNPを保持し、31%はリストから2個のヘテロ接合性SNPを保持し、16%は3個のヘテロ接合性SNPを保持する。一方で、20%は上記リストのいかなるSNPも保持しない。

【図6】図6。HeLa細胞を96穴プレートに播種した(3K/ウェル)。24時間後、65ngのWT-Cas9又はDead-Cas9及びg36~g66として識別され、Turbofect試薬(サーモサイエンティフィック)を使用してELANEの異なる領域及びSNPを標的とする、20ngのgRNAプラスミドで同時導入した。編集の割合を以下の式にしたがって算出した。100%-(未編集バンド強度/全バンド強度)X100。3個の独立した実験のDead-Cas9バックグラウンド活性を減算した後の各gRNAの平均活性±SDを示す。

【図7】図7。健常ドナーからのHSCをspCas9-WT及びEMX1(sgEMX1)又はELANE(g35:INT4;g58:rs3761005;g62:rs1683564)のいずれかを標的とするgRNAのRNA構成要素でヌクレオフェクトした(nucleofected)。ヌクレオフェクション後72時間で、gDNAを抽出し、編集レベルをIDAにより定量した。二度繰り返して実施された2個の独立した実験の平均編集%±SDを示す。

【図8】図8。ELANE遺伝子の変異対立遺伝子の特異的ノックアウトは、ELANE

10

20

30

40

50

遺伝子の変異対立遺伝子のイントロン4及びエキソン5を切除することにより媒介される。これは対立遺伝子特異的DSBを媒介するために、イントロン4でのDSBを媒介しSNP rs1683564を利用することにより成し遂げられる。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本発明の実施形態は、細胞の、重症先天性好中球減少症(SCN)又は周期性好中球減少症(CyN)に関連している変異を有する好中球エラスターゼ遺伝子(ELANE遺伝子)遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するための方法であって、細胞は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であり、方法は、

細胞に、

CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子を含む組成物を導入することを含み、

CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響する、方法を提供する。

【0042】

本発明の実施形態において、CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、変異対立遺伝子は、1つ又は複数の多型部位に基づいて二本鎖切断のための標的とする。

【0043】

本発明の実施形態において、CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、変異対立遺伝子は、1つ又は複数の多型部位での変異対立遺伝子の配列に基づいて二本鎖切断のための標的とする。

【0044】

本発明の実施形態において、CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子に存在する1つ又は複数の多型部位のヌクレオチド塩基に基づいてELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響する。

【0045】

本発明の実施形態は、CRISPRヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することをさらに含み、第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体は、ELANE遺伝子における第2の二本鎖切断に影響する。

【0046】

本発明の実施形態において、組成物は、1、2、3又は複数のCRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含んでもよい。本発明の実施形態において、組成物を細胞に導入することは、細胞に1、2、3又は複数の組成物を導入することを含む。本発明の実施形態において、各組成物は、異なるCRISPRヌクレアーゼもしくはCRISPRヌクレアーゼをコードする配列又は同一のCRISPRヌクレアーゼもしくはCRISPRヌクレアーゼをコードする配列を含んでもよい。2個のRNA分子を含む本発明の実施形態において、第2のRNA分子は、第1のRNA分子と同じCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成してもよいし、別のCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成してもよい。

【0047】

本発明の実施形態において、第2の二本鎖切断は、ELANE遺伝子の非コード領域内

である。本発明の実施形態において、E L A N E 遺伝子の非コード領域は、イントロン又は非翻訳領域 (U T R) から選択される。本発明の実施形態において、非コード領域は、イントロン3又はイントロン4である。本発明の実施形態において、U T R は、3' U T R である。

【0048】

本発明の実施形態において、第1のRNA分子のガイド配列部は、配列番号：1～1192の何れか1つに記載されている17～20個の近接しているヌクレオチドを含む。

【0049】

本発明の実施形態によれば、第2のRNA分子のガイド配列部は、配列番号：1～1192の何れか1つ、又は配列番号1193～2000の何れか1つに記載されている17～20個の近接しているヌクレオチドの配列にある17～20個のヌクレオチドを含む。

10

【0050】

本発明の実施形態において、第2の二本鎖切断は、E L A N E 遺伝子の非コード領域内である

【0051】

本発明の実施形態において、細胞は、rs10414837又はrs3761005でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの複合体は、E L A N E 遺伝子のイントロン4における二本鎖切断に影響する。

【0052】

本発明の実施形態において、細胞は、rs10414837又はrs3761005でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの複合体は、E L A N E 遺伝子のイントロン3における二本鎖切断に影響する。

20

【0053】

本発明の実施形態において、細胞は、rs10414837又はrs3761005でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの複合体は、E L A N E 遺伝子の3' U T R 領域における二本鎖切断に影響する。

【0054】

本発明の実施形態において、細胞は、rs1683564でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの複合体は、E L A N E 遺伝子のイントロン4における二本鎖切断に影響する。

30

【0055】

本発明の実施形態において、細胞は、rs1683564でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの複合体は、E L A N E 遺伝子のイントロン3における二本鎖切断に影響する。

【0056】

本発明の実施形態において、細胞は、rs1683564でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの複合体は、E L A N E 遺伝子の3' U T R 領域における二本鎖切断に影響する。

【0057】

いくつかの実施形態においては、細胞は、E L A N E rs10414837の多型部位でヘテロ接合性であり、17～20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子とC R I S P Rヌクレアーゼとの複合体は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、E L A N E 遺伝子の機能性対立遺伝子における二本鎖切断に影響しない。このような実施形態において、第1のRNA分子のガイド配列部は、17～20個のヌクレオチドを有して含み、配列番号：82、86、93、94、115、119、135、173、180、213、215、224、225、262、263、307、308、319、323、351、352、374、461、462、466、467、474、477、478、491、504、505、533、537、538、550、556、569、570、583、584、684、685、714、745、790、791、845、846、854、857、858、861、863、864

40

50

、 880、881、886、890、891、901、911、912、936、937、939、940、960、961、972、978、979、983、984、1018、1034、1035、1040、1086、1110、1111、1135、1144及び1145の何れか1つに記載されている17～20個の近接しているヌクレオチドの配列を含んでもよい。

【0058】

いくつかの実施形態においては、細胞は、ELANE rs3761005の多型部位でヘテロ接合性であり、17～20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子とCRISPRヌクレアーゼとの複合体は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、ELANE遺伝子の機能性対立遺伝子における二本鎖切断に影響しない。このような実施形態において、第1のRNA分子のガイド配列部は17～20個のヌクレオチドを有して含み、配列番号：26、57、65、66、70、187、188、191、206、220、221、243、245、261、275、356、357、392、417、418、431、441、442、447、488、513、514、545、546、548、598、599、604、607、608、612、613、639、648、658、659、660、680、681、742、743、755、756、759、762、763、767、771、772、773、786、787、815、816、818、819、820、831、836、849、850、870、871、898、899、907、908、1009、1010、1013、1023、1029、1030、1082、1083、4093、1099、1100、1101、1107、1108及び1182の何れか1つに記載されている17～20個の近接しているヌクレオチドの配列を含んでもよい。

【0059】

いくつかの実施形態においては、細胞は、ELANE rs1683564の多型部位でヘテロ接合性であり、17～20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子とCRISPRヌクレアーゼとの複合体は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、ELANE遺伝子の機能性対立遺伝子における二本鎖切断に影響しない。このような実施形態において、第1のRNA分子のガイド配列部は17～20個のヌクレオチドを有して含み、配列番号：52、87、122、164、175、199、214、290、326、345、346、373、404、412、436、437、451、452、483、484、517、520、525、617、618、621、641、661、676、722、736、806、855、856、878、879、888、889、896、903、905、913、914、929、933、934、935、982、998、1021、1022、1026、1046、1047、1053、1097、1121、1122、1124、1126、1127、1131、1134、1175、1176、1183及び1190の何れか1つに記載されている17～20個の近接しているヌクレオチドの配列を含んでもよい。

【0060】

本発明の実施形態は、重症先天性好中球減少症(SCN)又はCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する細胞を、SCN又はCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する及び/又はSCN又はCyNに苦しむ対象から取得することを含み、対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である。

【0061】

本発明の実施形態は、第1にSCN又はCyNに関連しているELANE遺伝子変異を

10

20

30

40

50

有する及び/又はS C N又はC y Nに苦しむ対象を選択することであって、対象は、r s 1 0 4 1 4 8 3 7、r s 3 7 6 1 0 0 5、r s 1 6 8 3 5 6 4、r s 9 7 4 9 2 7 4、r s 7 4 0 0 2 1、r s 2 0 1 0 4 8 0 2 9、r s 1 9 9 7 2 0 9 5 2、r s 2 8 5 9 1 2 2 9、r s 7 1 3 3 5 2 7 6、r s 5 8 0 8 2 1 7 7、r s 3 8 2 6 9 4 6、r s 1 0 4 1 3 8 8 9、r s 7 6 1 4 8 1 9 4 4、r s 3 7 6 1 0 0 8、r s 1 0 4 0 9 4 7 4、r s 3 7 6 1 0 0 7、r s 1 7 2 1 6 6 4 9、r s 1 0 4 6 9 3 2 7、r s 8 1 0 7 0 9 5、r s 1 0 4 2 4 4 7 0及びr s 7 8 3 0 2 8 5 4から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であること、及び対象から細胞を取得することを含む。

【0062】

本発明の実施形態は、細胞を対象から動員によって及び/又はアフェレシスによって取得することを含む。

10

【0063】

本発明の実施形態は、細胞を対象から骨髄穿刺法によって取得することを含む。

【0064】

本発明の実施形態において、組成物を細胞に導入する前に細胞を予備刺激する。

【0065】

本発明の実施形態は、細胞を培養増殖して細胞群を取得することを含む。

【0066】

本発明の実施形態において、細胞を、幹細胞因子(S C F)、I L - 3及びG M - C S Fのうちの一つ又は複数とともに培養する。

20

【0067】

本発明の実施形態において、細胞を少なくとも一つのサイトカインとともに培養する。

【0068】

本発明の実施形態において、少なくとも一つのサイトカインは、組換えヒトサイトカインである。

【0069】

本発明の実施形態において、細胞は、複数の細胞の中の一つであり、第1のR N A分子又は第1及び第2のR N A分子の両方を含む組成物を、複数の細胞の中の少なくとも細胞及び他の細胞に導入し、そして複数の細胞の中の少なくとも細胞及び他の細胞中のE L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化し、それにより複数の改変細胞を取得する。

30

【0070】

本発明の実施形態において、第1のR N A分子を含む組成物を導入すること又は第2のR N A分子の導入は、細胞又は複数の細胞のエレクトロポレーションを含む。

【0071】

本発明の実施形態は、本発明の方法によって取得される改変細胞を提供する。

【0072】

本発明の実施形態においては、改変細胞をさらに培養増殖する。

【0073】

本発明の実施形態において、改変細胞は、生着することができる。

【0074】

本発明の実施形態において、改変細胞は、患者に注入すると長期生着することができ、注入後少なくとも12か月間で、好ましくは少なくとも24か月間で、そしてさらに一層好ましくは注入後少なくとも30か月間で分化造血細胞を生じる。さらなる実施形態において、改変細胞は、自家対象に注入すると長期生着することができる。さらなる実施形態において、改変細胞は、骨髄破壊せずに対象に注入しても長期生着することができる。本発明の実施形態において、改変細胞は、ヒトである対象に生着すると、長期生着を提供する十分な数で対象に送達される。

40

【0075】

本発明の実施形態において、改変細胞又は改変細胞群は、子孫細胞を生じることができる。

50

【0076】

本発明の実施形態において、改変細胞又は改変細胞群は、生着後に子孫細胞を生じることができる。

【0077】

本発明の実施形態において、改変細胞又は改変細胞群は、自家移植後に子孫細胞を生じることができる。

【0078】

本発明の実施形態において、改変細胞又は改変細胞群は、生着後少なくとも12か月間又は少なくとも24か月間子孫細胞を生じることができる。

【0079】

1つの実施形態において、細胞又は細胞群は、幹細胞である。1つの実施形態において、細胞は、胚性幹細胞である。1つの実施形態において、幹細胞は、造血幹細胞/前駆細胞(HSPC)である。

【0080】

本発明の実施形態において、改変細胞又は改変細胞群は、CD34+造血幹細胞である。

【0081】

本発明の実施形態において、改変細胞又は改変細胞群は、骨髓細胞又は末梢単核細胞(PMC)である。

【0082】

本発明の実施形態は、ELANE遺伝子の1つの対立遺伝子の少なくとも一部を欠いている改変細胞を提供する。

【0083】

本発明の実施形態において、改変細胞は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である細胞から改変された。

【0084】

本発明の実施形態は、改変細胞及び薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

【0085】

本発明の実施形態は、本発明の細胞と薬学的に許容される担体とを混合することを含む、組成物のインビトロ又はエキスピボ調製方法を提供する。

【0086】

本発明の実施形態は、インビトロ又はエキスピボで改変細胞を含む組成物を調製する方法であって、方法は、

a) SCN又はCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する及び/又はSCN又はCyNに苦しむ対象から取得した複数の細胞からHSPCを単離することであって、対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である、単離すること、及び対象から細胞を取得すること、

b) 1つ又は複数の細胞におけるELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するよう、ステップ(a)の細胞に、

10

20

30

40

50

CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び
17～20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む
組成物を導入することであって、

CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、1つ又は複数の細胞にお
けるELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、

任意選択で、細胞にCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド
配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、第2のRNA分子及びCRIS
PRヌクレアーゼの複合体は、1つ又は複数の細胞におけるELANE遺伝子における第
2の二本鎖切断に影響し、それにより改変細胞を取得する、導入すること、任意選択で

c)ステップ(b)の改変細胞を培養増殖することであって、改変細胞は生着するこ
とができ、生着後に子孫細胞を生じることができる、培養増殖すること、を含む、方法を提
供する。

10

【0087】

本発明の実施形態は、

a) SCN又はCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する及び/又はSCN
又はCyNに苦しむ対象から取得した細胞からHSPCを単離することであって、対象は
、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs974927
4、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs285
91229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs
10413889、rs761481944、rs3761008、rs1040947
4、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107
095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ
又は複数の多型部位でヘテロ接合性である、単離すること、

20

b) 1つ又は複数の細胞におけるELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するよ
う、ステップ(a)の細胞に、

CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び
17～20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む
組成物を導入することであって、

CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、1つ又は複数の細胞にお
けるELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、

30

任意選択で、細胞にCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイ
ド配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、第2のRNA分子及びCRIS
PRヌクレアーゼの複合体は、1つ又は複数の細胞におけるELANE遺伝子における
第2の二本鎖切断に影響し、

それにより改変細胞を取得する、導入すること、任意選択で

c)ステップ(b)の細胞を培養増殖することであって、改変細胞は生着することがで
き、生着後に子孫細胞を生じることができる、培養増殖すること、及び

d)対象のSCN又はCyNを治療するために対象にステップ(b)又はステップ(c)
の細胞を投与すること、を含む方法によってインビトロで調製される組成物の使用を提
供する。

40

【0088】

本発明の実施形態は、治療有効量の本発明の改変細胞、組成物又は方法によって調製さ
れた組成物を投与することを含む、SCN又はCyNで苦しんでいる対象の治療方法を提
供する。

【0089】

本発明の実施形態は、SCN又はCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する治
療を必要とする対象におけるSCN又はCyNの治療方法であって、対象は、rs104
14837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs74
0021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、
rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs104138

50

89、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であり、方法は、

a) 対象から取得した細胞からHSPCを単離すること、

b) 1つ又は複数の細胞におけるELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するよう、ステップ(a)の細胞に、

CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組成物を導入することであって、

CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、1つ又は複数の細胞におけるELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、

任意選択で、細胞にCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体は、1つ又は複数の細胞におけるELANE遺伝子における第2の二本鎖切断に影響し、

それにより改変細胞を取得する、導入すること、任意選択で

c) ステップ(b)の細胞を培養増殖することであって、改変細胞は生着することができる、生着後に子孫細胞を生じることができる、培養増殖すること、及び

d) 対象にステップ(b)又はステップ(c)の細胞を投与し、それにより対象のSCN又はCyNを治療すること、を含む、方法を提供する。

【0090】

本発明の実施形態は、SCN又はCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する治療を必要とする対象におけるSCN又はCyNの治療方法であって、対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であり、方法は、

対象に自家改変細胞又は自家改変細胞の子孫を投与することであって、自家改変細胞は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子が二本鎖切断するように改変され、

上記二本鎖切断は、CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列及び第1のRNA分子を含む組成物を細胞に導入するから生じ、CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、細胞におけるELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するよう、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響する、投与すること、を含み、

それにより対象のSCN又はCyNを治療する、方法を提供する。

【0091】

本発明の実施形態は、SCN又はCyNと診断された対象のプールから治療のための対象を選択する方法であって、方法は、

a) 対象のプールにおける各対象から細胞を取得するステップ、

b) 各対象の細胞をSCN又はCyNに関連するELANE遺伝子変異を求めて選別し、SCN又はCyNに関連するELANE遺伝子変異を有する対象のみを選択するステップ、

c) ステップ(b)において選択された対象の細胞を配列決定することによりrs10414837、rs3761005、rs1683564から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でのヘテロ接合性を選別するステップ、そして

d) 治療のために1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である細胞を有する対象のみ

10

20

30

40

50

を選択するステップ、を含む方法を提供する。

【0092】

本発明の実施形態は、

e) 対象の骨髄から末梢血液の吸引によるか又は動員及びアフエレシスによるかのいずれかによりHSPC細胞を取得すること、

f) ステップ(e)のHSPC細胞に

1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼ又は1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼをコードする配列

ELANE遺伝子の変異対立遺伝子に存在する1つ又は複数の多型部位のヘテロ接合性対立遺伝子のヌクレオチド塩基を標的とする配列番号：1～1192のいずれか1つに記載されている17～20個の近接しているヌクレオチドの配列中の17～20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、及び

ELANE遺伝子のイントロン3、イントロン4又は3'UTRにおける配列を標的とするガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、

第1のRNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体は、1つ又は複数のHSPC細胞におけるELANE遺伝子の変異対立遺伝子における第1の二本鎖切断に影響し、第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体は、第1のRNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体が第1の二本鎖切断することに影響した1つ又は複数のHSPC細胞におけるELANE遺伝子の両対立遺伝子のイントロン3、イントロン4又は3'UTRにおける第2の二本鎖切断に影響し、それにより改変細胞を取得する、導入すること、

g) 対象にステップ(f)の改変細胞を投与し、それにより対象のSCN又はCyNを治療すること、を含む、選択された対象におけるSCN又はCyNを治療するステップをさらに含む。

【0093】

本発明の実施形態は、配列番号：1～1192のいずれか1つに記載されている17～20個の近接しているヌクレオチドの配列中の17～20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含むRNA分子を提供する。

【0094】

本発明の実施形態は、ガイド配列部を含む第2のRNA分子をさらに含む。

【0095】

本発明の実施形態において、第2のRNA分子は、ELANE遺伝子の非コード領域を標的とする。

【0096】

本発明の実施形態において、第2のRNA分子のガイド配列部のヌクレオチド配列は、第1のRNA分子のガイド配列部の配列とは異なるヌクレオチド配列である。

【0097】

本発明の実施形態において、第1のRNA分子は、CRISPRヌクレアーゼに結合する配列を有する部分をさらに含む。本発明の実施形態において、第2のRNA分子は、CRISPRヌクレアーゼに結合する配列を有する部分をさらに含む。

【0098】

本発明の実施形態において、CRISPRヌクレアーゼに結合する配列は、tracrRNA配列である。

【0099】

本発明の実施形態において、第1のRNA分子は、tracrメイト配列を有する部分をさらに含む。本発明の実施形態において、第2のRNA分子は、tracrメイト配列を有する部分をさらに含む。

【0100】

本発明の実施形態において、第1のRNA分子は、1つ又は複数のリンカー部分をさらに含む。本発明の実施形態において、第2のRNA分子は、1つ又は複数のリンカー部分をさらに含む。

10

20

30

40

50

【0101】

本発明の実施形態において、第1のRNA分子は、長さが300ヌクレオチドまでである。本発明の実施形態において、第2のRNA分子は、長さが300ヌクレオチドまでである。

【0102】

本発明の実施形態において、組成物は、1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼ又は1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼをコードする配列をさらに含む。本発明の実施形態において、組成物は、1つ又は複数のtracrRNA分子又は1つ又は複数のtracrRNA分子をコードする配列をさらに含む。

【0103】

本発明の実施形態は、細胞の、変異ELANE対立遺伝子を不活性化するための方法であって、方法は、細胞に本発明のRNA分子又は組成物を送達することを含む、方法を提供する。

【0104】

本発明の実施形態において、1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼ又は1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼをコードする配列及びRNA分子又は複数のRNA分子を、対象及び/又は細胞に実質的に同時に又は異なる時間に送達する。

【0105】

本発明の実施形態において、tracrRNA分子又は1つ又は複数のtracrRNA分子をコードする配列及びRNA分子又は複数のRNA分子を、対象及び/又は細胞に実質的に同時に又は異なる時間に送達する。

【0106】

本発明の実施形態において、方法は、変異対立遺伝子から疾患発症性の変異を含むエキソンを除去することを含み、第1のRNA分子又は第1及び第2のRNA分子は、エキソンのエキソン全体又は部分に隣接している領域を標的とする。

【0107】

本発明の実施形態において、方法は、遺伝子のオープンリーディングフレーム全体、複数のエキソンを除去すること、又は遺伝子全体を除去することを含む。

【0108】

本発明の実施形態において、第1のRNA分子又は第1及び第2のRNA分子は、変異対立遺伝子のエキソン及びイントロンの間の選択的スプライシングシグナル配列を標的とする。

【0109】

本発明の実施形態において、第2のRNA分子は、変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子の両方に存在する配列を標的とする。

【0110】

本発明の実施形態において、第2のRNA分子が、イントロンを標的とする。

【0111】

本発明の実施形態において、方法は、エラープローン非相同末端結合(NHEJ)機構により変異対立遺伝子に挿入又は除去を受けさせ、変異対立遺伝子の配列にフレームシフトを生じさせることを生じる。

【0112】

本発明の実施形態において、フレームシフトは、変異対立遺伝子の不活性化又はノックアウトを生じる。

【0113】

本発明の実施形態において、フレームシフトにより変異対立遺伝子中に早期の終止コドンが作成されるか、フレームシフトにより変異対立遺伝子の転写物のナンセンス変異依存mRNA分解機構が生じる。

【0114】

10

20

30

40

50

本発明の実施形態において、不活性化又は治療により変異対立遺伝子によってコードされる切断型タンパク質及び機能性対立遺伝子によってコードされる機能性タンパク質が生じる。

【0115】

本発明の実施形態において、細胞又は対象が、rs10414837又はrs3761005でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体が、ELANE遺伝子のイントロン4における二本鎖切断に影響する。

【0116】

本発明の実施形態において、細胞又は対象が、rs10414837又はrs3761005でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体が、ELANE遺伝子のイントロン3における二本鎖切断に影響する。

10

【0117】

本発明の実施形態において、細胞又は対象が、rs10414837又はrs3761005でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体が、ELANE遺伝子の3'UTR領域における二本鎖切断に影響する。

【0118】

本発明の実施形態において、細胞又は対象が、rs1683564でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体が、ELANE遺伝子のイントロン4における二本鎖切断に影響する。

【0119】

本発明の実施形態において、細胞又は対象が、rs1683564でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体が、ELANE遺伝子のイントロン3における二本鎖切断に影響する。

20

【0120】

本発明の実施形態において、細胞又は対象が、rs1683564でヘテロ接合性であり、第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体が、ELANE遺伝子の3'UTR領域における二本鎖切断に影響する。

【0121】

本発明の実施形態は、細胞の、変異ELANE対立遺伝子を不活性化するための、本発明のRNA分子、本発明の組成物又は本発明の方法により調製された組成物の使用を提供する。

30

【0122】

本発明の実施形態は、細胞の、変異ELANE対立遺伝子を不活性化する使用のための、本発明のRNA分子、本発明の組成物又は本発明の方法により調製された組成物を含む薬物であって、細胞に本発明のRNA分子、本発明の組成物又は本発明の方法により調製された組成物を送達することにより薬物を投与する、薬物を提供する。

【0123】

本発明の実施形態は、SCN又はCyNを有する又は有するリスクがある対象におけるSCN又はCyNを治療、寛解又は防止するための、本発明の方法、本発明の改変細胞、本発明の組成物又は本発明の方法により調製された組成物、又は本発明のRNA分子の使用を提供する。

40

【0124】

本発明の実施形態は、SCN又はCyNを治療、寛解又は防止する使用のための、本発明のRNA分子、本発明の組成物、本発明の方法により調製された組成物又は本発明の改変細胞を含む薬物であって、SCN又はCyNを有する又は有するリスクがある対象に、本発明のRNA分子、本発明の組成物、本発明の方法により調製された組成物又は本発明の改変細胞を送達することにより薬物を投与する、薬物を提供する。

【0125】

本発明の実施形態は、本発明のRNA分子、CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び/又はtracrRNA分子又はtracrRN

50

A分子をコードする配列、及び細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化するために、RNA分子、C R I S P Rヌクレアーゼ又はC R I S P Rヌクレアーゼをコードする配列、及び/又はt r a c r RNA又はt r a c r RNA分子をコードする配列を細胞に送達するための説明書を備える、細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化するためのキットを提供する。

【0126】

本発明の実施形態は、本発明のRNA分子、C R I S P Rヌクレアーゼ又はC R I S P Rヌクレアーゼをコードする配列、及び/又はt r a c r RNA分子又はt r a c r RNA分子をコードする配列、及びS C N又はC y Nを治療するようRNA分子、C R I S P Rヌクレアーゼ又はC R I S P Rヌクレアーゼをコードする配列、及び/又はt r a c r RNA又はt r a c r RNA分子をコードする配列をS C N又はC y Nを有する又は有するリスクがある対象に送達するための説明書を備える、対象のS C N又はC y Nを治療するためのキットを提供する。

10

【0127】

本発明の実施形態は、本発明の組成物、本発明の方法により調製された組成物、又は本発明の改変細胞、及び細胞のE L A N E遺伝子を不活性化するよう組成物を細胞に送達するための説明書を備える、細胞の変異E L A N E対立遺伝子を不活性化するためのキットを提供する。

【0128】

本発明の実施形態は、本発明の組成物、本発明の方法により調製された組成物、又は本発明の改変細胞、及びS C N又はC y Nを治療するよう本発明の組成物、本発明の方法により調製された組成物、又は本発明の改変細胞をS C N又はC y Nを有する又は有するリスクがある対象に送達するための説明書を備える、対象のS C N又はC y Nを治療するためのキットを提供する。

20

【0129】

定義

特に規定がない限り、本明細書において使用される技術的及び/又は科学的用語は、本発明が属する技術分野における当業者の一人によって一般的に理解されるのと同一の意味を有する。本明細書において記載されるものと類似する又は同等の方法及び材料を本発明の実施形態の実施又は試験において使用することができるがも、例示的な方法及び/又は材料は以下に記載されるものである。矛盾のある場合、定義を含む、特許明細書が支配するであろう。さらに、材料、方法及び実施例は例証にすぎず、必ずしも制限することを意図するものではない。

30

【0130】

用語「a」及び「an」は、上で、そして本明細書の他の場所で使用するとき、列挙される構成要素の「1つ又は複数」を指すと理解されるべきである。単数形の使用には、特に他に明言されない限り複数形も含まれることは当業者の一人にとって明らかであろう。したがって、用語「a」、「an」及び「少なくとも1つの」は、本出願において交換可能に使用される。

【0131】

本教示をより良く理解することを目的として、そして本教示の範囲を決して制限せず、他に示されない限り、本明細書及び請求項において使用される量、割合又は比率、及び他の数値を表現する全ての数字は、用語「訳」によって全ての事例において修正されるとして理解されるべきである。したがって、特にそれとは反対の指示がない限り、以下の明細書及び添付の特許請求項に記載されている数値パラメーターは、取得しようとする所望の特性に依存して変動することができる近似である。最低限各数値パラメーターは、報告された有効数字の数を考慮して、そして通常の端数処理方法を適用することにより少なくとも解釈されるべきである。

40

【0132】

特に明言されない限り、本発明の実施形態の特徴又は特徴群特有の条件又は関係を修正

50

する「実質的に」及び「およそ」などの形容詞は、この条件又は特質が、それが意図される適用にとって、実施形態の工程として許容できる範囲内と定義されるという意味と理解される。特に他に指示がない限り、本明細書及び請求項における単語「or」は、排他的なorよりむしろ包括的な「or」とみなされ、それが結合する項目の少なくとも1つ又は任意の組み合わせを示す。

【0133】

本出願の記述及び請求項において、「含む(comprise)」、「含む(include)」及び「有する」の動詞並びにその活用形は、動詞の対象又は対象群が必ずしも構成要素、要素又は動詞の対象若しくは対象群の部分の完全な一覧表ではないことを示すよう使用される。本明細書において使用される他の用語は、当該技術分野において周知の意味によって定義される。

10

【0134】

本明細書において使用するとき、用語「ヘテロ接合一塩基多型」又は「SNP」は、集団内の対である染色体間で異なるゲノム中の単一のヌクレオチドの位置を指す。本明細書において使用するとき、この位置で最も一般的な又は最も普及しているヌクレオチド塩基は、参照(REF)、野生型(WT)、共通又は主要形と呼ばれる。この位置であまり普及していないヌクレオチド塩基は、代替(ALT)、少数、希少又はバリエーション形と呼ばれる。

【0135】

RNA分子の「ガイド配列部」は、特異的な標的DNA配列にハイブリッド形成できるヌクレオチド配列を指し、例えば、ガイド配列部は、ガイド配列部の長さによって標的とされるDNA配列と完全に相補的であるヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態においては、ガイド配列部は、長さが17、18、19、20、21、22、23又は24ヌクレオチド、又は長さがおおよそ17~24、18~22、19~22、18~20又は17~20ヌクレオチドである。ガイド配列部の全長は、ガイド配列部の長さによって標的とされるDNA配列と完全に相補的である。ガイド配列部は、ガイド配列部がCRISPR複合体のDNA標的部として働くCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成することができるRNA分子の一部であってもよい。ガイド配列部を有するDNA分子がCRISPR分子と同時に存在すると、RNA分子は、CRISPRヌクレアーゼを特異的な標的DNA配列に対して標的とすることができる。各可能性は、別々の実施形態を表す。RNA分子は、いかなる望みの配列を標的とするようカスタム設計することができる。

20

30

【0136】

用語「標的とする」は本明細書において使用するとき、RNA分子が標的とされるヌクレオチド配列を有する核酸に優先的にハイブリッドを形成するガイド配列部を指す。用語「標的とする」は、標的とされるヌクレオチド配列を有する核酸に優先的にハイブリッド形成するが、標的上のハイブリッド形成に加えて意図していないオフターゲットのハイブリッド形成も起きるかもしれないような、可変的なハイブリッド形成効率を包含すると理解される。RNA分子がある配列を標的とする場合、RNA分子とCRISPRヌクレアーゼ分子の複合体がヌクレアーゼ活性のためにこの配列を標的とするとして理解される。

【0137】

複数の細胞に存在するDNA配列を標的とするという文脈においては、この標的とすることは、RNA分子のガイド配列部が1つ又は複数の細胞の配列とハイブリッド形成することを包含し、またRNA分子が複数の細胞のうち全てより少ない細胞の標的配列とハイブリッド形成することを包含すると理解される。したがって、RNA分子が複数の細胞の配列を標的とする場合、RNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体が1つ又は複数の細胞の標的配列とハイブリッド形成すると理解され、また全てより少ない細胞の標的配列とハイブリッド形成してもよいと理解される。したがって、RNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体が1つ又は複数の細胞の標的配列とハイブリッド形成するのに関連して二本鎖切断を導入し、また全てより少ない細胞の標的配列とハイブリッド形成するのに関連して二本鎖切断を導入してもよい。本明細書において使用するとき、用語「改変細

40

50

胞」は、標的配列とのハイブリッド形成、すなわち標的上のハイブリッド形成の結果としてRNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体により二本鎖切断が引き起こされた細胞を指す。

【0138】

本発明の実施形態において、RNAガイド分子は、変異対立遺伝子の多型部位に存在するヌクレオチド塩基に基づいて変異対立遺伝子を標的としてもよい。

【0139】

本発明の実施形態において、RNA分子は、配列番号：1～1192のいずれか1つに記載されている、又は以下のグループ配列番号：6、75、76、252、253、287、295、296、311、536、592、595、596、597、695、729、737、812、839、915、947、1048、1049、1070、1071、1169に記載されている、又は以下のグループ配列番号：6、75、76、93、94、97、98、148、149、171、173、180、182、183、184、187、188、213、232、234、249、252、253、264、272、287、291、295、296、305、306、307、308、311、326、333、334、337、338、339、340、351、352、358、359、378、379、385、388、399、408、410、419、420、426、427、428、429、430、436、437、449、450、465、468、476、477、478、480、495、497、499、500、508、511、521、522、523、524、529、530、532、536、542、545、546、564、565、566、573、574、583、584、591、592、595、596、597、598、599、601、602、604、612、613、616、622、623、634、644、645、658、659、661、670、671、678、680、681、684、685、688、689、694、695、714、715、716、722、723、724、729、736、737、739、740、745、755、756、760、761、769、770、771、772、775、776、786、787、806、809、812、818、819、821、822、826、829、830、833、834、839、845、846、861、862、874、875、876、877、884、888、889、890、891、893、894、911、912、913、914、915、925、928、930、931、939、940、942、946、947、948、949、950、957、972、974、982、994、998、1006、1007、1008、1021、1022、1026、1027、1028、1031、1032、1034、1035、1039、1046、1047、1048、1049、1057、1070、1071、1072、1074、1075、1076、1079、1084、1090、1091、1093、1094、1095、1112、1113、1116、1117、1118、1119、1121、1122、1124、1140、1168、1169、1170、1171、1179に記載されている、又は以下のグループ配列番号：6、10、13、14、19、21、22、23、24、25、26、29、30、34、35、36、39、42、43、44、45、46、47、48、49、50、52、53、54、55、57、58、61、62、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、82、86、87、88、89、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、107、108、109、115、119、122、123、124、125、126、127、128、130、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、148、149、150、152、153、155、156、158、159、160、161、162、163、164、167、168、169、170、171、172、173、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、187、188、189、190、191、192、195、196、198、199、201、203、206、209、211、212、2

10

20

30

40

50

1 3、 2 1 4、 2 1 5、 2 1 6、 2 1 7、 2 1 9、 2 2 0、 2 2 1、 2 2 3、 2 2 4、 2
 2 5、 2 2 6、 2 2 7、 2 3 2、 2 3 3、 2 3 4、 2 3 6、 2 3 7、 2 3 8、 2 4 0、 2
 4 1、 2 4 2、 2 4 3、 2 4 4、 2 4 5、 2 4 6、 2 4 7、 2 4 8、 2 4 9、 2 5 0、 2
 5 1、 2 5 2、 2 5 3、 2 5 4、 2 5 5、 2 5 6、 2 6 1、 2 6 2、 2 6 3、 2 6 4、 2
 6 5、 2 6 6、 2 6 7、 2 6 9、 2 7 0、 2 7 1、 2 7 2、 2 7 3、 2 7 4、 2 7 5、 2
 7 6、 2 7 7、 2 8 1、 2 8 2、 2 8 5、 2 8 6、 2 8 7、 2 9 0、 2 9 1、 2 9 2、 2
 9 3、 2 9 4、 2 9 5、 2 9 6、 3 0 2、 3 0 3、 3 0 5、 3 0 6、 3 0 7、 3 0 8、 3
 1 0、 3 1 1、 3 1 4、 3 1 9、 3 2 3、 3 2 6、 3 2 7、 3 2 8、 3 2 9、 3 3 1、 3
 3 2、 3 3 3、 3 3 4、 3 3 5、 3 3 6、 3 3 7、 3 3 8、 3 3 9、 3 4 0、 3 4 1、 3
 4 3、 3 4 4、 3 4 5、 3 4 6、 3 4 9、 3 5 0、 3 5 1、 3 5 2、 3 5 3、 3 5 4、 3
 5 6、 3 5 7、 3 5 8、 3 5 9、 3 6 0、 3 6 3、 3 6 4、 3 6 6、 3 7 0、 3 7 1、 3
 7 2、 3 7 3、 3 7 4、 3 7 5、 3 7 6、 3 7 7、 3 7 8、 3 7 9、 3 8 0、 3 8 1、 3
 8 2、 3 8 5、 3 8 6、 3 8 7、 3 8 8、 3 8 9、 3 9 0、 3 9 1、 3 9 2、 3 9 3、 3
 9 4、 3 9 5、 3 9 6、 3 9 7、 3 9 9、 4 0 0、 4 0 4、 4 0 5、 4 0 6、 4 0 7、 4
 0 8、 4 1 0、 4 1 1、 4 1 2、 4 1 5、 4 1 7、 4 1 8、 4 1 9、 4 2 0、 4 2 2、 4
 2 3、 4 2 4、 4 2 5、 4 2 6、 4 2 7、 4 2 8、 4 2 9、 4 3 0、 4 3 1、 4 3 2、 4
 3 3、 4 3 5、 4 3 6、 4 3 7、 4 4 0、 4 4 1、 4 4 2、 4 4 3、 4 4 4、 4 4 5、 4
 4 6、 4 4 7、 4 4 9、 4 5 0、 4 5 1、 4 5 2、 4 5 4、 4 5 5、 4 5 6、 4 5 7、 4
 6 0、 4 6 1、 4 6 2、 4 6 4、 4 6 5、 4 6 6、 4 6 7、 4 6 8、 4 6 9、 4 7 0、 4
 7 1、 4 7 4、 4 7 5、 4 7 6、 4 7 7、 4 7 8、 4 7 9、 4 8 0、 4 8 3、 4 8 4、 4
 8 5、 4 8 6、 4 8 8、 4 8 9、 4 9 1、 4 9 2、 4 9 3、 4 9 4、 4 9 5、 4 9 6、 4
 9 7、 4 9 8、 4 9 9、 5 0 0、 5 0 1、 5 0 2、 5 0 4、 5 0 5、 5 0 6、 5 0 8、 5
 0 9、 5 1 0、 5 1 1、 5 1 3、 5 1 4、 5 1 7、 5 1 8、 5 1 9、 5 2 0、 5 2 1、 5
 2 2、 5 2 3、 5 2 4、 5 2 5、 5 2 6、 5 2 7、 5 2 8、 5 2 9、 5 3 0、 5 3 1、 5
 3 2、 5 3 3、 5 3 6、 5 3 7、 5 3 8、 5 3 9、 5 4 0、 5 4 1、 5 4 2、 5 4 3、 5
 4 4、 5 4 5、 5 4 6、 5 4 7、 5 4 8、 5 4 9、 5 5 0、 5 5 2、 5 5 3、 5 5 4、 5
 5 5、 5 5 6、 5 5 7、 5 5 8、 5 5 9、 5 6 0、 5 6 1、 5 6 2、 5 6 3、 5 6 4、 5
 6 5、 5 6 6、 5 6 7、 5 6 8、 5 6 9、 5 7 0、 5 7 1、 5 7 3、 5 7 4、 5 7 7、 5
 7 9、 5 8 0、 5 8 2、 5 8 3、 5 8 4、 5 8 6、 5 8 7、 5 8 8、 5 9 0、 5 9 1、 5
 9 2、 5 9 3、 5 9 5、 5 9 6、 5 9 7、 5 9 8、 5 9 9、 6 0 0、 6 0 1、 6 0 2、 6
 0 4、 6 0 5、 6 0 6、 6 0 7、 6 0 8、 6 0 9、 6 1 0、 6 1 2、 6 1 3、 6 1 4、 6
 1 5、 6 1 6、 6 1 7、 6 1 8、 6 1 9、 6 2 0、 6 2 1、 6 2 2、 6 2 3、 6 2 4、 6
 2 5、 6 2 8、 6 2 9、 6 3 0、 6 3 3、 6 3 4、 6 3 5、 6 3 6、 6 3 7、 6 3 8、 6
 3 9、 6 4 0、 6 4 1、 6 4 4、 6 4 5、 6 4 8、 6 5 0、 6 5 1、 6 5 2、 6 5 3、 6
 5 4、 6 5 5、 6 5 8、 6 5 9、 6 6 0、 6 6 1、 6 6 3、 6 6 4、 6 6 5、 6 6 7、 6
 7 0、 6 7 1、 6 7 2、 6 7 3、 6 7 5、 6 7 6、 6 7 8、 6 8 0、 6 8 1、 6 8 3、 6
 8 4、 6 8 5、 6 8 6、 6 8 8、 6 8 9、 6 9 0、 6 9 1、 6 9 2、 6 9 4、 6 9 5、 6
 9 8、 7 0 0、 7 0 1、 7 0 2、 7 0 3、 7 0 4、 7 0 5、 7 0 6、 7 0 7、 7 0 8、 7
 0 9、 7 1 2、 7 1 3、 7 1 4、 7 1 5、 7 1 6、 7 1 8、 7 1 9、 7 2 0、 7 2 2、 7
 2 3、 7 2 4、 7 2 7、 7 2 8、 7 2 9、 7 3 0、 7 3 1、 7 3 2、 7 3 3、 7 3 4、 7
 3 5、 7 3 6、 7 3 7、 7 3 8、 7 3 9、 7 4 0、 7 4 2、 7 4 3、 7 4 4、 7 4 5、 7
 4 6、 7 4 7、 7 4 8、 7 4 9、 7 5 3、 7 5 4、 7 5 5、 7 5 6、 7 5 7、 7 5 8、 7
 5 9、 7 6 0、 7 6 1、 7 6 2、 7 6 3、 7 6 4、 7 6 7、 7 6 9、 7 7 0、 7 7 1、 7
 7 2、 7 7 3、 7 7 5、 7 7 6、 7 7 8、 7 7 9、 7 8 0、 7 8 1、 7 8 6、 7 8 7、 7
 8 8、 7 8 9、 7 9 0、 7 9 1、 7 9 2、 7 9 4、 7 9 5、 7 9 8、 8 0 0、 8 0 1、 8
 0 5、 8 0 6、 8 0 7、 8 0 8、 8 0 9、 8 1 1、 8 1 2、 8 1 3、 8 1 4、 8 1 5、 8
 1 6、 8 1 8、 8 1 9、 8 2 0、 8 2 1、 8 2 2、 8 2 3、 8 2 6、 8 2 9、 8 3 0、 8
 3 1、 8 3 2、 8 3 3、 8 3 4、 8 3 5、 8 3 6、 8 3 7、 8 3 8、 8 3 9、 8 4 3、 8
 4 4、 8 4 5、 8 4 6、 8 4 9、 8 5 0、 8 5 2、 8 5 3、 8 5 4、 8 5 5、 8 5 6、 8
 5 7、 8 5 8、 8 6 1、 8 6 2、 8 6 3、 8 6 4、 8 6 5、 8 6 6、 8 6 7、 8 6 8、 8

10

20

30

40

50

7 0、8 7 1、8 7 2、8 7 4、8 7 5、8 7 6、8 7 7、8 7 8、8 7 9、8 8 0、8
 8 1、8 8 2、8 8 3、8 8 4、8 8 6、8 8 7、8 8 8、8 8 9、8 9 0、8 9 1、8
 9 3、8 9 4、8 9 5、8 9 6、8 9 7、8 9 8、8 9 9、9 0 1、9 0 2、9 0 3、9
 0 5、9 0 6、9 0 7、9 0 8、9 0 9、9 1 0、9 1 1、9 1 2、9 1 3、9 1 4、9
 1 5、9 1 6、9 1 7、9 2 0、9 2 1、9 2 5、9 2 6、9 2 7、9 2 8、9 2 9、9
 3 0、9 3 1、9 3 2、9 3 3、9 3 4、9 3 5、9 3 6、9 3 7、9 3 9、9 4 0、9
 4 2、9 4 3、9 4 5、9 4 6、9 4 7、9 4 8、9 4 9、9 5 0、9 5 1、9 5 2、9
 5 3、9 5 4、9 5 5、9 5 6、9 5 7、9 5 8、9 6 0、9 6 1、9 6 2、9 6 3、9
 6 4、9 6 5、9 6 6、9 6 7、9 6 8、9 6 9、9 7 2、9 7 4、9 7 5、9 7 6、9
 7 8、9 7 9、9 8 2、9 8 3、9 8 4、9 8 8、9 8 9、9 9 0、9 9 1、9 9 2、9
 9 3、9 9 4、9 9 6、9 9 7、9 9 8、1 0 0 1、1 0 0 2、1 0 0 3、1 0 0 4、1
 0 0 5、1 0 0 6、1 0 0 7、1 0 0 8、1 0 0 9、1 0 1 0、1 0 1 1、1 0 1 2、1
 0 1 3、1 0 1 4、1 0 1 5、1 0 1 7、1 0 1 8、1 0 1 9、1 0 2 0、1 0 2 1、1
 0 2 2、1 0 2 3、1 0 2 4、1 0 2 6、1 0 2 7、1 0 2 8、1 0 2 9、1 0 3 0、1
 0 3 1、1 0 3 2、1 0 3 3、1 0 3 4、1 0 3 5、1 0 3 6、1 0 3 7、1 0 3 8、1
 0 3 9、1 0 4 0、1 0 4 2、1 0 4 3、1 0 4 4、1 0 4 5、1 0 4 6、1 0 4 7、1
 0 4 8、1 0 4 9、1 0 5 0、1 0 5 1、1 0 5 2、1 0 5 3、1 0 5 4、1 0 5 5、1
 0 5 6、1 0 5 7、1 0 5 8、1 0 6 1、1 0 6 2、1 0 6 3、1 0 6 4、1 0 6 9、1
 0 7 0、1 0 7 1、1 0 7 2、1 0 7 3、1 0 7 4、1 0 7 5、1 0 7 6、1 0 7 7、1
 0 7 8、1 0 7 9、1 0 8 0、1 0 8 1、1 0 8 2、1 0 8 3、1 0 8 4、1 0 8 6、1
 0 9 0、1 0 9 1、1 0 9 3、1 0 9 4、1 0 9 5、1 0 9 7、1 0 9 9、1 1 0 0、1
 1 0 1、1 1 0 2、1 1 0 3、1 1 0 4、1 1 0 5、1 1 0 7、1 1 0 8、1 1 1 0、1
 1 1 1、1 1 1 2、1 1 1 3、1 1 1 4、1 1 1 5、1 1 1 6、1 1 1 7、1 1 1 8、1
 1 1 9、1 1 2 0、1 1 2 1、1 1 2 2、1 1 2 3、1 1 2 4、1 1 2 6、1 1 2 7、1
 1 2 8、1 1 3 1、1 1 3 2、1 1 3 3、1 1 3 4、1 1 3 5、1 1 3 6、1 1 3 7、1
 1 3 8、1 1 3 9、1 1 4 0、1 1 4 2、1 1 4 3、1 1 4 4、1 1 4 5、1 1 4 7、1
 1 4 8、1 1 4 9、1 1 5 1、1 1 5 2、1 1 5 3、1 1 5 4、1 1 5 5、1 1 5 6、1
 1 5 8、1 1 5 9、1 1 6 0、1 1 6 2、1 1 6 4、1 1 6 5、1 1 6 6、1 1 6 7、1
 1 6 8、1 1 6 9、1 1 7 0、1 1 7 1、1 1 7 2、1 1 7 3、1 1 7 5、1 1 7 6、1
 1 7 9、1 1 8 0、1 1 8 1、1 1 8 2、1 1 8 3に記載されている17～20個の近接
 しているヌクレオチドの配列中の17～20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含
 む。本発明のいかなる実施形態においても、RNA分子のガイド配列部は、配列番号：1
 ～1192の任意の単一の配列に、又は配列の上記グループからの任意の単一の配列に、
 記載されている17～20個の近接しているヌクレオチドを含んでもよいと理解される。

10

20

30

【0140】

本明細書において使用するとき、配列番号に記載されている「近接しているヌクレオチド」は、いかなるヌクレオチドも介在しないで配列番号に記載されている順序のヌクレオチドの配列であるヌクレオチドを指す。

【0141】

本発明の実施形態において、ガイド配列部は、長さが20個のヌクレオチドであってもよく、配列番号：1～1192の任意の1つに記載されている20個の近接しているヌクレオチドの配列である20個のヌクレオチドから構成される。本発明の実施形態において、ガイド配列部は、長さが20個のヌクレオチドより短くてもよい。例えば、本発明の実施形態において、ガイド配列部は、長さが17、18又は19個のヌクレオチドであってもよい。このような実施形態において、ガイド配列部は、それぞれ配列番号：1～1192の任意の1つに記載されている17～20個の近接しているヌクレオチドの配列中の、17、18又は19個のヌクレオチドから構成されてもよい。例えば、配列番号：1に記載されている17個の近接しているヌクレオチドの配列である17個のヌクレオチドを有するガイド配列部は、以下のヌクレオチド配列の任意の1つから構成されてもよい（近接している配列から除外されるヌクレオチドを取り消し線で印をつけた）。

40

50

配列番号：1 AAAAAAAAAACACAAUGUGGGGA

17個のヌクレオチドガイド配列1：~~AAAAAAAAACACAAUGUGGGGA~~ (配列番号：1201)

17個のヌクレオチドガイド配列2：~~AAAAAAAAACACAAUGUGGGGA~~ (配列番号：1202)

17個のヌクレオチドガイド配列3：~~AAAAAAAAACACAAUGUGGGGA~~ (配列番号：1203)

17個のヌクレオチドガイド配列4：AAAAAAAAACACAAUGUGGGGA (配列番号：1204)

10

【0142】

本発明の実施形態において、ガイド配列部は、長さが20個のヌクレオチドより長くてもよい。例えば、本発明の実施形態において、ガイド配列部は、長さが21、22、23又は24個のヌクレオチドであってもよい。このような実施形態において、ガイド配列部は、配列番号：1～1192の任意の1つに記載されている20個の近接しているヌクレオチドの配列である20個のヌクレオチド及び標的配列の3'末端、標的配列の5'末端又は両方に隣接するヌクレオチド又はヌクレオチドの配列に完全に相補的な追加のヌクレオチドを含む。

【0143】

本発明の実施形態において、CRISPRヌクレアーゼ及びガイド配列部を含むRNA分子は、標的DNA配列に結合して標的DNA配列の切断を引き起こすCRISPR複合体を形成する。Cpf1等の、CRISPRヌクレアーゼは、さらにtracrRNA分子なしでCRISPRヌクレアーゼ及びRNA分子を含むCRISPR複合体を形成してもよい。あるいは、Cas9等の、CRISPRヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ、RNA分子及びtracrRNA分子の間でCRISPR複合体を形成してもよい。

20

【0144】

本発明の実施形態において、RNA分子は、さらにtracrRNA分子の配列を含んでもよい。このような実施形態を、RNA分子のガイド部とトランス活性化型crRNA(tracrRNA)の合成融合物として設計してもよい。(Jinek(2012)Science参照)。本発明の実施形態は、また別々のtracrRNA分子及びガイド配列部を含む別々のRNA分子を利用してCRISPR複合体を形成してもよい。このような実施形態において、tracrRNA分子は、RNA分子と塩基対形成を介してハイブリッドを形成してもよく、本明細書に記載される発明の特定の応用において有利になることができる。

30

【0145】

用語「tracrメイト配列」は、tracrRNAと塩基対形成を介してハイブリッドを形成し、CRISPR複合体の形成を促進するようtracrRNA分子と十分に相補的な配列を指す。(US8906616参照)。本発明の実施形態において、RNA分子は、tracrメイト配列を有する部分をさらに含んでもよい。

【0146】

本発明の実施形態によれば、RNA分子は、長さが300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110又は100個のヌクレオチドまでであってもよい。各可能性は、別々の実施形態を表す。本発明の実施形態において、RNA分子は、長さが17～300個のヌクレオチド、長さが100～300個のヌクレオチド、長さが150～300個のヌクレオチド、長さが200～300個のヌクレオチド、長さが100～200個のヌクレオチド又は長さが150～250個のヌクレオチドであってもよい。各可能性は、別々の実施形態を表す。

40

【0147】

本開示の目的においては、「遺伝子」は、遺伝子産物をコードするDNA領域、及び遺

50

伝子産物の合成を調節する全てのDNA領域を含み、このような調節配列はコード及び／又は転写配列に隣接してもしなくてもよい。したがって、遺伝子は、プロモーター配列、ターミネーター、リボソーム結合部位及び内部リボソーム進入部位等の翻訳調節配列、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界領域、複製開始点、マトリックス結合領域及び遺伝子座調節領域を含むが、かならずしもこれらに限定されるものではない。

【0148】

「真核」細胞は、真菌細胞（酵母菌等）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞及びヒト細胞を含むが、これらに限定されるものではない。

【0149】

本明細書において使用するとき、用語HSPCは、造血幹細胞及び造血幹前駆細胞の両方を指す。幹細胞の非限定的な例は、骨髄細胞、骨髄系前駆細胞、多能性前駆細胞、系統限定前駆細胞を含む。

10

【0150】

本明細書において使用するとき、「前駆細胞」は、幹細胞に由来し、有糸分裂能力及び多分化能（例えば、1つより多いが全ての種類ではない細胞の成熟系統へと分化又は発達することができる）を保持する系統細胞を指す。本明細書において使用するとき、「造血」又は「赤血球産生」は、各種種類の血液細胞（例えば、赤血球、巨核球、骨髄球（例えば、単球、マクロファージ及び好中球）ならびにリンパ球）ならびに体内（骨髄中等）で形成される他の要素を指す。

【0151】

用語「ヌクレアーゼ」は、本明細書において使用するとき、核酸のヌクレオチドサブユニット間のホスホジエステル結合を開裂することができる酵素を指す。ヌクレアーゼは、天然源から分離されても由来してもよい。天然源は、任意の生存生物であってもよい。あるいは、ヌクレアーゼは、ホスホジエステル結合開裂能を保持する改変又は合成タンパク質であってもよい。ヌクレアーゼ、例えば、CRISPRヌクレアーゼを使用して遺伝子改変を成し遂げることができる。

20

【0152】

本発明の実施形態において、RNA分子は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子に存在するヘテロ接合性多型部位を標的とするよう設計され、RNA分子は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子に存在するヘテロ接合性多型部位のヌクレオチド塩基、REF又はALTを標的とする。

30

【0153】

本開示は、一方の対立遺伝子に変異が疾患表現型を生じる変異タンパク質をコードするような変異を保持し（「変異対立遺伝子」）、他方の対立遺伝子は機能性タンパク質をコードする（「機能性対立遺伝子」）、遺伝子の2個の対立遺伝子間を識別／区別するために少なくとも1つの自然発生のヌクレオチドの差又は遺伝子多型（一塩基多型（SNP）等）を利用する方法を提供する。方法は、変異タンパク質の発現をノックアウトし、機能性タンパク質の発現を許容するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、ドミナントネガティブな遺伝性障害を治療、寛解又は予防するための方法である。

【0154】

本発明の実施形態は、ある一定の細胞又は対象においてドミナントな変異対立遺伝子を発現する遺伝子の少なくとも1つのヘテロ接合性SNPを利用する方法を提供する。本発明の実施形態において、利用されるSNPは、疾患表現型と関連してもしなくてもよい。本発明の実施形態において、ガイド配列を含むRNA分子は、遺伝子の変異対立遺伝子中のヘテロ接合性SNPに存在し、したがって遺伝子の機能性対立遺伝子中の異なるヌクレオチド塩基を有するヌクレオチドを標的とすることにより遺伝子の変異対立遺伝子を標的とする。

40

【0155】

本発明の実施形態によれば、第1のRNA分子は、ELANE遺伝子のエキソン又はプロモーターに存在する第1のヘテロ接合性SNPを標的とし、第1のRNA分子は、EL

50

A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在する第 1 の S N P のヌクレオチド塩基、R E F 又は A L T を標的とし、第 2 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の同一の又は異なるエキソン又はイントロンに存在する第 2 のヘテロ接合性 S N P を標的とし、第 2 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在する第 2 の S N P のヌクレオチド塩基、R E F 又は A L T を標的とするか、又は第 2 の R N A 分子は、変異対立遺伝子又は機能性対立遺伝子の両方に存在する非コード領域の配列を標的とする。

【 0 1 5 6 】

本発明の実施形態によれば、第 1 の R N A 分子又は第 1 及び第 2 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子のプロモーター領域、開始コドンまたは非翻訳領域 (U T R) に存在するヘテロ接合性 S N P を標的とし、R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在する S N P のヌクレオチド塩基、R E F 又は A L T を標的とする。

10

【 0 1 5 7 】

本発明の実施形態によれば、第 1 の R N A 分子又は第 1 及び第 2 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子の少なくともプロモーターの一部及び / 又は開始コドン及び / 又は U T R の一部を標的とする。

【 0 1 5 8 】

本発明の実施形態によれば、第 1 の R N A 分子は、プロモーターの一部、E L A N E 遺伝子のプロモーターに存在する第 1 のヘテロ接合性 S N P 、又は E L A N E 遺伝子のプロモーターの上流に存在するヘテロ接合性 S N P を標的とし、第 2 の R N A 分子は、第 2 のヘテロ接合性 S N P を標的とし、この第 2 のヘテロ接合性 S N P は、第 1 のヘテロ接合性 S N P の下流の E L A N E 遺伝子に存在し、E L A N E 遺伝子のプロモーター、U T R もしくはイントロン又はエキソンにあり、第 1 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在する第 1 の S N P のヌクレオチド塩基、R E F 又は A L T を標的とし、第 2 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在する第 2 の S N P のヌクレオチド塩基、R E F 又は A L T を標的とする。

20

【 0 1 5 9 】

本発明の実施形態によれば、第 1 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子のプロモーター、プロモーターの上流、又は U T R に存在するヘテロ接合性 S N P を標的とし、R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異誘発遺伝子に存在する S N P のヌクレオチド塩基、R E F 又は A L T を標的とし、第 2 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子及び機能性対立遺伝子の両方のイントロンに存在する配列を標的とするよう設計される。

30

【 0 1 6 0 】

本発明の実施形態によれば、第 1 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子又は機能性対立遺伝子の両方に存在するプロモーターの上流の配列を標的とし、第 2 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の任意の位置に存在するヘテロ接合性 S N P を標的とし、第 2 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在する S N P のヌクレオチド塩基、R E F 又は A L T を標的とする。

【 0 1 6 1 】

本発明の実施形態によれば、変異対立遺伝子から疾患発症性の変異を含むエキソンを除去することによって、第 1 の R N A 分子又は第 1 及び第 2 の R N A 分子は、エキソンのエキソン全体又は一部に隣接している領域を標的とする、ことを含む方法が提供される。

40

【 0 1 6 2 】

本発明の実施形態によれば、遺伝子のオープンリーディングフレーム全体、複数のエキソンを除去すること、又は遺伝子全体を除去すること、を含む方法が提供される。

【 0 1 6 3 】

本発明の実施形態によれば、第 1 の R N A 分子は E L A N E 遺伝子のエキソン又はプロモーターに存在する第 1 のヘテロ接合性 S N P を標的とし、第 2 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の同一の又は異なるエキソン又はイントロンに存在する第 2 のヘテロ接合性 S N P を標的とし、第 2 の R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在する第 2 の S N P のヌクレオチド塩基、R E F 又は A L T を標的とするか、又は第 2 の R N A 分

50

子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子又は機能性対立遺伝子の両方に存在するイントロンの配列を標的とする。

【0164】

本発明の実施形態によれば、第1のRNA分子又は第1及び第2のRNA分子は、変異対立遺伝子のエキソン及びイントロンの間の選択的スプライシングシグナル配列を標的とする。

【0165】

本発明の実施形態によれば、第2のRNA分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子の両方に存在する配列を標的とする。

【0166】

本発明の実施形態によれば、第2のRNA分子は、イントロンを標的とする。

【0167】

本発明の実施形態によれば、エラープローン非相同末端結合(NHEJ)機構により変異対立遺伝子に挿入又は欠失を受けさせ、変異対立遺伝子の配列にフレームシフトを生じさせることを含む方法が提供される。

【0168】

本発明の実施形態によれば、フレームシフトは、変異対立遺伝子の不活性化又はノックアウトを生じる。

【0169】

本発明の実施形態によれば、フレームシフトにより変異対立遺伝子中に早期の終止コドンが作成される。

【0170】

本発明の実施形態によれば、フレームシフトにより変異対立遺伝子の転写物にナンセンス変異依存mRNA分解機構が生じる。

【0171】

本発明の実施形態によれば、不活性化又は治療により変異対立遺伝子によってコードされる切断型タンパク質及び機能性対立遺伝子によってコードされる機能性タンパク質が生じる。

【0172】

本開示の組成物及び方法は、SCN又はCyNを治療、予防、寛解又は悪化を遅くするために利用されてもよい。

【0173】

いくつかの実施形態において、細胞に、E L A N E 遺伝子のプロモーター領域、開始コドン又は非翻訳領域(UTR)に存在するヘテロ接合性SNPを標的とするRNA分子を送達することにより変異対立遺伝子を不活性化し、RNA分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在するSNPのヌクレオチド塩基、REF又はALTを標的とする。

【0174】

いくつかの実施形態において、変異対立遺伝子は、少なくともプロモーターの一部を除去すること及び/又は開始コドン及び/又はUTRの一部を除去することにより不活性化される。いくつかの実施形態において、変異対立遺伝子を不活性化する方法は、少なくともプロモーターの一部を除去することを含む。このような実施形態において、1つのRNA分子は、E L A N E 遺伝子のプロモーター又はプロモーターの上流に存在する第1のヘテロ接合性SNPを標的とするよう設計され、別のRNA分子は、第2のヘテロ接合性SNPを標的とし、この第2のヘテロ接合性SNPは、第1のSNPの下流であり、E L A N E 遺伝子のプロモーター、UTRもしくはイントロン又はエキソンに存在する。あるいは、1つのRNA分子は、E L A N E 遺伝子のプロモーター又はプロモーターの上流もしくはE L A N E 遺伝子のUTRに存在するヘテロ接合性SNPを標的とするよう設計されてもよく、別のRNA分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子及び機能性対立遺伝子の両方のイントロンに存在する配列を標的とするよう設計される。あるいは、1つのRNA分子は、変異対立遺伝子及び機能性対立遺伝子の両方に存在するプロモーターの上流の

10

20

30

40

50

配列を標的とするよう設計されてもよく、他のガイドは、E L A N E 遺伝子のエキソン、イントロン、U T R 又はプロモーターの下流等の、E L A N E 遺伝子の任意の位置に存在するヘテロ接合性 S N P を標的とするよう設計され、R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在する S N P のヌクレオチド塩基、R E F 又は A L T を標的とする。

【0175】

いくつかの実施形態において、変異対立遺伝子を不活性化する方法は、変異対立遺伝子から疾患発症性の変異を含むエキソンを除去するステップを含むエキソンスキッピングステップを含む。変異対立遺伝子の疾患発症性の変異を含むエキソンを除去するには、エキソンのエキソン全体又は一部に隣接している領域を標的とする2個のR N A 分子が必要とされる。疾患発症性の変異を含むエキソンの除去は、野生型の活性の一部又は全てを保持する残りのタンパク質生成物の発現を許容しながらタンパク質の疾患発症活性を除去するよう設計されてもよい。単一のエキソンスキッピングの代わりとして、複数のエキソン、オープンリーディングフレーム全体又は遺伝子全体を、切除されることが望まれる領域に隣接している2個のR N A 分子を使用して切除することができる。

10

【0176】

いくつかの実施形態において、変異対立遺伝子を不活性化する方法は、2個のR N A 分子を細胞に送達することを含み、1つのR N A 分子は、E L A N E 遺伝子のエキソン又はプロモーターに存在する第1のヘテロ接合性 S N P を標的とし、R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在する第1の S N P のヌクレオチド塩基、R E F 又は A L T を標的とし、他のR N A 分子は、E L A N E 遺伝子の同一の又は異なるエキソン又はイントロンに存在する第2のヘテロ接合性 S N P を標的とし、R N A 分子は、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在する第2の S N P のヌクレオチド塩基、R E F 又は A L T を標的とするか、又は第2のR N A 分子は、変異対立遺伝子又は機能性対立遺伝子の両方に存在するイントロンの配列を標的とする。

20

【0177】

いくつかの実施形態において、R N A 分子を、C R I S P R ヌクレアーゼが変異対立遺伝子のエキソン及びイントロンの間の選択的スプライシングシグナル配列を標的とし、それにより変異対立遺伝子の選択的スプライシングシグナル配列を破壊するために使用する。

【0178】

変異対立遺伝子を不活性化するための上述した戦略の任意の1つ又は組み合わせを、本発明の文脈において使用してもよい。

30

【0179】

変異対立遺伝子を不活性化するために、さらなる戦略を使用してもよい。例えば、本発明の実施形態において、R N A 分子は、二本鎖切断 (D S B) を生じさせるために C R I S P R ヌクレアーゼを変異対立遺伝子のエキソン又はスプライス部位に向けさせ、エラープローン非相同末端結合 (N H E J) 機構によりヌクレオチドを挿入又は欠失させ、変異対立遺伝子のフレームシフト変異を形成させるために使用される。フレームシフト変異により、(1) 変異対立遺伝子に早期の終止コドンが作成されることにより変異対立遺伝子が不活性化するかノックアウトされ、切断型タンパク質が作成されてもよく、又は(2) 変異対立遺伝子の転写物にナンセンス変異依存 m R N A 分解機構が生じてもよい。さらなる実施形態において、1つのR N A 分子は、C R I S P R ヌクレアーゼを変異対立遺伝子のプロモーターに向けさせるために使用される。

40

【0180】

いくつかの実施形態において、変異対立遺伝子を不活性化する方法は、機能性タンパク質の活性を活性化/増強することができる、タンパク質/ペプチド、タンパク質/ペプチドをコードする核酸又は化学物質等の小分子を提供すること等により機能性タンパク質の活性を増強することをさらに含む。

【0181】

いくつかの実施形態によれば、本開示は、C R I S P R ヌクレアーゼ等の、R N A がガイドする D N A ヌクレアーゼと結合する/関連している及び/又は C R I S P R ヌクレア

50

ーゼ等の、RNAがガイドするDNAヌクレアーゼを関心のある遺伝子の変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子との間に差がある少なくとも1つのヌクレオチド（ヘテロ接合性SNP等）を含む配列（機能性対立遺伝子には存在しない変異対立遺伝子の配列等）に向けさせるRNA分子を提供する。

【0182】

いくつかの実施形態において、方法は、関心のある遺伝子の変異対立遺伝子に対立遺伝子特異的RNA分子及びCas9タンパク質等の、CRISPRヌクレアーゼと接触するステップを含み、対立遺伝子特異的RNA分子及びCas9タンパク質等の、CRISPRヌクレアーゼは、関心のある遺伝子の機能性対立遺伝子のヌクレオチド配列と少なくとも1つのヌクレオチドだけ異なる、関心のある遺伝子の変異対立遺伝子のヌクレオチド配列と結合し、それによって変異対立遺伝子を改変又はロックアウトする。

10

【0183】

いくつかの実施形態において、対立遺伝子特異的RNA分子及びCRISPRヌクレアーゼは、関心のある遺伝子をコードする細胞に導入される。いくつかの実施形態において、関心のある遺伝子をコードする細胞は、哺乳類対象にある。いくつかの実施形態において、関心のある遺伝子をコードする細胞は、植物にある。

【0184】

いくつかの実施形態において、開裂した変異対立遺伝子は、エラーブローン非相同末端結合（NHEJ）機構により挿入又は欠失を受けさせ（インデル）、変異対立遺伝子の配列にフレームシフトを生成する。いくつかの実施形態において、生成されたフレームシフトにより、変異対立遺伝子の不活性化又はロックアウトが生じる。いくつかの実施形態において、生成されたフレームシフトにより変異対立遺伝子中に早期の終止コドンが作成され、切断型タンパク質が生成する。このような実施形態において、方法は、変異対立遺伝子によってコードされた切断型タンパク質及び機能性対立遺伝子によってコードされた機能性タンパク質を生じる。いくつかの実施形態において、本発明の方法を使用して変異対立遺伝子に生成されたフレームシフトにより、変異対立遺伝子の転写物にナンセンス変異依存mRNA分解機構が生じる。

20

【0185】

いくつかの実施形態において、変異対立遺伝子は、「好中球エラストラーゼ」遺伝子（ELANE遺伝子）の対立遺伝子である。いくつかの実施形態において、RNA分子は、SCN又はCyN遺伝性障害に関連する変異配列と共存する/関連づけられるELANE遺伝子のヘテロ接合性SNPを標的とする。いくつかの実施形態において、RNA分子は、ELANE遺伝子のヘテロ接合性SNPを標的とし、上記SNPのヘテロ接合性は、集団内で高度に蔓延している。本発明の実施形態において、REFヌクレオチドは、治療すべき個々の対象の変異対立遺伝子には蔓延しているが、機能性対立遺伝子には蔓延していない。本発明の実施形態において、ALTヌクレオチドは、治療すべき個々の対象の変異対立遺伝子には蔓延しているが、機能性対立遺伝子には蔓延していない。いくつかの実施形態において、変異ELANE遺伝子内の疾患発症性の変異が標的とされる。

30

【0186】

本発明の実施形態において、ヘテロ接合性SNPは、ELANE関連疾患表現型に関連していてもしていなくてもよい。本発明の実施形態において、ヘテロ接合性SNPは、ELANE関連疾患表現型に関連している。本発明の実施形態において、SNPは、ELANE関連疾患表現型に関連していない。

40

【0187】

いくつかの実施形態において、ヘテロ接合性SNPは、関心のある遺伝子のエキソン内にある。このような実施形態において、RNA分子のガイド配列部は、関心のある遺伝子のエキソンを標的とするよう設計されてもよい。

【0188】

いくつかの実施形態において、ヘテロ接合性SNPは、関心のある遺伝子のイントロン又はエキソン内にある。いくつかの実施形態において、ヘテロ接合性SNPは、イントロ

50

ンとエキソンの間のスプライス部位にある。いくつかの実施形態において、ヘテロ接合性 S N P は、関心のある遺伝子の P A M 部位にある。

【 0 1 8 9 】

当業者は、本発明の実施形態の各々において、個別に、本発明の R N A 分子の各々は、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) に隣接する関心のある標的ゲノム D N A 配列に関連しているような、 C R I S P R ヌクレアーゼ等の、ヌクレアーゼと複合体を形成することができることを、理解するであろう。次にヌクレアーゼは、標的 D N A の開裂を媒介してプロトスペーサー内部に二本鎖切断を作成する。したがって、本発明の実施形態において、本発明のガイド配列と R N A 分子は、 P A M 部位から 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 又は 28 ヌクレオチド上流又は下流の位置を標的としてもよい。

10

【 0 1 9 0 】

それゆえに、本発明の実施形態において、 C R I S P R ヌクレアーゼ等の、ヌクレアーゼと複合体を形成している本発明の R N A 分子は、標的的部位から 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 遺伝子上流又は下流の対立遺伝子で二本鎖切断に影響してもよい。当業者は、ヘテロ接合性多型部位が存在し、標的を明確化するために使用されるならば、 R N A 分子は、ヘテロ接合性多型部位の R E F 又は A L T ヌクレオチド塩基のみを標的として二本鎖切断に影響するよう設計されてもよいことを理解するであろう。

20

【 0 1 9 1 】

ヘテロ接合性多型部位が P A M 部位内部にあるならば、 R N A 分子は、 P A M 部位から 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 又は 28 ヌクレオチド上流又は下流の配列を標的とするよう設計されてもよく、 R N A 分子とヌクレアーゼの複合体は、 P A M 部位のヘテロ接合性多型部位の R E F 又は A L T ヌクレオチド塩基の 1 つのみを標的として P A M 部位での切断に影響するよう設計され、例えば t r a c r R N A は、ヘテロ接合性多型部位の R E F 又は A L T ヌクレオチド塩基の 1 つを標的とするよう設計されることが理解される。

30

【 0 1 9 2 】

本発明の実施形態において、 R N A 分子は、 E L A N E 遺伝子に存在するヘテロ接合性多型部位を標的とするよう設計され、 R N A 分子及び / 又は R N A 分子及び C R I S P R ヌクレアーゼの複合体は、 E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子に存在するヘテロ接合性多型部位のヌクレオチド塩基、 R E F 又は A L T を標的とするよう設計される。

【 0 1 9 3 】

本発明の実施形態において、 R N A 分子、組成物、方法、細胞、キット又は薬物は、ヘテロ接合体 E L A N E 遺伝子に起因する疾患表現型を有する対象を治療するために利用される。本発明の実施形態において、疾患は、 S C N 又は C y N である。このような実施形態において、方法は、疾患表現型を改善、寛解又は予防する。

40

【 0 1 9 4 】

本発明の実施形態において、本発明の R N A 分子、組成物、方法、細胞、キット又は薬物は、対象を治療するに S C N 又は C y N のための第 2 の治療と組み合わせて使用される。本発明の実施形態において、本発明の R N A 分子、組成物、方法、細胞、キット又は薬物は、第 2 の治療の投与前に、第 2 の治療の投与中に及び / 又は第 2 の治療の投与後に投与される。

【 0 1 9 5 】

本発明の実施形態において、本発明の R N A 分子、組成物、方法、細胞、キット又は薬物は、顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) 治療と組み合わせて投与される。

【 0 1 9 6 】

50

上記の実施形態は、CRISPRヌクレアーゼ、RNA分子(類)及びtracrRNA分子が対象又は細胞内で同時に効果的であることを指す。CRISPR、RNA分子(類)及びtracrRNA分子を実質的に同時に送達することができ、又は異なる時点で送達できるが同時に効果を持つことができる。例えば、これには、RNA分子及び/又はtracrRNA分子が対象又は細胞内に実質的に現存する前に、CRISPRヌクレアーゼを対象又は細胞に送達することが含まれる。

【0197】

本発明の実施形態によれば、細胞の、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するための方法であって、方法は、

a) SCN又はCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有し、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択されるELANE遺伝子の1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である細胞を選択すること、

b) 細胞に

CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組成物を導入することであって、

CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、細胞のELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響するが、細胞のELANE遺伝子の機能性対立遺伝子における二本鎖切断には影響しない、導入すること、を含み、

それにより細胞内のELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化する、方法を提供する。

【0198】

本発明の実施形態によれば、細胞の、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するための方法であって、方法は、

a) SCN又はCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有し、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択されるELANE遺伝子の1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である細胞を選択するステップ、

b) 細胞に

CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組成物を導入するステップであって、

CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、細胞のELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響するが、ELANE遺伝子の機能性対立遺伝子における二本鎖切断には影響しない、ステップを含み、

方法はさらに、CRISPRヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することを含み、第2のRNA分子とCRISPRヌクレアーゼとの複合体は、ELANE遺伝子における第2の二本鎖切断に影響し、

それにより細胞内のELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化する、方法を提供する。

【0199】

10

20

30

40

50

本発明の実施形態によれば、細胞の、SCN又はCyNに関連している変異を有するELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するための方法であって、細胞は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択されるELANE遺伝子の1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であり、方法は、

細胞に

CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組成物を導入することであって、

CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響する、導入すること、を含み、

それにより細胞内のELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化する、方法を提供する。

【0200】

本発明の実施形態によれば、細胞の、SCN又はCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有し、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択されるELANE遺伝子の1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であるELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するための方法であって、方法は、

細胞に

CRISPRヌクレアーゼ又はCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組成物を導入することを含み、

CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、

方法はさらに、CRISPRヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することを含み、第2のRNA分子とCRISPRヌクレアーゼとの複合体は、ELANE遺伝子における第2の二本鎖切断に影響し、

それにより細胞内のELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化する、方法を提供する。

【0201】

本発明の実施形態において、CRISPRヌクレアーゼ及び第1のRNA分子の複合体は、細胞のELANE遺伝子の変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響するが、細胞のELANE遺伝子の機能性対立遺伝子における二本鎖切断には影響しない。

【0202】

本発明の実施形態において、細胞はまた、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択されるELANE遺伝子の少なくとも1つのさらなる多型

10

20

30

40

50

部位でヘテロ接合性である。

【0203】

本発明の実施形態において、SCN又はCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する細胞は、ELANE遺伝子変異を有する及び/又はSCN又はCyNで苦しんでいる対象由来であってもよい。したがって、ELANE遺伝子変異を有する細胞を選択することは、ELANE遺伝子変異を有する対象を選択することを含んでもよい。本発明のさらなる実施形態において、細胞を選択することは、ELANE遺伝子変異を有する対象由来の細胞を選択することを含んでもよい。本発明の実施形態において、本主題発明の組成物を細胞に導入することは、本発明の組成物をELANE遺伝子変異で苦しんでいる対象の細胞に導入することを含んでもよい。

10

【0204】

したがって、本発明の実施形態において、細胞の、対象のELANE遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するのであって、方法は、SCN又はCyNを引き起こすELANE遺伝子変異を有し、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854nから成る群から選択されるELANE遺伝子の1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である対象を選択するステップを含む、方法が提供される。

20

【0205】

したがって、本発明の実施形態は、ELANE遺伝子を求めて対象又は細胞を選別することを包含する。当業者は、非限定的な例として、例えば、sequencing-by-synthesis、サンガー塩基配列決定法、核型分析、蛍光インサイツハイブリダイゼーション法、及び/又はマイクロアレイ試験等の、従来技術のELANE遺伝子内の変異を選別する方法を容易に理解するだろう。本発明の実施形態においては、ELANE遺伝子内の変異をエキソン配列決定法により選別する。

【0206】

本発明の実施形態において、対象は、末梢血液中の好中球絶対数(ANC)を測定することによりSCN又はCyNと診断される又は診断された。本発明の実施形態において、SCNは、対象が生後6か月に達する前に診断される又は診断された。本発明の実施形態において、CyNは、生後12か月と24か月の間に、又は生後24か月の後に診断される又は診断された。本発明の実施形態において、SCN又はCyNは、1つ又は複数の再発性急性口腔医学的疾患によって診断される。本発明の実施形態において、SCN又はCyNは、骨髄検査によって診断され、好ましくは、骨髄検査は、細胞遺伝学的骨髄調査である。本発明の実施形態において、SCN又はCyNは、抗好中球抗体アッセイ、免疫グロブリンアッセイ(IgGAM)、リンパ球免疫表現型検査、脾臓マーカー(血清トリプシノーゲン及び糞便エラスターゼ)並びに脂溶性ビタミンレベル(ビタミンA、E及びD)のうちの1つ又は複数によって診断される。全ての診断方法を他のいかなる診断方法とともに使用してもよいことが理解される。

30

40

【0207】

本発明の実施形態において、SCN又はCyNと診断された対象は、ELANE遺伝子のELANE病原性変異を同定するためにエキソンシーケンシングにより選別される。さらなる実施形態において、対象は、表1の少なくとも1つのSNPのヘテロ接合性を確認するためにサンガーシーケンシングにより選別される。本発明の実施形態において、SNPは、rs1683564、rs10414837及びrs3761005のうちの1つである。本発明の実施形態において、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子のヘテロ接合性SNPのヌクレオチドは、BACbioを使用して決定される。本発明の実施形態において、表2にしたがって適切なガイドを選択する。本発明の実施形態において、選択され

50

たガイドは、対象から取得した、P B M C等の、細胞に導入され、細胞の病原性E L A N E変異の減少は、次世代シーケンス技術等によって測定される。

【0208】

C R I S P R / C a s 9 遺伝子編集システムを用いると、ヌクレアーゼを疾患発症性の変異に立ち向かう配列特異的な様式で標的部位を標的とすることができる。造血幹細胞・前駆細胞(H S P C)は自己複製と分化の両方の能力があるので(Y u , N a t a n s o n , a n d D u n b a r 2016)、治療可能性がある。したがって、本発明の実施形態は、ゲノム編集をH S P Cに適用する。

【0209】

本発明の実施形態において、自家製治療では、S C N又はC y Nと診断された患者由来のC R I S P R / C a s 9で編集した自家C D 3 4 +造血幹細胞を利用する。本発明の実施形態において、C D 3 4 +細胞は、骨髄又は患者にアフエレシスした後の末梢血単核球(P B M C)から単離される。

10

【0210】

S C N又はC y N等の、ドミナントネガティブ(又は複合ヘテロ接合性)の徴候がある場合、戦略は、変異対立遺伝子を編集することであり、ヘテロ接合性S N P配列を標的とすることにより変異していない対立遺伝子又は他のオフターゲットの開裂を避けることである。

【0211】

本発明の実施形態は、以下のステップを含む。
本明細書の以下の表1のS N Pのうち少なくとも1つがヘテロ接合性を示すと同定されたS C N又はC y Nと診断された患者の選択。本発明の実施形態において、対象は、r s 1 0 4 1 4 8 3 7、r s 3 7 6 1 0 0 5又はr s 1 6 8 3 5 6 4でヘテロ接合性であり、候補患者の同定されたヘテロ接合性S N P位置に基づく治療戦略の選択。
末梢血液の吸引によるか又は動員及びアフエレシスによるかのいずれかにより対象の骨髄からH S P C細胞を取得する、任意選択で、H S P C細胞を処理する(濃縮する、刺激する、両方等)

20

H S P C細胞に(エクスピボエレクトロポレーション等により)

C R I S P Rヌクレアーゼ又は同一物をコードする配列(m R N A等)、

変異対立遺伝子の同定されたヘテロ接合性S N Pの特定の配列(R E F / A L T配列)を標的とする特徴的なR N A分子及び

30

変異対立遺伝子と他の対立遺伝子の両方に共通である、イントロン3、イントロン4又は3' U T R中の配列を標的とする非特徴的なR N A分子を含む組成物を導入し、

それによりH S P C細胞を編集してE L A N Eの変異対立遺伝子発現をノックアウトする。そして

編集したH S P Cを候補患者に導入する。

【0212】

本発明の実施形態において、C D 3 4 +細胞を、骨髄又は患者アフエレシス後の末梢血単核球(P B M C)から分離してもよい。骨髄又はP B M Cを、H S P C動員後のアフエレシスにより患者から収集してもよい。本発明の実施形態において、アフエレシス生成物を洗浄して血小板を除去してもよく、C l i n i M A C Sシステム(M i l t e n y i B i o t e c)等を使用する生成により、C D 3 4 +細胞集団を濃縮してもよい。本発明の実施形態において、選択された細胞を、組換えヒトサイトカインの混合物等により、エクスピボで予備刺激してもよい。本発明の実施形態において、細胞は、エレクトロポレーションを受けてもよい。本発明の実施形態において、エレクトロポレーションの前に、刺激した細胞(C D 3 4 +細胞等)、C R I S P Rヌクレアーゼ、m R N A及びg R N Aを、限定条件下でプレインキュベートしてもよい。本発明の実施形態において、細胞を、C R I S P Rヌクレアーゼ、m R N A / g R N A混合物により又は組み立て済みR N P(C R I S P Rヌクレアーゼタンパク質であるリボヌクレアーゼタンパク質及びg R N A)によりエクスピボでエレクトロポレーションし、その後細胞洗浄する。本発明の実施形態に

40

50

において、細胞を、最終製剤へと懸濁する。本発明の実施形態において、細胞を再懸濁してもよい。本発明の実施形態において、再懸濁した細胞を注入用バッグへと充填してもよい。本発明の実施形態において、バッグをコントロールレートフリーザーのフリーズダウンステップを使用して凍結しても及び/又は気相の液体室素内で保存してもよい。本発明の実施形態において、製品を静脈内（IV）投与により患者に投与してもよい。

【0213】

ドミナントな遺伝性障害

当業者は、いかなる種類のヘテロ接合体遺伝性障害（ドミナントな遺伝性障害等）の全ての対象も本明細書において記載される方法を受けてもよいことを理解するであろう。1つの実施形態において、本発明を、例えばSCN又はCyN等のドミナントな遺伝性障害に
10
関与する、関連している又は原因となる遺伝子を標的とするために使用してもよい。いくつかの実施形態において、ドミナントな遺伝性障害は、SCN又はCyNである。いくつかの実施形態において、標的遺伝子は、ELANE遺伝子（Entrez Gene, gene ID No: 335）である。

【0214】

CRISPRヌクレアーゼ及びPAM認識

いくつかの実施形態において、配列特異的ヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ
20
又はその機能性バリエーションから選択される。いくつかの実施形態において、配列特異的ヌクレアーゼは、RNAでガイドされたDNAヌクレアーゼである。このような実施形態において、RNAでガイドされたDNAヌクレアーゼをガイドするRNA配列（Cpf1等）は、このRNAでガイドされたDNAヌクレアーゼに結合する及び/又はこのRNAでガイドされたDNAヌクレアーゼを変異対立遺伝子とその対応物である機能性対立遺伝子との間で異なる少なくとも1つのヌクレオチド（SNP等）を含む配列に向けさせる。いくつかの実施形態において、CRISPR複合体は、さらにtracrRNAを含まない。非限定的な例において、RNAでガイドされたDNAヌクレアーゼはCRISPRヌクレアーゼであるが、ドミナントな変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子との間で異なる少なくとも1つのヌクレオチドは、PAM部位内部にあっても及び/又はRNA分子がハイブリッド形成するよう設計された領域内部のPAM部位に近位であってもよい。当業者は、RNA分子を、従来技術において周知の方法によりゲノム内の選択した標的と結合するよう操作することができることを理解するであろう。
30

【0215】

本発明の実施形態において、タイプIIのCRISPRシステムでは、成熟型crRNA
40
Aを利用する、つまり追加の標的認識要求として、tracrRNA複合体がCas9等の、CRISPRヌクレアーゼをcrRNAと、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）に隣接するプロトスペーサーに接する標的DNAのプロトスペーサーとの間のワトソン・クリック塩基対形成を介して標的DNAに向かわせる。次に、CRISPRヌクレアーゼは、標的DNAの開裂を媒介してプロトスペーサー内部に二本鎖切断を作成する。当業者は、本発明の操作されたRNA分子の各々がプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）に接する関心のある標的ゲノムDNA配列と関連するように、例えばPAMが、非限定的な例として、化膿レンサ球菌（Streptococcus pyogenes）Cas9 WT（SpCas9）についてはNGG又はNAG、「N」は任意の核酸塩基であり、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）（SaCas9）についてはNNGRRT、空腸（Jejunum）Cas9 WTについてはNNNVR YM、SpCas9-VQRバリエーションについてはNGAN又はNGNG、SpCas9-VRE RバリエーションについてはNGCG、SpCas9-EQRバリエーションについてはNGAG、髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）（NmCas9）についてはNNNNGATT又はCpf1についてはTTTV等、利用されるCRISPRヌクレアーゼの種類に関連している配列と適合するようにさらに設計されることを理解するであろう。本発明のRNA分子は、各々が1つ又は複数の異なるCRISPRヌクレアーゼと組み合わせて複合体を形成するよう設計され、利用されるCRISPRヌクレアーゼに
50

対してそれぞれ1つ又は複数の異なるPAM配列を利用して関心のあるポリヌクレオチド配列を標的とするよう設計される。

【0216】

いくつかの実施形態において、CRISPRヌクレアーゼ等の、RNAでガイドされたDNAヌクレアーゼは、DNAを細胞のゲノムの所望の位置で切断させるために使用されてもよい。最も一般的に使用されるRNAでガイドされたDNAヌクレアーゼは、CRISPRシステムに由来するけれども、他のRNAでガイドされたDNAヌクレアーゼも本明細書において記載されるゲノム編集組成物及び方法において使用するために熟慮される。例えば、その内容を参照により本明細書に援用される、米国特許出願公開第2015-0211023を参照する。

10

【0217】

本発明の実施において使用することができるCRISPRシステムは、非常に多岐にわたる。CRISPRシステムは、I型、II型、III型又はV型システムとすることができる。適切なCRISPRタンパク質の非限定的な例には、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e(又はCasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12d、Cas10d、CasF、CasG、CasIi、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1(又はCasA)、Cse2(又はCasB)、Cse3(又はCasE)、Cse4(又はCasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4及びCu1966がある(Koonin 2017等を参照)。

20

【0218】

いくつかの実施形態において、RNAでガイドされたDNAヌクレアーゼは、II型CRISPRシステムに由来するCRISPRヌクレアーゼ(Cas9等)である。CRISPRヌクレアーゼは、化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカスサーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)、ストレプトコッカス属(*Streptococcus sp.*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、トレポネマ・デンティコラ(*Treponema denticola*)、ノカルディオプシスダッソンビエイ(*Nocardia asteroides*)、ストレプトマイセスプリスチナエスピラリス(*Streptomyces pristinaespiralis*)、ストレプトマイセスヴィリドクロモジネス(*Streptomyces viridochromogenes*)、ストレプトマイセスヴィリドクロモジネス(*Streptomyces viridochromogenes*)、ストレプトスポランギウムロセウム(*Streptosporangium roseum*)、ストレプトスポランギウムロセウム(*Streptosporangium roseum*)、アリサイクロバチルスアシドカルダリウス(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)、バシラスシュードミコイデス(*Bacillus pseudomycooides*)、バシラスセレニチレデュセンス(*Bacillus selenitireducens*)、エグジゴバクテリウムシビリカム(*Exiguobacterium sibiricum*)、デルブリュッキ菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバシラスサリバリウス(*Lactobacillus salivarius*)、マイクロシラマリナ(*Microscilla marina*)、バークホルデルリアバクテリウム(*Burkholderiales bacterium*)、ポラロモナスナフタレニボラン(*Polaromonas naphthalenivorans*)、ポラロモナス属(*Polaromonas sp.*)、クロコスファエラワトソニー(*Crocospaera*

30

40

50

watsonii)、シアノテス属(Cyanothece sp.)、マイクロキスティス
 エルギノーサ(Microcystis aeruginosa)、シネココッカス属(
 Synechococcus sp.)、アセトハロビウム アラビティカム(Aceto
 halobium arabaticum)、アンモニフェックス デゲンシ(Ammo
 nifex degensii)、カルディセルロシルプター・ベシイ(Caldicel
 ulosiruptor becscii)、カンディダートゥス デスルフォルディス(
 Candidatus Desulforudis)、ボツリヌス菌(Clostrid
 ium botulinum)、ディフィシル菌(Clostridium difjic
 ile)、フィネゴルディア マグナ(Finegoldia magna)、(ナトラナ
 エロビウス テルモフィルスム Natranaerobius thermophilus 10
)、ペロトマクulum・サーモプロピオニカム(Pelotomaculum thermo
 propionicum)、アシドチオバチラス カルダス(Acidithiobac
 illus caldus)、アシディチオバチルス フェロオキシダンス(Acidit
 thiobacillus ferrooxidans)、アロクロマティウム ビノサム(
 Allochromatium vinosum)、マリノバクター属(Marinob
 acter sp.)、ニトロソココッカス ハロフィルス(Nitrosococcus
 halophilus)、ニトロソココッカス ワトソニ(Nitrosococcus w
 atsoni)、シュードアルテロモナス ハロプランクティス(Pseudoalte
 romonas haloplankti)、クテドノバクテル ラセミファー(Kted
 onobacter racemifer)、メタノハロビウム エベスチガタム(Met
 hanohalobium evestigatum)、アナベナ バリアビリス(Ana
 baena variabilis)、ノジュラリア スプミゲナ(Nodularia
 spumigena)、ネンジュモ属(Nostoc sp.)、アルトロスピラ マキシ
 マ(Arthrospira maxima)、アルトロスピラ プラテンシス(Arth
 rospira platensis)、アルトロスピラ属(Arthrospira s
 p.)、リングビア属(Lyngbya sp.)、マイクロコレウス クソノプラステス(
 Microcoleus chthonoplastes)、オスキラトリア属(Osc
 illatoria sp.)、ペトロトーガ モビリス(Petrotoga mobi
 lis)、テルモシフォ アフリカヌス(Thermosiphon africanus)
 、アカリオクロリス マリナ(Acaryochloris marina)、フランシセ
 ラ cf. ノピシダ Fx1(Francisella cf. novicida Fx1 30
)、アリサイクロバチルス アシドテレストリス(Alicyclobacillus a
 cidoterrestis)、オレイフィーラス属(Oleiphilus sp.
)、細菌CC09 39 24、デルタプロテオバクテリア細菌、又は既知のPAM配列を
 有するCRISPRヌクレアーゼをコードする任意の種に由来してもよい。無培養細菌に
 よってコードされたCRISPRヌクレアーゼもまた、本発明の文脈において使用しても
 よい(Burstein et al. Nature, 2017を参照)。spCas9
 D1135Eバリエント、spCas9 VQRバリエント、spCas9 EQRバリエ
 ント又はspCas9 VRERバリエント等の、既知のPAM配列を有するCRISPR
 タンパク質のバリエントもまた、本発明の文脈において使用してもよい。 40

【0219】

したがって、Cas9タンパク質、修飾Cas9、Cas9のホモログあるいはオルソ
 ログ等のあるCRISPRシステムのRNAでガイドされたDNAヌクレアーゼ、又はC
 pfl及びそのホモログ並びにオルソログ等の、他の型のCRISPRシステムに属する
 他のRNAでガイドされたDNAヌクレアーゼを、本発明の組成物において使用してもよ
 い。

【0220】

特定の実施形態において、CRISPRヌクレアーゼは、自然起源のCasタンパク質
 の「機能性誘導体」であってもよい。天然配列ポリペプチドの「機能性誘導体」は、天然
 配列ポリペプチドと共通した定性的な生物学的特徴を有する化合物である。「機能性誘導 50

体」には、対応する天然配列ポリペプチドと共通した生物活性を有することを条件として、天然配列のフラグメント並びに天然配列ポリペプチドの誘導体及びそのフラグメントが含まれるが、これに限定されるものではない。本明細書において熟慮される生物活性は、機能性誘導体がDNA基質をフラグメントに加水分解する能力である。用語「誘導体」は、ポリペプチドのアミノ酸配列バリエーション、その共有結合的修飾物及びその融合物の両方を包含する。Casポリペプチドの適切な誘導体又はそのフラグメントには、Casタンパク質の変異体、融合物、共有結合的修飾物又はそれらのフラグメントが含まれるが、これに限定されるものではない。Casタンパク質又はそのフラグメントを含む、Casタンパク質及びCasタンパク質の誘導体又はそのフラグメントは、細胞から入手可能であってもよく、化学的に合成してもよく、又はこれらの2個の製法の組み合わせによって入手可能であってもよい。細胞は、自然にCasタンパク質を産生する細胞であってもよく、又は自然にCasタンパク質を産生し、高い発現レベルで内因性Casタンパク質を産生するか、内因性Casと同一又は異なるCasをコードする、外因的に導入された核酸からCasタンパク質を産生するよう遺伝子改変された細胞であってもよい。いくつかの場合において、この細胞は自然にはCasタンパク質を産生せず、Casタンパク質を産生するよう遺伝子改変される。

10

【0221】

いくつかの実施形態において、CRISPRヌクレアーゼは、Cpf1である。Cpf1は、トリッチなプロトスペーサー隣接モチーフを利用する単一のRNAでガイドされたエンドヌクレアーゼである。Cpf1は、DNAをねじれ形のDNA二本鎖切断により開裂する。Acidaminococcus属及びLachnospiraceae属由来の2個のCpf1酵素が、ヒト細胞において効率的なゲノム編集活性を行うことが証明されている(Zetscheら、(2015)Cellを参照)。

20

【0222】

したがって、Cas9タンパク質又は修飾Cas9あるいはCas9のホモログ、オルソログ又はバリエーション等の、II型CRISPRシステムのRNAでガイドされたDNAヌクレアーゼあるいはCpf1及びそのホモログ、オルソログ又はバリエーション等の、他の型のCRISPRシステムに属する他のRNAでガイドされたDNAヌクレアーゼを、本明細書において使用してもよい。

【0223】

いくつかの実施形態において、ガイド分子は、新規の又は改良された特性を加える1つ又は複数の化学修飾(例えば、分解からの安定性の改善、ハイブリッドエネルギーの改善又はRNAでガイドされたDNAヌクレアーゼとの結合特性の改善等)を含む。適切な化学修飾には、修飾塩基、修飾糖部分又は修飾ヌクレオシド間結合が含まれるがこれに限定されるものではない。適切な化学修飾の非限定的な例としては、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、「 β 」、D-ガラクトシルキユエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、「 β 」、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、「 β 」、D-マンノシルキユエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-(9-D-リボフラノシル-2-メチルチオプリン-6-イル)カルバモイル)スレオニン、N-(9-D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)スレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウリジン-5-オキシ酢酸、wybutoxosine、キューオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チ

30

40

50

オウリジン、5 - メチルウリジン、N - ((9 - D - リボフラノシルプリン - 6 - イル) - カルバモイル) スレオニン、2' - O - メチル - 5 - メチルウリジン、2' - O - メチルウリジン、ワイプトシン、「 3 - (3 - アミノ - 3 - カルボキシ - プロピル) ウリジン、(a c p 3) u」、2' - O - メチル (M)、3' - ホスホロチオエート (MS)、3' - チオ P A C E (M S P)、プソイドウリジン又は 1 - メチルプソイドウリジンがある。各可能性は、本発明の別々の実施形態を表す。

【 0 2 2 4 】

さらなる適切な化学修飾の非限定的な例としては、 $m^1 A$ (1 - メチルアデノシン)、 $m^2 A$ (2 - メチルアデノシン) ; $A m$ (2' - O - メチルアデノシン) ; $m s^2 m^6 A$ (2 - メチルチオ - N^6 - メチルアデノシン) ; $i^6 A$ (N^6 - イソペンテニルアデノシン) 10 ; $m s^2 i^6 A$ (2 - メチルチオ - N^6 イソペンテニルアデノシン) ; $i o^6 A$ (N^6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン) ; $m s^2 i o^6 A$ (2 - メチルチオ - N^6 - (シス - ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン) ; $g^6 A$ (N^6 - グリシニルカルバモイルアデノシン (*glyciny l carbamoy l adenosine*)) ; $t^6 A$ (N^6 - スレオニルカルバモイルアデノシン) ; $m s^2 t^6 A$ (2 - メチルチオ - N^6 - スレオニルカルバモイルアデノシン) ; $m^6 t^6 A$ (N^6 - メチル - N^6 - スレオニルカルバモイルアデノシン) ; $h n^6 A$ (N^6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン) ; $m s^2 h n^6 A$ (2 - メチルチオ - N^6 - ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン) ; $A r (p)$ (2' - O - リボシルアデノシン (リン酸塩)) ; I (イノシン) ; $m^1 I$ (1 - メチルイノシン) ; $m^1 I m$ (1 , 2' - O - ジメチルイノシン) ; $m^3 C$ (3 - 20 メチルシチジン) ; $C m$ (2' - O - メチルシチジン) ; $s^2 C$ (2 - チオシチジン) ; $a c^4 C$ (N^4 - アセチルシチジン) ; $f^5 C$ (5 - ホルミルシチジン) ; $m^5 C m$ (5 , 2' - O - ジメチルシチジン) ; $a^4 C m$ (N^4 - アセチル - 2' - O - メチルシチジン) ; $k^2 C$ (ライシジン) ; $m^1 G$ (1 - メチルグアノシン) ; $m^2 G$ (N^2 - メチルグアノシン) ; $m^7 G$ (7 - メチルグアノシン) ; $G m$ (2' - O - メチルグアノシン) ; $m^2_2 G$ (N^2 , N^2 - ジメチルグアノシン) ; $m^2 G m$ (N^2 , 2' - O - ジメチルグアノシン) ; $m^2_2 G m$ (N^2 , N^2 , 2' - O - トリメチルグアノシン) ; $G r (p)$ (2' - O - リボシルグアノシン (リン酸塩)) ; $y W$ (ワイプトシン) ; $o_2 y W$ (ペルオキシワイプトシン) ; $O H y W$ (ヒドロキシワイプトシン) ; $O H y W^*$ (未修飾ヒドロキシワイプトシン) ; $i m G$ (ウイオシン) ; $m i m G$ (メチルウイオシン) ; Q (キューオシン) ; 30 $o Q$ (エポキシキューオシン) ; $g a l Q$ (ガラクトシルキューオシン) ; $m a n Q$ (マンノシル - キューオシン) ; $p r e Q_o$ (7 - シアノ - 7 - デアザグアノシン) ; $p r e Q_1$ (7 - アミノメチル - 7 - デアザグアノシン) ; G^+ (アーケオシン) ; D (ジヒドロウリジン) ; $m^5 U m$ (5 , 2' - O - ジメチルウリジン) ; $s^4 U$ (4 - チオウリジン) ; $m^5 s^2 U$ (5 - メチル - 2 - チオウリジン) ; $s^2 U m$ (2 - チオ - 2' - O - メチルウリジン) ; $a c p^3 U$ (3 - (3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピル) ウリジン) ; $h o^5 U$ (5 - ヒドロキシウリジン) ; $m o^5 U$ (5 - メトキシウリジン) ; $c m o^5 U$ (ウリジン 5 - オキシ酢酸) ; $m c m o^5 U$ (ウリジン 5 - オキシ酢酸メチルエステル) ; $c h m^5 U$ (5 - (カルボキシヒドロキシメチル) ウリジン)) ; $m c h m^5 U$ (5 - (カルボキシヒドロキシメチル) ウリジンメチルエステル) ; $m c m^5 U$ (5 - メトキシカルボニルメチルウリジン) ; $m c m^5 U m$ (5 - メトキシカルボニルメチル - 2' - O - メチルウリジン) ; $m c m^5 s^2 U$ (5 - メトキシカルボニルメチル - 2 - チオウリジン) ; $n m^5 S^2 U$ (5 - アミノメチル - 2 - チオウリジン) ; $m n m^5 U$ (5 - メチルアミノメチルウリジン) ; $m n m^5 s^2 U$ (5 - メチルアミノメチル - 2 - チオウリジン) ; $m n m^5 s e^2 U$ (5 - メチルアミノメチル - 2 - セレノウリジン) ; $n c m^5 U$ (5 - カルバモイルメチルウリジン) ; $n c m^5 U m$ (5 - カルバモイルメチル - 2' - O - メチルウリジン) ; $c m n m^5 U$ (5 - カルボキシメチルアミノメチルウリジン) ; $c m n m^5 U m$ (5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2' - O - メチルウリジン) ; $c m m m^5 s^2 U$ (5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン) ; ジメチルアデノシン) ; $I m$ (2' - O - メチルイノシン) ; $m^4 C$ (N^4 - メチルシチジン) ; $m^4 G m$ (N^4 , 2 50

' - 0 - ジメチルシチジン) ; h m 5 C (5 - ヒドロキシメチルシチジン) ; m 3 U (3 - メチルウリジン) ; c m 5 U (5 - カルボキシメチルウリジン) ; m 6 A m (N 6 , 2 ' - 0 - ジメチルアデノシン) ; m 6 2 A m (N 6 , N 6 , 0 - 2 ' - トリメチルアデノシン) ; m 2 ' 7 G (N 2 , 7 - ジメチルグアノシン) ; m 2 , 2 , 7 G (N 2 , N 2 , 7 - トリメチルグアノシン) ; m 3 U m (3 , 2 ' - 0 - ジメチルウリジン) ; m 5 D (5 - メチルジヒドロウリジン) ; f 5 C m (5 - ホルミル - 2 ' - 0 - メチルシチジン) ; m 1 G m (1 , 2 ' - 0 - ジメチルグアノシン) ; m ' A m (1 , 2 ' - 0 - ジメチルアデノシン) ; x m 5 U (5 - タウリノメチルウリジン) ; x m V U (5 - タウリノメチル - 2 - チオウリジン) ; i m G - 1 4 (4 - デメチルウイオシン) ; i m G 2 (イソウイオシン) ; 又は a c 6 A (N 6 - アセチルアデノシン) がある。各可能性は、本発明の別々の実施形態を表す。(米国特許第 9 , 7 5 0 , 8 2 4 号を参照)。

10

【 0 2 2 5 】

変異対立遺伝子を特異的に標的とするガイド配列

一定の遺伝子には数千の S N P が含まれてもよい。遺伝子の各 S N P を標的とするために 2 4 塩基対の標的ウィンドウを使用すると、数十万個のガイド配列が必要となるだろう。S N P を標的とするよう利用されるときいかなる与えられたガイド配列であっても、ガイド配列が分解する、活性が制限される、活性がなくなる、又はオフターゲット効果が生じることがある。したがって、一定の遺伝子を標的とするには適切なガイド配列が必要である。本発明によって、変異タンパク質の発現をノックアウトし、E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化し、そして S C N 又は C y N を治療するためのガイド配列の新規なセットが同定された。

20

【 0 2 2 6 】

本開示は、機能性対立遺伝子は未修飾のままの一方で変異対立遺伝子を不活性化するために特異的に標的とすることができるガイド配列を提供する。本発明のガイド配列は、変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子との間で特異的に区別するように設計され、区別する可能性が最も高い。不活性化させたいと望まれる変異対立遺伝子を標的とする全ての可能なガイド配列のうち、本発明において開示される特異的なガイド配列は、開示される実施形態で機能するのに特に効果的である。

【 0 2 2 7 】

簡潔に言えば、ガイド配列は、以下の、(1) 母集団、特定の民族集団又は患者集団での有病率が 1 % を超えて高く、同一の集団での S N P / 挿入 / 欠失 / インデルヘテロ接合率が 1 % を超える、ヘテロ接合性 S N P / 挿入 / 欠失 / インデルを標的とし、(2) 例えば、プロモーター、U T R、エキソン又はイントロン等の、遺伝子の任意の部分から 5 k 塩基以内等の、遺伝子の部分に近位の S N P / 挿入 / 欠失 / インデルの位置を標的とし、(3) 疾患 / 遺伝子のための創始者又は一般的な病原性変異を標的とする R N A 分子を使用して変異対立遺伝子を標的とするような特性を有してもよい。いくつかの実施形態において、母集団、特定の民族集団又は患者集団での S N P / 挿入 / 欠失 / インデルの有病率は、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 % 又は 1 5 % を超え、同一の集団での S N P / 挿入 / 欠失 / インデルヘテロ接合率は、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 % 又は 1 5 % を超える。各可能性は、別々の実施形態を表し、随意に組み合わせてもよい。

30

40

【 0 2 2 8 】

各遺伝子について、S N P / 挿入 / 欠失 / インデルにしたがって、変異対立遺伝子を不活性化するために以下の (1) 1 個の R N A 分子を使用するノックアウト戦略 C R I S P R ヌクレアーゼを変異対立遺伝子に向けさせて二本鎖切断 (D S B) を作成し、変異対立遺伝子のエキソン又はスプライス部位領域でフレームシフト変異を形成するために、1 個の R N A 分子を利用する、(2) 2 個の R N A 分子を使用するノックアウト戦略 2 個の R N A 分子を利用する。第 1 の R N A 分子は、変異対立遺伝子のプロモーター内の領域又は変異対立遺伝子上流領域を標的とし、別の R N A 分子は、変異対立遺伝子のプロモ

50

ーター、エキソン又はイントロン内の第1のRNA分子の下流を標的とする、(3)エキソン(複数含む)スキッピング戦略 スプライス部位を破壊するために、イントロンの5'末端(ドナー配列)又はイントロンの3'末端(アクセプター配列)の何れかのスプライス部位領域にCRISPRヌクレアーゼを向けさせるために1個のRNA分子を使用してもよい。戦略のうち任意の1つを使用してもよい。あるいは、第1のRNA分子はエキソンの上流領域を標的とし、第2のRNA分子は第1のRNA分子の下流領域の標的とし、それによりエキソン(複数含む)を切除するように、2個のRNA分子を利用してもよい。各変異対立遺伝子について同定されたSNP/挿入/欠失/インデルの位置に基づいて、変異対立遺伝子を不活性化するための上述した方法のいずれか1つ、又は組み合わせを利用してもよい。

10

【0229】

1個のRNA分子のみを使用するときは、SNPの位置がエキソンの中にあるか、又はイントロンとエキソンとの間のスプライス部位のきわめて近く(20塩基対内等)にあるときである。2個のRNA分子を使用するとき、ガイド配列は、第1のSNPが、5'非翻訳領域内、プロモーター内又は転写開始点の5'最初の2キロベース等の、エキソン1の上流にあり、第2のSNPが、転写開始点の5'最初の2キロベース、イントロン1、2又は3内又はエキソン1、2又は3内等の、第1のSNPの下流であるように、2個のSNPを標的としてもよい。

【0230】

本発明のガイド配列は、標的とする遺伝子上流部分、好ましくは標的とする遺伝子の最後のエキソンの上流部分のSNPを標的としてもよい。ガイド配列は、エキソン1の上流、例えば、5'非翻訳領域内、プロモーター内又は転写開始点の5'最初の4~5キロベース内のSNPを標的としてもよい。

20

【0231】

本発明のガイド配列はまた、既知のプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)部位のきわめて近く(50塩基対内、より好ましくは20塩基対内等)のSNPを標的としてもよい。

【0232】

本発明のガイド配列はまた、(1)標的とする遺伝子のヘテロ接合性SNP、(2)遺伝子上流及び下流のヘテロ接合性SNP、(3)母集団、特定の民族集団又は患者集団での、SNP/挿入/欠失/インデルの有病率が1%を超えるSNP、(4)グアニジン-シトシン含有量が30%を超えて85%未満である、(5)4以上のチミン/ウラシル反復配列または8以上のグアニン、シトシン又はアデノシン反復配列がない、(6)オフターゲット解析によって同定されたオフターゲットがない、及び(7)好ましくはイントロンよりエキソンを標的とするか、又はSNPの下流よりもSNPの上流である、ものを標的としてもよい。

30

【0233】

本発明の実施形態において、SNPは、遺伝子上流又は下流であってもよい。本発明の実施形態において、SNPは、遺伝子上流又は下流4,000塩基対内である。

【0234】

変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子との間で異なる少なくとも1つのヌクレオチドは、関心のある遺伝子の疾患発症性変異配列の上流、下流又は内部であってもよい。変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子との間で異なる少なくとも1つのヌクレオチドは、関心のある遺伝子のエキソン内部又はイントロン内部にあってよい。いくつかの実施形態において、変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子との間で異なる少なくとも1つのヌクレオチドは、関心のある遺伝子のエキソン内部にある。いくつかの実施形態において、変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子との間で異なる少なくとも1つのヌクレオチドは、関心のある遺伝子のエキソン内部又はイントロン内部にある、すなわちイントロンとエキソンの間のスプライス部位のきわめて近く、例えば、スプライス部位の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20ヌクレオチ

40

50

ド上流又は下流にある。

【0235】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つのヌクレオチドは、一塩基多型(SNP)である。いくつかの実施形態において、SNPのヌクレオチドバリエーションの各々は、変異対立遺伝子で発現してもよい。いくつかの実施形態において、SNPは、創始者又は一般的な病原性変異であってもよい。

【0236】

ガイド配列は、(1)母集団で1%を超える等の、母集団での有病率が高いこと、そして(2)1%を超える等の、母集団でのヘテロ接合率が高いことの両方を持つSNPを標的としてもよい。ガイド配列は、世界中に分布するSNPを標的としてもよい。SNPは、創始者又は一般的な病原性変異であってもよい。いくつかの実施形態において、母集団での有病率は、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%又は15%を超える。各可能性は、別々の実施形態を表す。いくつかの実施形態において、母集団でのヘテロ接合率は、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%又は15%を超える。各可能性は、別々の実施形態を表す。

10

【0237】

いくつかの実施形態において、変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子との間で異なる少なくとも1つのヌクレオチドは、集団において有病率が高い疾患発症性変異と関連づけられる/共存する。このような実施形態において、「有病率が高い」とは、少なくとも92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%を指す。各可能性は、本発明の別々の実施形態を表す。1つの実施形態において、変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子との間で異なる少なくとも1つのヌクレオチドは、疾患発症性変異である。いくつかの実施形態において、SNPは集団内で高度に蔓延している。このような実施形態において、「高度に蔓延している」とは、集団の少なくとも10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、30%、40%、50%、60%又は70%を指す。各可能性は、本発明の別々の実施形態を表す。

20

【0238】

本発明のガイド配列は、上記基準のいずれか1つを満たしてもよく、変異対立遺伝子に対応する機能性対立遺伝子と区別する可能性が最も高い。

30

【0239】

いくつかの実施形態において、RNA分子は、以下の表1に示されるようなSNP由来のELANE遺伝子に存在するヘテロ接合性SNPを標的とする。SNPの詳細は左から1番目のカラムに示され、SNP IDを含む(一塩基多型のNCBIの2018年版データベース(dbSNP)に基づく)。rs番号がないバリエーションについては、バリエーションの特性をgnomAD 2018ブラウザーデータベースに基づいて示した。2番目のカラムでは、各SNPに割り当てられた識別子を示す。3番目のカラムでは、ELANE遺伝子上での各SNPの位置を示す。

40

50

【表 1】

表 1 : *ELANE* 遺伝子の SNP

RSID	SNP番号	遺伝子中のSNP位置
rs9749274	s1	下流+972bp
rs740021	s2	上流 -198bp
rs201048029	s3	上流 -2614bp
rs199720952	s4	下流 +173bp
rs28591229	s5	下流 +2053bp
rs71335276	s6	下流 +3125bp
rs58082177	s7	上流 -2840bp
rs3826946	s8	上流 -2103bp
rs10413889	s9	上流 -2003bp
rs3761005	s10	上流 -1509bp
rs761481944	s11	下流 +2824bp
rs3761008	s12	上流 -2279bp
rs10409474	s13	上流 -1569bp
rs3761007	s14	上流 -1728bp
rs1683564	s15	下流 +2971bp
rs17216649	s16	エキソン5の5
rs10469327	s17	下流 +2133bp
rs8107095	s18	下流 +3588bp
rs10414837	s19	上流 -2684bp
rs10424470	s20	上流 -3504bp
rs78302854	s21	下流 +862bp

10

20

30

【0240】

図5ではヒト集団において表1から選択されたある一定のSNPの異型遺伝子性を開示する。

【0241】

本発明の実施形態は、SNP位置の上流からイントロン3、イントロン4又は3'UTRまでのプロモーター領域を切除することを含んでもよい。ある実施形態において、第1のガイド配列は、変異対立遺伝子の上流領域のヘテロ接合性SNPの特異的な配列(戦略1a rs10414837、戦略1b-rs3761005)を標的とし、第2のガイド配列は、遺伝子の2個の対立遺伝子に共通するイントロン4の配列を標的とする(図1)。さらなる実施形態において、第1のガイド配列は、変異対立遺伝子の上流領域のヘテロ接合性SNPの特異的な配列(戦略1a rs10414837、戦略1b-rs3761005)を標的とし、第2のガイド配列は、遺伝子の2個の対立遺伝子に共通するイントロン3の配列を標的とする。別の実施形態において、第1のガイド配列は、変異対立遺伝子の上流領域のヘテロ接合SNPの特異的な配列(戦略1a rs10414837、戦略1b-rs3761005)を標的とし、第2のガイド配列は、遺伝子の2個の対立遺伝子に共通する3'UTRの配列を標的とする(図2)。

40

【0242】

本発明の実施形態は、イントロン3、イントロン4又は3'UTRから3'UTRの下流の領域を切除することを含んでもよい。ある実施形態において、第1のガイド配列は、変異対立遺伝子の上流領域のヘテロ接合性SNP位置の特異的な配列(戦略2-rs168

50

3564)を標的とし、第2のガイド配列は遺伝子の2個の対立遺伝子に共通するイントロン4の配列を標的とする。さらなる実施形態において、第1のガイド配列は、変異対立遺伝子の上流領域のヘテロ接合性SNP位置の特異的な配列(戦略2-rs1683564)を標的とし、第2のガイド配列は遺伝子の2個の対立遺伝子に共通するイントロン3の配列を標的とする。さらなる実施形態において、第1のガイド配列は、変異対立遺伝子の上流領域のヘテロ接合性SNP位置の特異的な配列(戦略2-rs1683564)を標的とし、第2のガイド配列は遺伝子の2個の対立遺伝子に共通する3'UTRの配列を標的とする(図3)。

【0243】

本発明の実施形態は、イントロン3、イントロン4又は3'UTRから3'UTRの下流領域までを切除する。この戦略は、健全な対立遺伝子は無傷のままにする一方、疾患発症性対立遺伝子(「変異対立遺伝子」)を特異的にノックアウトするよう設計される。対立遺伝子特異的編集は、集団におけるヘテロ接合頻度が比較的高い区別する(ヘテロ接合性)SNP位置を標的とするガイドを使用することにより達成される(図4)。

【0244】

細胞への送達

例示される方法において、本明細書において記載されるRNA分子及び組成物を任意の適切な手段により標的細胞又は対象に送達してもよいことが理解される。以下の実施形態は、本発明のRNA分子及び組成物を送達する方法の非限定的な例を提供する。

【0245】

いくつかの実施形態において、本発明のRNA分子及び組成物は、任意の哺乳類又は植物細胞を含む、ドミナントネガティブな対立遺伝子を含む及び/又は発現する任意の細胞を標的としてもよい。例えば、1つの実施形態において、RNA分子は、変異ELANE対立遺伝子の特異的に標的とし、標的細胞は、肝細胞である。

【0246】

本主題発明の、RNA分子組成物等の、核酸組成物を送達するために、任意の適切なウイルス性ベクターシステムを使用してもよい。従来のウイルス性又は非ウイルス性に基づく遺伝子導入方法は、核酸及び標的組織を導入するために使用することができる。特定の実施形態において、核酸は、インビトロ又はエクスピボ遺伝子治療用途で投与される。非ウイルス性ベクター送達システムは、裸の核酸及びリポソーム又はポロキサマー等の送達媒体と複合体を形成する核酸を含む。遺伝子治療方法を概説するため、Anderson(1992)Science 256:808-813、Nabel & Feigner(1993)TIBTECH 11:211-217、Mitani & Caskey(1993)TIBTECH 11:162-166、Dillon(1993)TIBTECH 11:167-175、Miller(1992)Nature 357:455-460、Van Brunt(1988)Biotechnology 6(10):1149-1154、Vigne(1995)Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36、Kremer & Perricaudet(1995)British Medical Bulletin 51(1):31-44、Haddada et al.(1995)in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohm(eds.)、及びYu et al.(1994)Gene Therapy 1:13-26を参照する。

【0247】

核酸及び/又はタンパク質の非ウイルス性送達方法としては、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、粒子銃加速器、ピロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、脂質ナノ粒子(LNP)、ポリカチオン又は脂質:核酸複合体、人工ビリオン及び核酸の薬剤増強取込みがあり、又は細菌もしくはウイルス(アグロバクテリウム、根粒菌属、NGR234、Sinorhizobium loti、Mesorhizobium loti、タバコモザイクウイルス、ジャガイ

10

20

30

40

50

モウウイルスX、カリフラワーモザイクウイルス及びキャッサバ葉脈モザイクウイルス等)によって植物に送達することができる。(Chung et al. (2006) Trends Plant Sci. 11(1):1-4等を参照)。Sonitron 2000 system (Rich-Mar)等を使用するSonoporationも、核酸を送達するために使用することができる。タンパク質及び/又は核酸のカチオン性脂質媒介送達も、インピボ又はインピトロ送達方法として熟慮される。(Zuris et al. (2015) Nat. Biotechnol. 33(1):73-80を参照; Coelho et al. (2013) N. Engl. J. Med. 369, 819-829; Judge et al. (2006) Mol. Ther. 13, 494-505; 及びBasha et al. (2011) Mol. Ther. 19, 2186-2200も参照。)

10

【0248】

さらなる代表的な核酸送達システムとしては、Amaxa RTM Biosystems (ケルン、ドイツ)、Maxcyte, Inc. (ロックビル、Md.)、BTX Molecular Delivery Systems (ホリストン、Mass.)及びCopernicus Therapeutics Incによって提供されるものがある(米国特許第6,008,336号等を参照)。リポフェクションは、米国特許第5,049,386号、米国特許第4,946,787号及び米国特許第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(Transfectam.TM.、Lipofectin.TM.及びLipofectamine.TM. RN AiMAX等)。ポリヌクレオチドの効率的なレセプター認識リポフェクションに適したカチオン性及び中性脂質としては、Feigner、WO91/17424、WO91/16024のものがある。送達を細胞(エクスピボ投与)又は標的組織(インピボ投与)に対してすることができる。

20

【0249】

イムノリポド複合体等の標的リポソームを含む、脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である(Crystal (1995) Science 270:404-410; Blaeseら(1995) Cancer Gene Ther. 2:291-297; Behrら(1994) Bioconjugate Chem. 5:382-389; Remyら(1994) Bioconjugate Chem. 5:647-654; Gaoら(1995) Gene Therapy 2:710-722; Ahmadら(1992) Cancer Res. 52:4817-4820; 米国特許第186,183号、同4,217,344号、同4,235,871号、同4,261,975号、同4,485,054号、同4,501,728号、同4,774,085号、同4,837,028号及び同4,946,787号等を参照)。

30

【0250】

さらなる送達方法としては、送達される核酸をEnGene IC送達担体(EDV)にパッケージングすることの使用がある。これらのEDVは、抗体の一方の腕が標的細胞への特異性を有し、他方がEDVへの特異性を有する二重特異性抗体を使用して標的細胞に特異的に送達される。この抗体は、EDVを標的細胞表面まで運び、次にEDVは細胞内へとエンドサイトーシスにより運ばれる。一度でも細胞内に入れば、内容物が放出される(MacDiarmidら(2009) Nature Biotechnology 27(7):643を参照)。

40

【0251】

核酸をウイルス媒介送達するためにRNA又はDNAウイルスベースシステムを使用すると、ウイルスを体内の特定の細胞にターゲティングし、ウイルスペイロードを核へ輸送するための高度に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターを患者に直接投与することもできるし(インピボ)、又は細胞をインピトロで処理し、改変細胞を患者に投与することもできる(エクスピボ)。核酸を送達するための従来のウイルスベースシステムとしては、遺伝子導入用の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

50

ルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアベクター及び単純ヘルペスベクターがあるが、これに限定されるものではない。

【0252】

レトロウイルスの指向性は、異種エンベロープタンパク質を組み込むことによって変化させることができ、標的細胞の潜在的な標的集団を拡大させることができる。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入するか感染し、一般的に高いウイルス力価を引き起こすことができるレトロウイルスベクターである。レトロウイルス遺伝子導入システムの選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、6～10 kbまでの異種配列をパッケージする能力を有するシス作用性末端反復配列から成る。最小シス作用性LTRは、ベクターを複製しパッケージするのに十分であり、次に治療遺伝子を標的細胞に組み込んで持続的な導入遺伝子発現を提供するために使用される。広く用いられるレトロウイルスベクターとしては、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)及びその組み合わせに基づくものがある(例えば、Buchschacherら(1992) J. Virol. 66: 2731-2739; Johannら(1992) J. Virol. 66: 1635-1640; Sommerfeltら(1990) Virol. 176: 58-59; Wilsonら(1989) J. Virol. 63: 2374-2378; Millerら(1991) J. Virol. 65: 2220-2224; PCT/US94/05700等を参照)。

10

【0253】

臨床試験において、少なくとも6個のウイルスベクター手法が現在利用可能であり、ヘルパー細胞株に挿入された遺伝子により欠損ベクターを補完して形質導入薬剤を生成することを含む手法を利用する。

20

【0254】

pLASN及びMFG-Sは、臨床試験において使用されてきたレトロウイルスベクターの例である(Dunbarら(1995) Blood 85: 3048-305; Kohnら(1995) Nat Med. 1: 1017-102; Malechら(1997) PNAS 94: 2212133-12138)。PA317/pLASNは、遺伝子治療治療において使用された最初の治療ベクターであった(Blaeseら(1995))。MFG-Sをパッケージしたベクトルについて50%以上の形質導入効率が観察された(Ellemら(1997) Immunol Immunother. 44(1): 10-20; Dranoffら(1997) Hum. Gene Ther. 1: 111-2)。

30

【0255】

パッケージングセルは、宿主細胞に感染することができるウイルス粒子を形成するために使用される。このような細胞には、アデノウイルス、AAVをパッケージする293細胞、及びレトロウイルスをパッケージするPsi-2 cells又はPA317が含まれる。遺伝子治療に使用されるウイルスベクターは通常、核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージする生産細胞株によって作成される。このベクターは通常、パッケージングし、その後宿主に組み込む(適用可能な場合)ために必要とされる最小のウイルス配列を含み、他のウイルス配列は、発現されるタンパク質をコードする発現カセットによって置換される。欠損しているウイルス機能は、パッケージングセルラインによってトランスで供給される。例えば、遺伝子治療で使用されるAAVベクターは、一般的にはパッケージングし、宿主ゲノムに組み込むために必要とされる、AAVゲノムからの末端逆位配列(ITR)のみを持つ。ウイルスDNAは細胞株にパッケージされ、そこには他のAAV遺伝子、すなわちrep及びcapをコードするが、ITR配列を欠いているヘルパープラスミドが含まれる。細胞株は、ヘルパーとしてのアデノウイルスにも感染する。ヘルパーウイルスは、AAVベクターの複製とヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドは、ITR配列を欠いているので相当量はパッケージされていない。アデノウイルスによる汚染を、アデノウイルスの方がAAVより感受性が高い熱処理等によって低減することができる。さらに、AAVは、バキュロウイルスシステムを使

40

50

用して臨床規模で作成することができる（米国特許第7,479,554号を参照）。

【0256】

多くの遺伝子治療適用において、遺伝子治療ベクターは、特定の組織タイプに対して高い特異性で送達されることが望ましい。したがって、ウイルスベクターを、ウイルスコートタンパク質がこのウイルスの外表面にある融合タンパク質としてのリガンドを発現することによってある一定の細胞タイプに特異性を有するよう改変することができる。このリガンドは、関心のある細胞タイプに存在すると知られている受容体に親和性を有するよう選択される。例えば、Hanら(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751で、モロニーマウス白血病ウイルスをgp70に融合したヒトヘレグリンを発現するよう改変することができ、組換えウイルスは、ヒト上皮増殖因子受容体を発現した特定のヒト乳がん細胞に感染することが報告された。この原理を、標的細胞は受容体を発現し、ウイルスは細胞表面受容体のためのリガンドを含む融合タンパク質を発現する、他のウイルス標的細胞ペアに拡張することができる。例えば、繊維状ファージを、実質的にあらゆる選択された細胞の受容体に対する特異的結合親和性を有する抗体断片(FAB又はFv等)を呈するよう操作することができる。上の記述は主にウイルスベクターに適用されるけれども、同一の原理を非ウイルス性ベクターに適用することができる。このようなベクターを、特異的な標的細胞による取り込みを好む特異的取り込み配列を含むよう操作することができる。

10

【0257】

遺伝子治療ベクターを、個々の患者に、一般的に全身投与（例えば、硝子体内、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下又は脳内注入）又は上述したような、局所投与によりインビボで送達することができる。あるいは、ベクターを、個々の患者から外植した細胞（例えば、リンパ球、骨髄穿刺法、細胞生検等）又は万能ドナー造血幹細胞などの、細胞にエクスピボで送達することができ、通常ベクターを組み込んだ細胞を選択した後に、続けて患者に細胞を再移植する。

20

【0258】

診断、研究のため、又は遺伝子治療（例えば、遺伝子導入した細胞の宿主生物への再注入を介して）のためのエクスピボ細胞遺伝子導入は、当業者に周知である。好ましい実施形態において、細胞を対象生物から単離し、核酸組成物を用いて遺伝子導入し、対象生物（患者等）に再注入する。エクスピボ遺伝子導入に適した各種細胞タイプは、当業者に周知である（例えば、Freshneyら(1994) Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 3rd ed及び、患者からの細胞の単離及び培養方法を考察するためのそこに引用されている参考文献を参照）。

30

【0259】

適した細胞には、真核細胞及び/又は細胞株が含まれるが、これに限定されるものではない。このような細胞又はこのような細胞から作製される細胞株の非限定的な例としては、COS、CHO（例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV等）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NSO、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293（例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T等）、perC6 cells、任意の植物細胞（分化型又は未分化型）、及びSpodoptera fugiperda (Sf)等の昆虫細胞又はサッカロミセス、ピキア及びシゾサッカロミセス等の真菌細胞がある。特定の実施形態において、細胞株は、CHO-K1、MDCK又はHEK293細胞株である。さらに、初代細胞を単離し、治療される患者に再導入して続けてガイドされたヌクレアーゼシステム(CRISPR/Cas等)による治療をするためにエクスピボで使用してもよい。適した初代細胞には、末梢血単核球(PBMC)、及び限定されるものではないが、CD4+T細胞又はCD8+T細胞等の他の血液細胞サブセットが含まれる。適した細胞としてはまた、例として、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞(CD34+)、神経型幹細胞及び間葉系幹細胞等の幹

40

50

細胞がある。

【0260】

1つの実施形態において、幹細胞は、細胞遺伝子導入及び遺伝子治療のためのエクスピボ方法において使用される。幹細胞を使用する利点は、インピトロで他の細胞タイプに分化できること、又は骨髓内に生着するだろう哺乳類（細胞のドナー等）に導入することができることである。GM-CSF、IFN-及びTNF-等のサイトカインを使用してCD34+細胞をインピトロで臨床的に重要な免疫細胞型に分化する方法が知られている（非限定的な例として、Inabara、J. Exp. Med. 176:1693-1702 (1992)を参照）。

【0261】

既知の方法を使用して、幹細胞を形質導入及び分化のために単離する。例えば、CD4+及びCD8+（T細胞）、CD45+（panB細胞）、GR-1（顆粒球）及びIad（分化抗体提示細胞）等の不必要な細胞と結合する抗体を用いて骨髓細胞をパニングすることにより、幹細胞を骨髓細胞から単離する（非限定的な例として、Inabara (1992) J. Exp. Med. 176:1693-1702を参照）。いくつかの実施形態において、既に改変された幹細胞を使用してもよい。

【0262】

一般的に、細胞は少なくとも1つの薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に投与される。成句「薬学的に許容される」とは、適切な医学的良識の範囲内であり、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応又は他の問題若しくは合併症なしで、妥当な利益/リスク比率でつりあった、ヒト及び動物の組織と接触して使用するのに適している、化合物、物質、組成物及び/又は剤形を指す。成句「薬学的に許容される担体」は、本明細書において使用するとき、物質を被包する液体、固体充填剤、希釈剤、賦形剤又は溶媒等の薬学的に許容される物質、組成物又は媒体を意味する。

【0263】

本明細書において記載されるRNA分子組成物のいずれの1つも、有糸分裂後の細胞又は活発に分裂しない、例えば停止細胞である、任意の細胞においてゲノム編集するのに適している。本発明のRNA分子組成物を使用して編集されることができ有糸分裂後の細胞の例は、肝細胞を含むが、これに限定されるものではない。

【0264】

治療核酸組成物を含むベクター（例えば、レトロウイルス、リポソーム等）を、インピボで細胞に形質導入するために生物に直接投与することもできる。投与は、注射、注入、局所投与（点眼及びクリーム等）及びエレクトロポレーションを含むが、これに限定されるものではない、分子を血液細胞又は組織細胞と究極的に接触させて導入するために通常使用される経路のいずれかである。このような核酸を投与するのに適した方法は、当業者に利用可能であり、周知であり、特定の組成物を投与するために1つを超える経路を使用できるけれども、特定の経路が別の経路より即時で効果的な反応を提供できることが多い。いくつかの実施形態によれば、組成物は、IV注射により送達される。

【0265】

免疫細胞（T細胞等）に導入遺伝子を導入するのに適したベクターには、非組み込みレンチウイルスベクターが含まれる。米国特許出願公開第2009-0117617号を参照する。

【0266】

薬学的に許容される担体は、投与される特定の組成物によって、及び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部分的に決定される。したがって、以下に記載するように、利用可能な医薬品組成物の多種多様の適した製剤がある（Remington's Pharmaceutical Sciences、17th ed.、1989等を参照）

【0267】

いくつかの実施形態によれば、RNAでガイドされるDNAヌクレアーゼと結合する/関連している及び/又はRNAでガイドされるDNAヌクレアーゼを関心のある遺伝子の

10

20

30

40

50

変異誘発遺伝子と機能性対立遺伝子との間に差がある少なくとも1つのヌクレオチド（SNP等）を含む配列（機能性対立遺伝子には存在しない変異誘発遺伝子の配列等）に向けさせるRNA分子を提供する。この配列は、疾患関連変異内部にあってもよい。この配列は、疾患関連変異の上流又は下流にあってもよい。変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子との間のいかなる配列の差も機能性対立遺伝子の活性を保存する一方、本発明のRNA分子によって変異対立遺伝子を不活性化するため、そうでなければ変異対立遺伝子のドミナントな疾患発症性効果を無効にするために、標的となってもよい。

【0268】

開示される組成物及び方法はまた、患者のドミナントな遺伝障害を治療するための薬物の製造に使用されてもよい。

【0269】

本明細書において開示されるいくつかの実施形態についての作用機構

SCN又はCyNを引き起こすと証明されたELANEの変異は、切断型N-終端タンパク質を生成するフレームORF（オープンリーディングフレーム）の代替物からの翻訳を媒介し、その結果ER及びタンパク質ミスフォールディングストレスの原因となる。

【0270】

いかなる理論又は機構にも拘束されることを望むものではないが、本発明は、SCN又はCyNを防止、寛解又は治療するために、CRISPRヌクレアーゼを適用して変異した病原性ELANE対立遺伝子の発現を防止するか、変異した病原性対立遺伝子から切断型非病原性ペプチドを作成するか、又は変異した病原性ELANEを修復/修正するなど、変異した病原性ELANE対立遺伝子进行处理するが機能性ELANE対立遺伝子は処理しないために利用される。

【0271】

ORFの上流又は下流に位置するSNPを利用するいくつかの別の編集戦略を適用してもよい。この戦略には、全遺伝子の除去、遺伝子のC-終端を除去するための遺伝子の切断及び遺伝子の発現の減弱が含まれる。

【0272】

いくつかの実施形態において、2個のガイド（表2に開示されたガイド等）を、全遺伝子（すなわちエキソン1、2、3、4及び5）を除去して変異タンパク質をノックアウトするために利用してもよい。いくつかの実施形態において、第1のガイドRNAを、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子のORF上流に位置するSNP/WT配列を標的とすることにより対立遺伝子特異的DSBを媒介するために利用し、第2のガイドRNAを、ELANE遺伝子のエキソン5に位置する又は変異対立遺伝子の下流に位置するSNP/WT配列、又はELANE遺伝子の対立遺伝子のイントロン4、3'UTR又は下流に位置する配列、又はELANE遺伝子の対立遺伝子のイントロン4、3'UTR又は下流に位置するSNP/WT配列にDSBを媒介するために利用してもよい。

【0273】

エキソン3までに位置する終止コドンを獲得することになるフレームシフト変異を抱える健康な個人の記録がある。したがって、可能性のある戦略は、最大でエキソン1から3までを含むように変異対立遺伝子を切断することであってもよい。いくつかの実施形態において、2個のガイド（表2に開示されたガイド等）を、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子のc-終端を切断するために利用してもよい。いくつかの実施形態において、第1のガイドRNAを、変異対立遺伝子のエキソン5又は下流のSNP/WT配列を標的とすることにより対立遺伝子特異的DSBを媒介するために利用してもよく、第2のガイドRNAを、ELANE遺伝子のイントロン1、2又は3に位置する配列又はSNP/WT配列のDSBを媒介するために利用してもよい。切断型変異対立遺伝子によってコードされたペプチド/タンパク質は、病原性効果を示さなくてもよい。あるいは、ナンセンス変異依存mRNA分解機構をトリガーとして変異対立遺伝子の発現をノックアウトしてもよい。結果をmRNA及びタンパク質発現を検査することにより検証してもよい。

【0274】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、変異対立遺伝子の発現を、ORF上流に位置するSNPを使用して配列を近位プロモーター及びエンハンサー領域から要素を切除することにより減弱してもよい。非限定的な例において、SNPを標的とすることによりエンハンサー領域の大部分を切除することにより、かなりの減少を達成してもよい。

E L A N E 遺伝子の変異対立遺伝子を特異的に標的とするRNAガイド配列の例

【0275】

多くのガイド配列は、変異対立遺伝子を標的とするよう設計することができるけれども、以下の配列番号1~1192によって特定される表2に記載されたヌクレオチド配列は、本明細書に記載されている方法を効果的に実行するために、そして対立遺伝子間を効果的に区別するために特異的に選択された。

10

【0276】

コラム1~4を参照すると、コラム1に示される配列番号1~1192の各々は、操作されたガイド配列に対応する。対応するSNPの詳細は、コラム2に示される。2番目のコラムに示されるSNPの詳細は、表1に示されるSNP IDに対応する各SNPに割り当てられた識別子を示す。コラム3は、各ガイド配列の標的が示される部位でE L A N E 遺伝子の多型か野生型配列かどうかを示す。コラム4は、示される部位での各ガイド配列のグアニン - シトシン含有量を示す。

【0277】

表2では、変異E L A N E 対立遺伝子配列内部の異なるSNPと関連づけて上記実施形態において記載されるように使用するために設計されたガイド配列を示す。各操作されたガイド分子はさらに、配列NGG又はNAG(「N」は任意の核酸塩基である)と適合するPAM等の、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に接して位置する関心のある標的ゲノムDNA配列と関連するように設計される。このガイド配列は、SpCas9WT(PAM SEQ:NGG)、SpCas9.VQR.1(PAM SEQ:NGAN)、SpCas9.VQR.2(PAM SEQ:NGNG)、SpCas9.EQR(PAM SEQ:NGAG)、SpCas9.VRER(PAM SEQ:NGCG)、SaCas9WT(PAM SEQ:NNGRRT)、NmCas9WT(PAM SEQ:NNNNGATT)、Cpf1(PAM SEQ:TTTV)又はJeCas9WT(PAM SEQ:NNNVRYM)等を含むが、これに限定されない、1つ又は複数の異なるCRISPRヌクレアーゼと組み合わせるよう設計された。本発明のRNA分子は各々、1つ又は複数の異なるCRISPRヌクレアーゼと組み合わせる複合体を形成するよう設計され、利用されるCRISPRヌクレアーゼに対してそれぞれ1つ又は複数の異なるPAM配列を利用して関心のあるポリヌクレオチド配列を標的とするよう設計される。

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2 : *ELANE* 遺伝子の特異的 SNP と関連するよう設計されたガイド配列

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
1	s1	REF	35%
2	s1	ALT	30%
3	s1	REF	35%
4	s1	ALT	30%
5	s1	REF	40%
6	s2	両方	30%
7	s3	両方	30%
8	s1	ALT	35%
9	s1	REF	40%
10	s2	REF	30%
11	s4	両方	45%
12	s3	両方	30%
13	s5	ALT	55%
14	s5	REF	60%
15	s1	ALT	35%
16	s1	REF	45%
17	s6	REF	60%
18	s6	ALT	55%
19	s2	両方	35%
20	s7	ALT	30%
21	s8	ALT	45%
22	s9	ALT	55%
23	s9	REF	60%
24	s5	ALT	60%
25	s5	REF	65%
26	s10	REF	55%
27	s11	REF	55%
28	s1	ALT	40%
29	s12	ALT	30%
30	s2	ALT	35%
31	s1	REF	45%
32	s6	REF	65%
33	s6	ALT	60%
34	s13	REF	60%
35	s13	ALT	60%

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
36	s2	両方	35%
37	s4	両方	45%
38	s6	ALT	50%
39	s12	ALT	30%
40	s1	REF	30%
41	s3	両方	35%
42	s12	ALT	35%
43	s12	REF	30%
44	s14	ALT	65%
45	s8	ALT	45%
46	s5	ALT	50%
47	s5	REF	55%
48	s9	ALT	60%
49	s9	REF	65%
50	s5	ALT	60%
51	s11	REF	60%
52	s15	REF	70%
53	s9	ALT	45%
54	s9	REF	50%
55	s5	REF	65%
56	s11	REF	55%
57	s10	REF	60%
58	s16	REF	75%
59	s1	両方	45%
60	s11	REF	55%
61	s8	ALT	40%
62	s8	REF	40%
63	s1	ALT	40%
64	s17	REF	60%
65	s10	ALT	60%
66	s10	REF	60%
67	s2	REF	35%
68	s2	ALT	30%
69	s8	REF	45%
70	s10	ALT	55%
71	s2	REF	30%
72	s12	REF	30%
73	s12	ALT	35%
74	s2	ALT	35%

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
75	s2	REF	35%
76	s2	ALT	30%
77	s1	REF	50%
78	s7	ALT	35%
79	s6	ALT	65%
80	s6	REF	70%
81	s18	ALT	70%
82	s19	REF	55%
83	s6	REF	70%
84	s6	ALT	65%
85	s11	REF	60%
86	s19	ALT	50%
87	s15	REF	50%
88	s5	REF	65%
89	s5	ALT	60%
90	s18	両方	70%
91	s8	ALT	35%
92	s8	REF	35%
93	s19	ALT	55%
94	s19	REF	60%
95	s9	ALT	70%
96	s16	REF	75%
97	s13	REF	60%
98	s13	ALT	60%
99	s8	REF	45%
100	s8	ALT	45%
101	s2	REF	40%
102	s16	REF	70%
103	s16	ALT	65%
104	s6	ALT	60%
105	s6	REF	65%
106	s20	REF	65%
107	s13	ALT	55%
108	s2	ALT	35%
109	s2	REF	40%
110	s6	ALT	65%
111	s6	REF	70%
112	s6	ALT	50%
113	s4	両方	45%

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
114	s18	ALT	70%
115	s19	REF	55%
116	s6	REF	70%
117	s6	ALT	65%
118	s11	REF	60%
119	s19	ALT	50%
120	s18	REF	70%
121	s18	ALT	75%
122	s15	REF	50%
123	s12	ALT	30%
124	s5	REF	60%
125	s5	ALT	55%
126	s13	REF	55%
127	s9	REF	55%
128	s9	ALT	50%
129	s18	両方	75%
130	s9	REF	75%
131	s18	ALT	75%
132	s18	REF	70%
133	s14	ALT	60%
134	s14	REF	65%
135	s19	両方	65%
136	s8	REF	35%
137	s8	ALT	35%
138	s12	REF	35%
139	s12	ALT	40%
140	s17	両方	40%
141	s8	両方	45%
142	s16	REF	70%
143	s8	ALT	35%
144	s8	REF	35%
145	s6	両方	55%
146	s1	ALT	35%
147	s1	REF	40%
148	s14	両方	55%
149	s12	ALT	30%
150	s12	両方	30%
151	s1	REF	35%
152	s5	ALT	55%

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
153	s5	REF	60%
154	s3	両方	40%
155	s12	ALT	35%
156	s12	REF	30%
157	s1	両方	45%
158	s16	REF	70%
159	s14	ALT	70%
160	s8	ALT	45%
161	s5	ALT	55%
162	s5	REF	60%
163	s14	両方	70%
164	s15	REF	60%
165	s6	ALT	55%
166	s6	REF	60%
167	s9	ALT	65%
168	s9	REF	70%
169	s5	REF	70%
170	s5	ALT	65%
171	s5	両方	65%
172	s5	ALT	65%
173	s19	ALT	60%
174	s11	REF	65%
175	s15	ALT	65%
176	s9	ALT	50%
177	s9	REF	55%
178	s5	REF	70%
179	s14	REF	70%
180	s19	REF	65%
181	s9	ALT	65%
182	s8	両方	45%
183	s12	ALT	40%
184	s12	REF	35%
185	s20	ALT	55%
186	s20	ALT	70%
187	s10	REF	60%
188	s10	ALT	60%
189	s13	REF	60%
190	s13	ALT	60%
191	s10	両方	70%

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
192	s14	REF	70%
193	s20	ALT	60%
194	s20	REF	55%
195	s12	ALT	30%
196	s2	両方	45%
197	s6	両方	50%
198	s16	ALT	65%
199	s15	REF	60%
200	s11	REF	55%
201	s14	REF	60%
202	s20	REF	65%
203	s17	ALT	60%
204	s20	ALT	70%
205	s11	REF	60%
206	s10	REF	65%
207	s20	REF	60%
208	s18	REF	75%
209	s5	ALT	65%
210	s20	ALT	70%
211	s9	REF	70%
212	s9	ALT	65%
213	s19	両方	55%
214	s15	両方	65%
215	s19	ALT	65%
216	s5	REF	60%
217	s5	ALT	55%
218	s6	ALT	55%
219	s8	REF	40%
220	s10	REF	65%
221	s10	ALT	65%
222	s6	REF	60%
223	s14	REF	60%
224	s19	REF	60%
225	s19	ALT	55%
226	s14	ALT	55%
227	s8	ALT	40%
228	s1	ALT	45%
229	s1	REF	50%
230	s11	REF	55%

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
231	s20	REF	50%
232	s8	ALT	40%
233	s12	ALT	30%
234	s8	REF	40%
235	s1	ALT	45%
236	s9	ALT	65%
237	s9	REF	70%
238	s8	ALT	40%
239	s11	REF	40%
240	s5	両方	40%
241	s17	ALT	60%
242	s17	REF	65%
243	s10	ALT	65%
244	s17	両方	60%
245	s10	REF	65%
246	s17	REF	65%
247	s17	ALT	60%
248	s2	REF	35%
249	s13	REF	60%
250	s13	ALT	55%
251	s13	REF	55%
252	s2	ALT	30%
253	s2	REF	35%
254	s12	ALT	30%
255	s8	REF	45%
256	s2	ALT	35%
257	s11	ALT	65%
258	s20	REF	50%
259	s20	ALT	55%
260	s11	REF	45%
261	s10	ALT	60%
262	s19	ALT	50%
263	s19	REF	55%
264	s5	REF	50%
265	s17	ALT	60%
266	s17	REF	65%
267	s2	REF	35%
268	s11	REF	60%
269	s17	ALT	45%

10

20

30

40

50

【表 2 - 8】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
270	s17	REF	50%
271	s2	REF	30%
272	s8	REF	45%
273	s12	REF	30%
274	s12	ALT	35%
275	s10	ALT	65%
276	s8	REF	40%
277	s8	ALT	40%
278	s20	ALT	45%
279	s6	REF	55%
280	s6	ALT	50%
281	s2	ALT	30%
282	s9	両方	65%
283	s4	REF	30%
284	s4	両方	50%
285	s9	ALT	55%
286	s9	REF	60%
287	s2	REF	30%
288	s6	ALT	55%
289	s11	REF	65%
290	s15	REF	70%
291	s9	REF	50%
292	s16	REF	75%
293	s2	REF	40%
294	s2	ALT	35%
295	s2	REF	40%
296	s2	ALT	35%
297	s1	REF	50%
298	s7	ALT	35%
299	s6	ALT	65%
300	s6	REF	70%
301	s11	REF	60%
302	s5	REF	70%
303	s5	ALT	65%
304	s18	両方	70%
305	s8	ALT	35%
306	s8	REF	35%
307	s19	ALT	60%
308	s19	REF	65%

10

20

30

40

50

【表 2 - 9】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
309	s7	ALT	30%
310	s16	REF	75%
311	s2	REF	30%
312	s6	ALT	65%
313	s6	REF	70%
314	s13	ALT	55%
315	s6	ALT	65%
316	s6	REF	70%
317	s6	ALT	50%
318	s18	REF	70%
319	s19	REF	55%
320	s6	REF	70%
321	s6	ALT	65%
322	s11	REF	65%
323	s19	ALT	50%
324	s18	REF	70%
325	s18	ALT	75%
326	s15	両方	55%
327	s5	REF	65%
328	s5	ALT	60%
329	s13	REF	55%
330	s18	両方	75%
331	s14	ALT	60%
332	s14	REF	65%
333	s8	REF	40%
334	s8	ALT	40%
335	s12	REF	35%
336	s12	ALT	40%
337	s17	両方	45%
338	s8	ALT	40%
339	s8	REF	40%
340	s14	両方	60%
341	s12	両方	35%
342	s1	両方	50%
343	s16	REF	70%
344	s16	ALT	65%
345	s15	ALT	60%
346	s15	REF	65%
347	s6	ALT	55%

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
348	s6	REF	60%
349	s5	REF	70%
350	s5	ALT	65%
351	s19	ALT	60%
352	s19	REF	65%
353	s9	ALT	70%
354	s8	両方	50%
355	s3	両方	45%
356	s10	REF	60%
357	s10	ALT	60%
358	s13	REF	65%
359	s13	ALT	65%
360	s14	REF	70%
361	s20	ALT	60%
362	s20	REF	55%
363	s14	REF	65%
364	s14	ALT	60%
365	s20	REF	70%
366	s17	ALT	65%
367	s20	ALT	75%
368	s11	REF	65%
369	s20	REF	65%
370	s5	ALT	65%
371	s9	REF	75%
372	s9	ALT	70%
373	s15	両方	65%
374	s19	ALT	65%
375	s8	REF	40%
376	s8	ALT	40%
377	s12	REF	30%
378	s17	REF	65%
379	s17	ALT	60%
380	s13	REF	60%
381	s13	ALT	60%
382	s13	REF	60%
383	s20	REF	50%
384	s20	ALT	55%
385	s5	REF	50%
386	s17	ALT	60%

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 1】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
387	s17	REF	65%
388	s13	ALT	60%
389	s17	ALT	50%
390	s17	REF	55%
391	s8	REF	45%
392	s10	ALT	65%
393	s8	REF	45%
394	s8	ALT	45%
395	s2	REF	40%
396	s9	ALT	60%
397	s9	REF	65%
398	s6	ALT	55%
399	s9	両方	50%
400	s16	REF	75%
401	s6	ALT	65%
402	s6	REF	70%
403	s11	REF	60%
404	s15	REF	55%
405	s16	REF	75%
406	s2	ALT	30%
407	s2	REF	35%
408	s13	ALT	55%
409	s18	REF	75%
410	s13	REF	55%
411	s14	両方	60%
412	s15	ALT	60%
413	s6	ALT	60%
414	s6	REF	65%
415	s8	両方	55%
416	s3	両方	50%
417	s10	REF	60%
418	s10	ALT	60%
419	s14	REF	65%
420	s14	ALT	60%
421	s20	REF	70%
422	s17	REF	65%
423	s17	ALT	60%
424	s13	ALT	60%
425	s13	REF	60%

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 2】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
426	s5	ALT	45%
427	s5	REF	50%
428	s17	ALT	60%
429	s17	REF	65%
430	s13	ALT	60%
431	s10	ALT	65%
432	s2	REF	40%
433	s13	ALT	60%
434	s18	REF	75%
435	s13	REF	60%
436	s15	ALT	65%
437	s15	REF	70%
438	s6	ALT	65%
439	s6	REF	70%
440	s8	両方	60%
441	s10	REF	65%
442	s10	ALT	65%
443	s17	REF	70%
444	s17	ALT	65%
445	s13	ALT	60%
446	s13	REF	60%
447	s10	ALT	70%
448	s1	REF	40%
449	s13	ALT	65%
450	s13	REF	65%
451	s15	ALT	65%
452	s15	REF	70%
453	s6	REF	55%
454	s17	REF	70%
455	s17	ALT	65%
456	s13	ALT	65%
457	s13	REF	65%
458	s6	REF	55%
459	s4	両方	45%
460	s5	REF	60%
461	s19	REF	70%
462	s19	ALT	65%
463	s18	ALT	75%
464	s17	REF	55%

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 3】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
465	s5	REF	60%
466	s19	REF	70%
467	s19	ALT	65%
468	s5	ALT	55%
469	s9	ALT	55%
470	s9	REF	60%
471	s17	REF	55%
472	s18	ALT	75%
473	s4	ALT	35%
474	s19	REF	60%
475	s13	両方	70%
476	s5	REF	55%
477	s19	REF	70%
478	s19	ALT	65%
479	s17	ALT	50%
480	s5	ALT	50%
481	s6	REF	70%
482	s6	ALT	65%
483	s15	REF	70%
484	s15	ALT	65%
485	s9	ALT	50%
486	s9	REF	55%
487	s18	REF	70%
488	s10	REF	70%
489	s17	REF	50%
490	s18	ALT	75%
491	s19	REF	60%
492	s16	REF	75%
493	s16	REF	75%
494	s13	両方	70%
495	s5	REF	50%
496	s5	REF	70%
497	s9	REF	55%
498	s16	両方	65%
499	s13	REF	60%
500	s13	ALT	60%
501	s16	ALT	70%
502	s16	REF	75%
503	s18	REF	75%

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 4】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
504	s19	REF	65%
505	s19	ALT	60%
506	s13	REF	65%
507	s11	REF	65%
508	s14	REF	60%
509	s16	ALT	70%
510	s17	ALT	50%
511	s5	ALT	45%
512	s18	REF	75%
513	s10	ALT	, 65%
514	s10	REF	65%
515	s6	REF	70%
516	s6	ALT	65%
517	s15	REF	70%
518	s14	ALT	55%
519	s14	REF	60%
520	s15	ALT	65%
521	s9	ALT	50%
522	s9	REF	55%
523	s17	REF	65%
524	s17	ALT	60%
525	s15	REF	55%
526	s12	ALT	30%
527	s5	REF	65%
528	s5	ALT	60%
529	s13	REF	60%
530	s17	REF	45%
531	s2	REF	35%
532	s9	REF	60%
533	s19	REF	60%
534	s11	REF	55%
535	s18	REF	75%
536	s16	REF	75%
537	s19	REF	65%
538	s19	ALT	60%
539	s8	ALT	40%
540	s8	REF	40%
541	s16	REF	70%
542	s13	両方	65%

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 5】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
543	s9	REF	75%
544	s5	REF	50%
545	s10	REF	60%
546	s10	ALT	60%
547	s17	REF	70%
548	s10	両方	70%
549	s5	REF	70%
550	s19	REF	70%
551	s18	REF	75%
552	s12	ALT	35%
553	s9	REF	50%
554	s14	ALT	65%
555	s14	REF	70%
556	s19	両方	65%
557	s8	ALT	45%
558	s8	REF	45%
559	s8	REF	40%
560	s8	ALT	40%
561	s13	REF	65%
562	s12	ALT	40%
563	s16	REF	65%
564	s13	REF	55%
565	s13	ALT	55%
566	s17	両方	45%
567	s12	ALT	40%
568	s12	REF	35%
569	s19	REF	55%
570	s19	ALT	50%
571	s8	両方	50%
572	s6	両方	45%
573	s8	REF	40%
574	s8	ALT	40%
575	s20	REF	50%
576	s20	ALT	55%
577	s16	REF	75%
578	s18	REF	70%
579	s13	ALT	65%
580	s13	REF	65%
581	s20	ALT	55%

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 6】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
582	s16	REF	70%
583	s19	REF	65%
584	s19	ALT	60%
585	s3	両方	40%
586	s13	ALT	65%
587	s13	REF	65%
588	s2	ALT	35%
589	s11	REF	60%
590	s2	REF	40%
591	s14	REF	60%
592	s16	ALT	70%
593	s17	ALT	45%
594	s18	REF	75%
595	s16	REF	75%
596	s16	両方	70%
597	s16	ALT	70%
598	s10	REF	60%
599	s10	ALT	60%
600	s5	ALT	45%
601	s13	REF	60%
602	s13	ALT	60%
603	s18	REF	75%
604	s10	ALT	70%
605	s14	REF	60%
606	s14	ALT	55%
607	s10	ALT	60%
608	s10	REF	60%
609	s14	REF	70%
610	s14	ALT	65%
611	s6	REF	70%
612	s10	ALT	60%
613	s10	REF	60%
614	s17	REF	65%
615	s17	ALT	60%
616	s9	ALT	50%
617	s15	REF	70%
618	s15	REF	65%
619	s14	ALT	55%
620	s14	REF	60%

10

20

30

40

50

【表 2 - 17】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
621	s15	ALT	60%
622	s8	ALT	40%
623	s8	REF	40%
624	s12	ALT	35%
625	s12	REF	30%
626	s6	ALT	55%
627	s6	REF	60%
628	s9	ALT	50%
629	s9	REF	55%
630	s13	REF	60%
631	s1	REF	40%
632	s20	REF	55%
633	s17	REF	65%
634	s14	ALT	55%
635	s14	ALT	55%
636	s14	REF	60%
637	s12	ALT	30%
638	s8	ALT	45%
639	s10	REF	65%
640	s12	ALT	30%
641	s15	REF	55%
642	s1	REF	40%
643	s1	ALT	35%
644	s5	ALT	60%
645	s5	REF	65%
646	s6	REF	60%
647	s6	ALT	55%
648	s10	REF	60%
649	s11	REF	55%
650	s12	ALT	30%
651	s2	ALT	35%
652	s13	REF	60%
653	s12	ALT	35%
654	s12	REF	30%
655	s5	REF	55%
656	s11	REF	60%
657	s1	両方	50%
658	s10	ALT	60%
659	s10	REF	60%

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 8】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
660	s10	ALT	60%
661	s15	ALT	50%
662	s11	REF	45%
663	s16	REF	70%
664	s9	REF	55%
665	s9	ALT	50%
666	s18	REF	75%
667	s16	REF	70%
668	s1	ALT	40%
669	s1	REF	45%
670	s5	ALT	55%
671	s5	REF	60%
672	s5	両方	65%
673	s14	両方	75%
674	s20	ALT	55%
675	s12	両方	35%
676	s15	REF	65%
677	s18	REF	75%
678	s5	REF	60%
679	s6	ALT	55%
680	s10	REF	65%
681	s10	ALT	65%
682	s6	REF	60%
683	s14	REF	60%
684	s19	REF	60%
685	s19	ALT	55%
686	s14	ALT	55%
687	s20	REF	50%
688	s9	ALT	70%
689	s9	REF	75%
690	s5	両方	40%
691	s12	ALT	30%
692	s2	ALT	40%
693	s11	REF	60%
694	s13	REF	60%
695	s2	REF	30%
696	s6	REF	55%
697	s6	ALT	50%
698	s9	両方	65%

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 9】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
699	s4	両方	55%
700	s2	REF	40%
701	s2	ALT	35%
702	s5	REF	75%
703	s5	ALT	70%
704	s8	ALT	40%
705	s8	REF	40%
706	s16	REF	75%
707	s5	両方	70%
708	s13	REF	65%
709	s13	ALT	65%
710	s20	ALT	60%
711	s20	REF	55%
712	s17	ALT	65%
713	s5	ALT	70%
714	s19	ALT	65%
715	s8	REF	40%
716	s8	ALT	40%
717	s11	ALT	45%
718	s17	ALT	50%
719	s17	REF	55%
720	s9	両方	55%
721	s11	REF	65%
722	s15	REF	55%
723	s14	REF	70%
724	s14	ALT	65%
725	s18	ALT	75%
726	s18	REF	75%
727	s9	ALT	55%
728	s9	REF	60%
729	s16	REF	75%
730	s5	REF	75%
731	s9	REF	60%
732	s13	REF	60%
733	s13	ALT	60%
734	s16	ALT	70%
735	s16	REF	75%
736	s15	REF	70%
737	s16	ALT	70%

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 0】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
738	s14	REF	75%
739	s14	ALT	60%
740	s14	REF	65%
741	s11	REF	55%
742	s10	REF	65%
743	s10	ALT	65%
744	s17	REF	70%
745	s19	REF	70%
746	s8	ALT	45%
747	s8	REF	45%
748	s12	ALT	40%
749	s12	REF	35%
750	s20	両方	55%
751	s20	ALT	55%
752	s3	両方	45%
753	s16	REF	75%
754	s16	ALT	70%
755	s10	REF	65%
756	s10	ALT	65%
757	s13	REF	65%
758	s13	ALT	65%
759	s10	両方	75%
760	s14	REF	65%
761	s14	ALT	60%
762	s10	ALT	65%
763	s10	REF	65%
764	s9	ALT	55%
765	s20	REF	55%
766	s20	ALT	60%
767	s10	REF	60%
768	s11	REF	55%
769	s13	REF	60%
770	s13	ALT	60%
771	s10	ALT	60%
772	s10	REF	60%
773	s10	ALT	60%
774	s11	REF	50%
775	s9	REF	55%
776	s9	ALT	50%

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 1】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
777	s18	REF	75%
778	s16	ALT	70%
779	s14	REF	75%
780	s16	REF	75%
781	s5	両方	65%
782	s20	ALT	60%
783	s20	ALT	70%
784	s18	REF	75%
785	s20	ALT	75%
786	s10	REF	65%
787	s10	ALT	65%
788	s16	REF	70%
789	s14	REF	60%
790	s19	REF	60%
791	s19	ALT	55%
792	s14	ALT	55%
793	s20	REF	55%
794	s12	両方	30%
795	s2	両方	45%
796	s11	REF	60%
797	s6	両方	55%
798	s9	両方	65%
799	s4	両方	60%
800	s8	ALT	40%
801	s8	REF	40%
802	s20	ALT	65%
803	s20	REF	60%
804	s11	ALT	50%
805	s9	両方	60%
806	s15	REF	60%
807	s14	REF	70%
808	s14	ALT	65%
809	s13	両方	60%
810	s11	REF	55%
811	s9	REF	70%
812	s16	REF	75%
813	s14	REF	65%
814	s14	ALT	60%
815	s10	両方	70%

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 2】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
816	s10	REF	60%
817	s20	REF	65%
818	s10	ALT	65%
819	s10	REF	65%
820	s10	ALT	60%
821	s9	REF	55%
822	s9	ALT	50%
823	s16	REF	75%
824	s20	ALT	70%
825	s11	REF	65%
826	s9	両方	65%
827	s20	ALT	70%
828	s20	REF	65%
829	s14	REF	70%
830	s14	ALT	65%
831	s10	両方	70%
832	s17	REF	65%
833	s9	REF	60%
834	s9	ALT	55%
835	s16	REF	75%
836	s10	両方	70%
837	s9	REF	65%
838	s9	ALT	60%
839	s16	ALT	75%
840	s6	REF	70%
841	s20	ALT	75%
842	s20	REF	70%
843	s9	REF	75%
844	s9	ALT	70%
845	s19	ALT	55%
846	s19	REF	60%
847	s20	ALT	70%
848	s20	REF	65%
849	s10	ALT	60%
850	s10	REF	60%
851	s6	ALT	65%
852	s9	REF	70%
853	s9	ALT	65%
854	s19	REF	70%

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 3】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
855	s15	ALT	65%
856	s15	REF	70%
857	s19	ALT	55%
858	s19	REF	60%
859	s20	ALT	70%
860	s20	REF	65%
861	s19	両方	55%
862	s17	両方	55%
863	s19	ALT	55%
864	s19	REF	60%
865	s14	ALT	60%
866	s14	REF	65%
867	s17	REF	60%
868	s17	ALT	55%
869	s18	REF	75%
870	s10	ALT	60%
871	s10	REF	60%
872	s5	REF	60%
873	s6	ALT	60%
874	s17	ALT	60%
875	s17	REF	65%
876	s9	REF	65%
877	s9	ALT	60%
878	s15	ALT	65%
879	s15	REF	70%
880	s19	ALT	55%
881	s19	REF	60% ,
882	s5	REF	60%
883	s5	ALT	55%
884	s12	ALT	30%
885	s20	REF	65%
886	s19	REF	50%
887	s17	両方	55%
888	s15	ALT	60%
889	s15	REF	65%
890	s19	ALT	55%
891	s19	REF	60%
892	s6	ALT	55%
893	s14	ALT	60%

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 4】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
894	s14	REF	65%
895	s2	REF	40%
896	s15	両方	65%
897	s8	REF	40%
898	s10	REF	70%
899	s10	ALT	70%
900	s6	REF	60%
901	s19	両方	65%
902	s17	ALT	50%
903	s15	REF	75%
904	s18	ALT	75%
905	s15	ALT	65%
906	s14	REF	65%
907	s10	ALT	60%
908	s10	REF	60%
909	s8	ALT	40%
910	s8	REF	40%
911	s19	REF	60%
912	s19	ALT	55%
913	s15	REF	65%
914	s15	ALT	60%
915	s16	両方	70%
916	s14	ALT	60%
917	s8	ALT	40%
918	s6	REF	60%
919	s6	ALT	55%
920	s5	ALT	55%
921	s5	REF	60%
922	s6	ALT	55%
923	s1	ALT	45%
924	s1	REF	50%
925	s17	ALT	60%
926	s8	REF	35%
927	s8	ALT	35%
928	s17	REF	65%
929	s15	REF	65%
930	s9	REF	60%
931	s9	ALT	55%
932	s14	REF	60%

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 5】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
933	s15	ALT	60%
934	s15	REF	65%
935	s15	ALT	60%
936	s19	ALT	50%
937	s19	REF	55%
938	s11	ALT	40%
939	s19	ALT	50%
940	s19	REF	55%
941	s11	REF	60%
942	s12	REF	30%
943	s5	REF	55%
944	s20	REF	50%
945	s13	REF	60%
946	s12	ALT	35%
947	s16	REF	65%
948	s13	REF	55%
949	s13	ALT	55%
950	s17	両方	45%
951	s8	ALT	40%
952	s12	ALT	30%
953	s12	ALT	35%
954	s12	REF	30%
955	s8	ALT	40%
956	s8	REF	40%
957	s17	REF	60%
958	s8	REF	40%
959	s1	ALT	45%
960	s19	REF	50%
961	s19	ALT	45%
962	s9	ALT	70%
963	s8	REF	45%
964	s8	ALT	45%
965	s12	ALT	30%
966	s9	REF	75%
967	s8	両方	45%
968	s12	ALT	35%
969	s12	REF	30%
970	s6	両方	45%
971	s20	REF	65%

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 6】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
972	s19	REF	50%
973	s11	REF	35%
974	s17	両方	55%
975	s2	ALT	30%
976	s2	REF	35%
977	s11	REF	40%
978	s19	ALT	50%
979	s19	REF	55%
980	s3	両方	30%
981	s11	両方	60%
982	s15	REF	65%
983	s19	ALT	55%
984	s19	REF	60%
985	s6	ALT	60%
986	s6	REF	65%
987	s6	ALT	50%
988	s14	ALT	55%
989	s14	REF	60%
990	s8	REF	35%
991	s8	ALT	35%
992	s12	REF	30%
993	s12	ALT	35%
994	s14	REF	70%
995	s11	REF	60%
996	s9	REF	75%
997	s9	ALT	70%
998	s15	ALT	60%
999	s20	REF	50%
1000	s20	ALT	55%
1001	s8	REF	40%
1002	s9	ALT	55%
1003	s9	REF	60%
1004	s16	REF	70%
1005	s14	両方	60%
1006	s5	両方	45%
1007	s17	ALT	60%
1008	s17	REF	65%
1009	s10	REF	65%
1010	s10	ALT	65%

10

20

30

40

50

【表 2 - 27】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
1011	s13	ALT	60%
1012	s13	REF	60%
1013	s10	ALT	65%
1014	s17	REF	65%
1015	s17	ALT	60%
1016	s6	REF	55%
1017	s5	REF	55%
1018	s19	両方	65%
1019	s17	REF	50%
1020	s17	ALT	45%
1021	s15	REF	70%
1022	s15	ALT	65%
1023	s10	REF	65%
1024	s16	REF	70%
1025	s18	ALT	75%
1026	s15	ALT	65%
1027	s13	REF	60%
1028	s14	REF	60%
1029	s10	ALT	60%
1030	s10	REF	60%
1031	s17	REF	65%
1032	s17	ALT	60%
1033	s2	REF	35%
1034	s19	REF	60%
1035	s19	ALT	55%
1036	s8	ALT	40%
1037	s8	REF	40%
1038	s12	ALT	35%
1039	s13	REF	60%
1040	s19	REF	55%
1041	s3	両方	35%
1042	s8	REF	40%
1043	s8	ALT	40%
1044	s13	ALT	60%
1045	s13	REF	60%
1046	s15	REF	60%
1047	s15	ALT	55%
1048	s2	ALT	30%
1049	s2	REF	35%

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 8】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
1050	s16	両方	65%
1051	s17	REF	65%
1052	s17	ALT	60%
1053	s15	ALT	60%
1054	s12	ALT	35%
1055	s13	ALT	60%
1056	s13	REF	60%
1057	s14	ALT	55%
1058	s8	ALT	40%
1059	s6	REF	60%
1060	s6	ALT	55%
1061	s12	ALT	30%
1062	s2	ALT	30%
1063	s5	ALT	50%
1064	s5	REF	55%
1065	s11	REF	55%
1066	s6	ALT	55%
1067	s1	ALT	40%
1068	s1	REF	45%
1069	s16	ALT	65%
1070	s2	REF	40%
1071	s2	ALT	35%
1072	s17	ALT	40%
1073	s16	REF	70%
1074	s13	REF	60%
1075	s13	ALT	60%
1076	s17	ALT	60%
1077	s8	REF	35%
1078	s8	ALT	35%
1079	s17	ALT	45%
1080	s14	ALT	55%
1081	s14	REF	60%
1082	s10	REF	60%
1083	s10	ALT	60%
1084	s17	REF	65%
1085	3 s20	両方	55%
1086	s19	ALT	55%
1087	s20	REF	55%
1088	s20	ALT	60%

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 9】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
1089	s11	REF	50%
1090	s13	REF	55%
1091	s13	ALT	55%
1092	s18	REF	70%
1093	s10	両方	65%
1094	s14	REF	60%
1095	s14	ALT	55%
1096	s21	ALT	30%
1097	s15	REF	65%
1098	s18	ALT	75%
1099	s10	ALT	60%
1100	s10	REF	60%
1101	s10	ALT	65%
1102	s14	REF	70%
1103	s14	ALT	65%
1104	s9	REF	60%
1105	s9	ALT	55%
1106	s6	REF	65%
1107	s10	ALT	55%
1108	s10	REF	55%
1109	s6	ALT	60%
1110	s19	ALT	55%
1111	s19	REF	60%
1112	s14	ALT	55%
1113	s14	REF	60%
1114	s17	REF	60%
1115	s17	ALT	55%
1116	s5	ALT	50%
1117	s5	REF	55%
1118	s17	ALT	60%
1119	s17	REF	65%
1120	s9	ALT	45%
1121	s15	ALT	60%
1122	s15	REF	65%
1123	s2	REF	40%
1124	s15	REF	70%
1125	s11	REF	65%
1126	s15	ALT	60%
1127	s15	ALT	55%

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 0】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
1128	s16	両方	65%
1129	s6	REF	60%
1130	s6	ALT	55%
1131	s15	REF	65%
1132	s14	ALT	55%
1133	s14	REF	60%
1134	s15	ALT	60%
1135	s19	REF	55%
1136	s8	ALT	35%
1137	s8	REF	35%
1138	s17	ALT	50%
1139	s17	REF	55%
1140	s12	ALT	30%
1141	s11	両方	35%
1142	s2	ALT	30%
1143	s2	REF	35%
1144	s19	ALT	45%
1145	s19	REF	50%
1146	s6	REF	60%
1147	s12	REF	30%
1148	s12	ALT	35%
1149	s2	ALT	35%
1150	s11	REF	55%
1151	s9	REF	75%
1152	s9	ALT	70%
1153	s9	ALT	50%
1154	s9	REF	55%
1155	s13	ALT	60%
1156	s13	REF	60%
1157	s1	REF	35%
1158	s5	REF	55%
1159	s5	ALT	50%
1160	s13	REF	60%
1161	s18	ALT	75%
1162	s12	ALT	30%
1163	s20	REF	55%
1164	s8	REF	40%
1165	s8	ALT	40%
1166	s17	REF	65%

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 1】

配列番号	SNP番号 (表 1)	標的 (ALT/REF)	%GC
1167	s12	ALT	30%
1168	s14	ALT	55%
1169	s16	REF	65%
1170	s17	ALT	40%
1171	s17	REF	45%
1172	s14	ALT	55%
1173	s14	REF	60%
1174	s20	両方	50%
1175	s15	REF	60%
1176	s15	ALT	55%
1177	s6	REF	55%
1178	s6	ALT	50%
1179	s8	ALT	45%
1180	s9	REF	70%
1181	s9	ALT	65%
1182	s10	REF	65%
1183	s15	REF	55%
1184	s4	両方	45%
1185	s4	両方	45%
1186	s4	両方	45%
1187	s4	両方	45%
1188	s4	両方	35%
1189	s4	ALT	30%
1190	s15	REF	65%
1191	s2	REF	25%
1192	s13	REF	55%

10

20

30

【0278】

本明細書において使用するとき、全ての見出しはただ構成のためのみであり、いかなる方式でも本開示を制限することを意図するものではない。いかなる個々の段落の内容も全ての段落に等しく適用可能であってもよい。

本発明の様々な実施形態を以下に示す。

1. 細胞の、重症先天性好中球減少症 (SCN) 又は周期性好中球減少症 (CyN) に関連している変異を有する好中球エラスターゼ遺伝子 (ELANE 遺伝子) 遺伝子の変異対立遺伝子を不活性化するための方法であって、前記細胞は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470 及び rs78302854 から成る群から選択される 1 つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であり、前記方法は、

40

前記細胞に、

CRISPRヌクレアーゼ又は前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組

50

成物を導入することを含み、

前記CRISPRヌクレアーゼ及び前記第1のRNA分子の複合体は、前記ELANE遺伝子の前記変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響する、方法。

2. 前記CRISPRヌクレアーゼ及び前記第1のRNA分子の前記複合体は、前記ELANE遺伝子の前記変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、前記変異対立遺伝子は、前記1つ又は複数の多型部位に基づいて前記二本鎖切断のための標的とされる、上記1に記載の方法。

3. CRISPRヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することをさらに含み、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体は、前記ELANE遺伝子における第2の二本鎖切断に影響する、上記1又は上記2に記載の方法。

4. 前記第1のRNA分子の前記ガイド配列部は、配列番号1~1192のいずれか1つに記載されている17~20個の近接しているヌクレオチドを含む、上記1~3の何れかに記載の方法。

5. 前記第2の二本鎖切断は、前記ELANE遺伝子の非コード領域内である、上記3又は4に記載の方法。

6. 前記細胞は、rs10414837又はrs3761005でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体は、前記ELANE遺伝子のイントロン4における二本鎖切断に影響する、上記3~5の何れかに記載の方法。

7. 前記細胞は、rs10414837又はrs3761005でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体は、前記ELANE遺伝子のイントロン3における二本鎖切断に影響する、上記3~5の何れかに記載の方法。

8. 前記細胞は、rs10414837又はrs3761005でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体は、前記ELANE遺伝子の3'UTR領域における二本鎖切断に影響する、上記3~5の何れかに記載の方法。

9. 前記細胞は、rs1683564でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体は、前記ELANE遺伝子のイントロン4における二本鎖切断に影響する、上記3~5の何れかに記載の方法。

10. 前記細胞は、rs1683564でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体は、前記ELANE遺伝子のイントロン3における二本鎖切断に影響する、上記3~5の何れかに記載の方法。

11. 前記細胞は、rs1683564でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体は、前記ELANE遺伝子の3'UTR領域における二本鎖切断に影響する、上記3~5の何れかに記載の方法。

12. 重症先天性好中球減少症(SCN)若しくはCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する前記細胞を、SCN若しくはCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する及び/又はSCN若しくはCyNに苦しむ対象から取得することを含み、前記対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である、上記1~11の何れかに記載の方法。

13. 第1にSCN若しくはCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する及び/又はSCN若しくはCyNに苦しむ対象を選択することであって、前記対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3

10

20

30

40

50

761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である、こと、及び前記対象から前記細胞を取得することを含む、上記12に記載の方法。

14. 前記細胞を前記対象から動員によって及び/又はアフェレシスによって取得することを含む、上記13又は14に記載の方法。

15. 前記細胞を前記対象から骨髄穿刺法によって取得することを含む、上記14に記載の方法。

16. 前記組成物を前記細胞に導入する前に前記細胞を予備刺激する、上記1~15の何れかに記載の方法。

17. 前記細胞を培養増殖して細胞群を取得することをさらに含む、上記12~16の何れかに記載の方法。

18. 前記細胞を、幹細胞因子(SCF)、IL-3及びGM-CSFのうちの1つ又は複数とともに培養する、上記17に記載の方法。

19. 前記細胞を少なくとも1つのサイトカインとともに培養する、上記17又は18に記載の方法。

20. 前記少なくとも1つのサイトカインは、組換えヒトサイトカインである、上記19に記載の方法。

21. 前記細胞は、複数の細胞の中の1つであり、前記第1のRNA分子又は前記第1及び前記第2のRNA分子の両方を含む前記組成物を、前記複数の細胞の中の少なくとも前記細胞及び他の細胞に導入し、そして前記複数の細胞の中の少なくとも前記細胞及び前記他の細胞中の前記ELANE遺伝子の前記変異対立遺伝子を不活性化し、それにより複数の改変細胞を取得する、上記1~20の何れかに記載の方法。

22. 前記第1のRNA分子を含む前記組成物を導入すること又は前記第2のRNA分子の導入は、前記細胞又は複数の細胞のエレクトロポレーションを含む、上記1~21の何れかに記載の方法。

23. 上記21又は22に記載の方法によって取得される改変細胞。

24. 上記21に記載の細胞を培養増殖することから取得される改変細胞。

25. 生着することができる、上記23又は24に記載の改変細胞又は複数の改変細胞。

26. 子孫細胞を生じることができる、上記23~25の何れかに記載の改変細胞又は複数の改変細胞。

27. 生着後に子孫細胞を生じることができる、上記26に記載の改変細胞又は複数の改変細胞。

28. 自家移植後に子孫細胞を生じることができる、上記27に記載の改変細胞又は複数の改変細胞。

29. 生着後少なくとも12か月間又は少なくとも24か月間子孫細胞を生じることができる、上記27又は28の何れかに記載の改変細胞又は複数の改変細胞。

30. 前記改変細胞又は複数の改変細胞は、造血幹細胞及び/又は前駆細胞(HSPC)である、上記23~29の何れかに記載の改変細胞又は複数の改変細胞。

31. 前記改変細胞又は複数の改変細胞は、CD34+造血幹細胞である、上記30に記載の改変細胞又は複数の改変細胞。

32. 前記改変細胞又は複数の改変細胞は、骨髄細胞又は末梢単核細胞(PMC)である、上記23~31の何れかに記載の改変細胞又は複数の改変細胞。

33. 前記ELANE遺伝子の1つの対立遺伝子の少なくとも一部を欠いている改変細胞。

34. 前記改変細胞は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る

10

20

30

40

50

群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である細胞から改変された、上記33に記載の改変細胞。

35. 上記23～34の何れかに記載の改変細胞及び薬学的に許容される担体を含む、組成物。

36. 前記細胞と前記薬学的に許容される担体とを混合することを含む、上記35に記載の組成物のインビトロ又はエキスピボ調製方法。

37. インビトロ又はエキスピボで改変細胞を含む組成物を調製する方法であって、前記方法は、

a) SCN若しくはCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する及び/又はSCN若しくはCyNに苦しむ対象から取得した複数の細胞からHSPCを単離することであって、前記対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である、こと、そして前記対象から前記細胞を取得すること、

b) 1つ又は複数の細胞における前記ELANE遺伝子の前記変異対立遺伝子を不活性化するよう、ステップ(a)の前記細胞に、

CRISPRヌクレアーゼ又は前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び17～20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組成物を導入することであって、

前記CRISPRヌクレアーゼ及び前記第1のRNA分子の複合体は、1つ又は複数の細胞における前記ELANE遺伝子の前記変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、

任意選択で、前記細胞にCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体は、前記1つ又は複数の細胞の前記ELANE遺伝子における第2の二本鎖切断に影響し、

それにより改変細胞を取得する、こと、任意選択で

c) ステップ(b)の前記改変細胞を培養増殖すること、を含み、

前記改変細胞は生着することができ、生着後に子孫細胞を生じることができる、方法。

38. a) SCN若しくはCyNに関連しているELANE遺伝子変異を有する及び/又はSCN若しくはCyNに苦しむ対象から取得した複数の細胞からHSPCを単離することであって、前記対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である、こと、

b) 1つ又は複数の細胞における前記ELANE遺伝子の前記変異対立遺伝子を不活性化するよう、ステップ(a)の前記細胞に、

CRISPRヌクレアーゼ又は前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び17～20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組成物を導入することであって、

前記CRISPRヌクレアーゼ及び前記第1のRNA分子の複合体は、1つ又は複数の細胞の前記ELANE遺伝子の前記変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、

任意選択で、前記細胞にCRISPRヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、前記第2のRNA分子及び

10

20

30

40

50

C R I S P Rヌクレアーゼの前記複合体は、前記1つ又は複数の細胞の前記E L A N E 遺伝子における第2の二本鎖切断に影響し、

それにより改変細胞を取得する、こと、任意選択で

c) ステップ(b)の前記細胞を培養増殖することであって、前記改変細胞は生着することができ、生着後に子孫細胞を生じることができる、こと、及び

d) 前記対象の前記S C N又はC y Nを治療するために前記対象にステップ(b)又はステップ(c)の前記細胞を投与すること、を含む方法によってインビトロで調製される組成物の使用。

39. 治療有効量の上記21~34の何れかに記載の改変細胞、上記35に記載の組成物又は上記36若しくは37に記載の方法によって調製された組成物を投与することを含む、S C N又はC y Nで苦しんでいる対象の治療方法。

40. S C N又はC y Nに関連しているE L A N E 遺伝子変異を有する治療を必要とする対象におけるS C N又はC y Nの治療方法であって、前記対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であり、前記方法は、

a) 前記対象から取得した複数の細胞からH S P Cを単離すること、

b) 1つ又は複数の細胞における前記E L A N E 遺伝子の前記変異対立遺伝子を不活性化するよう、ステップ(a)の前記細胞に、

C R I S P Rヌクレアーゼ又は前記C R I S P Rヌクレアーゼをコードする配列、及び17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、を含む組成物を導入することであって、

前記C R I S P Rヌクレアーゼ及び前記第1のRNA分子の複合体は、1つ又は複数の細胞の前記E L A N E 遺伝子の前記変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響し、

任意選択で、前記細胞にC R I S P Rヌクレアーゼと複合体を形成することができるガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、前記第2のRNA分子及びC R I S P Rヌクレアーゼの前記複合体は、前記1つ又は複数の細胞の前記E L A N E 遺伝子における第2の二本鎖切断に影響し、

それにより改変細胞を取得する、こと、任意選択で

c) ステップ(b)の前記細胞を培養増殖することであって、前記改変細胞は生着することができ、生着後に子孫細胞を生じることができる、こと、及び

d) 前記対象にステップ(b)又はステップ(c)の前記細胞を投与し、それにより前記対象の前記S C N又はC y Nを治療すること、を含む、方法。

41. S C N又はC y Nに関連しているE L A N E 遺伝子変異を有する治療を必要とする対象におけるS C N又はC y Nの治療方法であって、前記対象は、rs10414837、rs3761005、rs1683564、rs9749274、rs740021、rs201048029、rs199720952、rs28591229、rs71335276、rs58082177、rs3826946、rs10413889、rs761481944、rs3761008、rs10409474、rs3761007、rs17216649、rs10469327、rs8107095、rs10424470及びrs78302854から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性であり、前記方法は、

前記対象に自家改変細胞又は自家改変細胞の子孫を投与することであって、前記自家改変細胞は、前記E L A N E 遺伝子の前記変異対立遺伝子において二本鎖切断するように改変され、

前記二本鎖切断は、C R I S P Rヌクレアーゼ又は前記C R I S P Rヌクレアーゼをコ

10

20

30

40

50

ードする配列及び第1のRNA分子を含む組成物を前記細胞に導入することから生じ、前記CRISPRヌクレアーゼ及び前記第1のRNA分子の複合体は、前記細胞の前記ELANE遺伝子の前記変異対立遺伝子を不活性化するよう、前記ELANE遺伝子の前記変異対立遺伝子における二本鎖切断に影響する、こと、を含み、それにより前記対象の前記SCN又はCyNを治療する、方法。

42. SCN又はCyNと診断された対象のプールから治療のための対象を選択する方法であって、

- a) 前記対象のプールにおける各対象から細胞を取得するステップ、
- b) 各対象の細胞をSCN又はCyNに関連するELANE遺伝子変異について選別し、SCN又はCyNに関連するELANE遺伝子変異を有する対象のみを選択するステップ、
- c) ステップ(b)において選択された前記対象の前記細胞を配列決定することによりrs10414837、rs3761005、rs1683564から成る群から選択される1つ又は複数の多型部位でのヘテロ接合性を選別するステップ、及び
- d) 治療のために前記1つ又は複数の多型部位でヘテロ接合性である細胞を有する対象のみを選択するステップを含む、方法。

43. e) 前記対象の骨髄から吸引によるか又は動員及び末梢血液のアフェレシスによるかのいずれかにより造血幹細胞及び前駆細胞(HSPC)を取得すること、

f) ステップ(e)の前記HSPC細胞に

1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼ又は1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼをコードする配列

前記ELANE遺伝子の前記変異対立遺伝子に存在する前記1つ又は複数の多型部位の前記ヘテロ接合性対立遺伝子のヌクレオチド塩基を標的とする配列番号：1~1192のいずれか1つに記載されている17~20個の近接しているヌクレオチドの配列中の17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含む第1のRNA分子、及び

前記ELANE遺伝子のイントロン3、イントロン4又は3'UTRにおける配列を標的とするガイド配列部を含む第2のRNA分子を導入することであって、

前記第1のRNA分子とCRISPRヌクレアーゼの複合体は、1つ又は複数の前記HSPC細胞の前記ELANE遺伝子の前記変異対立遺伝子における第1の二本鎖切断に影響し、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの複合体は、前記第1のRNA分子と前記CRISPRヌクレアーゼの前記複合体が第1の二本鎖切断に影響した前記1つ又は複数のHSPC細胞の前記ELANE遺伝子の両対立遺伝子のイントロン3、イントロン4又は3'UTRにおける第2の二本鎖切断に影響し、それにより改変細胞を取得する、こと、

g) 前記対象にステップ(f)の前記改変細胞を投与し、それにより前記対象のSCN又はCyNを治療すること、を含む、

ステップ(d)において選択された対象におけるSCN又はCyNを治療することをさらに含む、上記42に記載の方法。

44. 配列番号：1~1192のいずれか1つに記載されている17~20個の近接しているヌクレオチドの配列中の17~20個のヌクレオチドを有するガイド配列部を含むRNA分子。

45. 上記44に記載のRNA分子及びガイド配列部を含む第2のRNA分子を含む、組成物。

46. 前記第2のRNA分子は、前記ELANE遺伝子の非コード領域を標的とする、上記45に記載の組成物。

47. 前記第2のRNA分子の前記ガイド配列部の前記ヌクレオチド配列は、前記第1のRNA分子の前記ガイド配列部の前記配列とは異なるヌクレオチド配列である、上記45又は46に記載の組成物。

48. 前記第1及び/又は前記第2のRNA分子は、さらにCRISPRヌクレアーゼに結合する配列を有する部分を含む、上記45~47の何れかに記載の組成物。

49. CRISPRヌクレアーゼに結合する前記配列は、tracrRNA配列である、

10

20

30

40

50

上記48に記載の組成物。

50. 前記第1及び/又は前記第2のRNA分子は、さらにtracrメイト配列を有する部分を含む、上記45~48の何れかに記載の組成物。

51. 前記第2のRNA分子は、1つ又は複数のリンカー部をさらに含む、上記45~50の何れかに記載の組成物。

52. 前記第1及び/又は前記第2のRNA分子は、長さが300ヌクレオチドまでである、上記42~51の何れかに記載の組成物。

53. 1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼ又は前記1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び/又は1つ又は複数のtracrRNA分子又は前記1つ又は複数のtracrRNA分子をコードする配列をさらに含む、上記45~52の何れかに記載の組成物。

10

54. 細胞の、変異ELANE対立遺伝子を不活性化するための方法であって、前記方法は、前記細胞に上記44に記載のRNA分子又は上記45~53の何れかに記載の組成物を送達することを含む、方法。

55. SCN又はCYNを治療する方法であって、前記方法は、SCN又はCYNを有する対象に上記44に記載のRNA分子若しくは上記45~53の何れかに記載の組成物、又は上記44に記載のRNA分子若しくは上記45~53の何れかに記載の組成物によって改変された細胞を送達することを含む、方法。

56. 前記1つ又は複数のCRISPRヌクレアーゼ及び/又は前記tracrRNA分子及び前記RNA分子若しくは複数のRNA分子を、前記対象及び/又は細胞に実質的に同時に又は異なる時間に送達する、上記54又は55に記載の方法。

20

57. 前記方法は、

— a) 変異対立遺伝子から疾患発症性の変異を含むエキソンを除去することであって、前記第1のRNA分子又は前記第1及び前記第2のRNA分子は、エキソン全体又は前記エキソンの一部に隣接している領域を標的とする、こと、

— b) 遺伝子の複数のエキソン、オープンリーディングフレーム全体を除去すること、又は遺伝子全体を除去すること、

— c) 前記第1のRNA分子又は前記第1及び前記第2のRNA分子が、変異対立遺伝子のエキソン及びイントロンの間の選択的スプライシングシグナル配列を標的とする、こと、

— d) 前記第2のRNA分子が、変異対立遺伝子と機能性対立遺伝子の両方に存在する配列を標的とする、こと、

30

— e) 前記第2のRNA分子が、イントロンを標的とする、こと、

— f) エラープローン非相同末端結合(NHEJ)機構により前記変異対立遺伝子に挿入又は欠失を受けさせ、前記変異対立遺伝子の配列にフレームシフトを生成すること、を含み、

— 任意選択で前記フレームシフトは、前記変異対立遺伝子の不活性化又はノックアウトを生じ、

— 好ましくは、前記フレームシフトにより前記変異対立遺伝子中に早期の終止コドンが作成される又は前記フレームシフトにより前記変異対立遺伝子の転写物にナンセンス変異依存mRNA分解機構が生じる、上記54~56の何れかに記載の方法。

40

58. 前記不活性化又は治療により前記変異対立遺伝子によってコードされる切断型タンパク質及び前記機能性対立遺伝子によってコードされる機能性タンパク質が生じる、上記55~57の何れかに記載の方法。

59. a) 前記細胞又は前記対象が、rs10414837又はrs3761005でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体が、前記ELANE遺伝子のイントロン4における二本鎖切断に影響し、

— b) 前記細胞又は前記対象が、rs10414837又はrs3761005でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体が、前記ELANE遺伝子のイントロン3における二本鎖切断に影響し、

— c) 前記細胞又は前記対象が、rs10414837又はrs3761005でヘテロ

50

接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体が、前記ELANE遺伝子の3'UTR領域における二本鎖切断に影響し、

d) 前記細胞又は前記対象が、rs1683564でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体が、前記ELANE遺伝子のイントロン4における二本鎖切断に影響し、

e) 前記細胞又は前記対象が、rs1683564でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体が、前記ELANE遺伝子のイントロン3における二本鎖切断に影響し、

f) 前記細胞又は前記対象が、rs1683564でヘテロ接合性であり、前記第2のRNA分子及びCRISPRヌクレアーゼの前記複合体が、前記ELANE遺伝子の3'UTR領域における二本鎖切断に影響する、上記55~58の何れかに記載の方法。

60. 細胞の、変異ELANE対立遺伝子を不活性化するための、上記44に記載のRNA分子、上記35、45~53の何れかに記載の組成物又は上記36若しくは37に記載の方法により調製された組成物、の使用。

61. 細胞の、変異ELANE対立遺伝子を不活性化するための、上記44に記載のRNA分子、上記35若しくは45~53の何れかに記載の組成物又は上記36若しくは37に記載の方法により調製された組成物を含む薬物であって、前記細胞に上記44に記載のRNA分子、上記35若しくは45~53の何れかに記載の組成物又は上記36若しくは37に記載の方法により調製された組成物を送達することにより前記薬物を投与する、薬物。

62. SCN又はCyNを有する又は有するリスクがある対象におけるSCN又はCyNを治療、寛解又は防止するための、上記1~22の何れかに記載の方法、上記23~34の何れかに記載の改変細胞、上記35若しくは45~53の何れかに記載の組成物又は上記36~37に記載の方法により調製された組成物、又は上記44に記載のRNA分子、の使用。

63. SCN又はCyNを治療、寛解又は防止するための、上記44のRNA分子、上記35若しくは45~53の何れかに記載の組成物、上記36若しくは37に記載の方法により調製された組成物又は上記23~34の何れかに記載の改変細胞を含む薬物であって、SCN又はCyNを有する又は有するリスクがある対象に、上記44のRNA分子、上記35もしくは45~53の何れかに記載の組成物、上記36若しくは37に記載の方法により調製された組成物又は上記23~34の何れかに記載の改変細胞を送達することにより前記薬物を投与する、薬物。

64. 上記44に記載のRNA分子、CRISPRヌクレアーゼ若しくは前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び/又はtracrRNA分子若しくは前記tracrRNAをコードする配列、及び前記細胞の前記変異ELANE対立遺伝子を不活性化するために、前記RNA分子、CRISPRヌクレアーゼ若しくは前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び/又は前記tracrRNA分子若しくは前記tracrRNAをコードする配列を前記細胞に送達するための説明書を備える、前記細胞の変異ELANE対立遺伝子を不活性化するためのキット。

65. 上記44に記載のRNA分子、CRISPRヌクレアーゼ若しくは前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び/又はtracrRNA分子若しくは前記tracrRNAをコードする配列、及びSCN又はCyNを治療するよう前記RNA分子、CRISPRヌクレアーゼ若しくは前記CRISPRヌクレアーゼをコードする配列、及び/又はtracrRNA分子若しくは前記tracrRNAをコードする配列を前記SCN又はCyNを有する又は有するリスクがある対象に送達するための説明書を備える、前記対象のSCN又はCyNを治療するためのキット。

66. 上記35若しくは45~53の何れかに記載の組成物、上記36若しくは37に記載の方法により調製された組成物、又は上記23~34の何れかに記載の改変細胞、及び前記細胞の前記ELANE遺伝子を不活性化するよう前記組成物を前記細胞に送達するための説明書を備える、前記細胞の変異ELANE対立遺伝子を不活性化するためのキット。

10

20

30

40

50

6 7 . 上記 3 5 若しくは 4 5 ~ 5 3 の何れかに記載の組成物、上記 3 6 若しくは 3 7 に記載の方法により調製された組成物、又は上記 2 3 ~ 3 4 の何れかに記載の改変細胞、及び S C N 又は C y N を治療するよう上記 3 5 若しくは 4 5 ~ 5 3 の何れかに記載の組成物、上記 3 6 若しくは 3 7 に記載の方法により調製された組成物、又は上記 2 3 ~ 3 4 の何れかに記載の改変細胞を S C N 若しくは C y N を有する又は有するリスクがある対象に送達するための説明書を備える、対象の S C N 又は C y N を治療するためのキット。

【 0 2 7 9 】

本明細書において使用するとき、全ての見出しはただ構成のためのみであり、いかなる方式でも本開示を制限することを意図するものではない。いかなる個々の段落の内容も全ての段落に等しく適用可能であってもよい。

10

【 0 2 8 0 】

本発明のより完全な理解を容易にするために、実施例を以下に提供する。以下の実施例で本発明を作成し、実施する例示的モードを説明する。しかしながら、本発明の範囲はこれらの実施例において開示される特定の実施形態に限定されるものではなく、説明のみを目的としている。

【 0 2 8 1 】

さらに、本発明における以下の実施例は、S p C a s 9 及び S p C a s 9 を開示される S N P 位置に向けさせるのに適したガイド配列を、利用することを含む方法を開示する。実施例では開示される戦略の実現可能性が証明される。当業者は、特定の戦略の各々を適用するために同一のガイド配列を異なる C R I S P R ヌクレアーゼとともに使用して、開示される S N P を標的としてもよいことを理解するだろう。さらに、特定の戦略の各々を適用するために、他の C R I S P R ヌクレアーゼを同一の S N P に向けさせる異なるガイド配列を他のヌクレアーゼと一緒に使用してもよい。

20

【実施例】

【 0 2 8 2 】

実験的詳細

実施例 1 : S p C a s 9 と組み合わせて機能するのに適した S N P を標的とするガイド配列及び開示される戦略に従う配列を選別する

H e L a 細胞を 9 6 穴プレートに播種した (3 K / ウェル) 。 2 4 時間後、細胞を 6 5 n g の W T - C a s 9 又は D e a d - C a s 9 及び g 3 6 ~ g 6 6 として識別され、 T u r b o f e c t 試薬 (サーマサイエンティフィック) を使用して E L A N E の異なる領域及び S N P を標的とする、 2 0 n g の g R N A プラスミドで同時導入した。 1 2 時間後、新鮮な培地を加え、そして遺伝子導入後 7 2 時間で、ゲノム D N A を抽出し、そして C a s 9 によって標的とされる予想領域を増幅し、生成物のサイズを D N A ラダーによるキャピラリー電気泳動により分析した。バンドの強度を P e a k S c a n n e r s o f t w a r e v 1 . 0 を使用して分析した。編集の割合を以下の式にしたがって算出した。 $100\% - (\text{未編集バンド強度} / \text{全バンド強度}) \times 100$ 。 図 6 には、 3 個の独立した実験の D e a d - C a s 9 バックグラウンド活性を減算した後の各 g R N A の平均活性 \pm S D を表す。

30

40

【 0 2 8 3 】

50

【表 3】

表 3：配列番号によって識別された表 1 のガイド s g 3 6 ~ s g 6 6。

ガイド配列	実施例 1 gID	配列番号	SNP位置
UAGGGGUGUUAUGGUCACAG	g36	972	上流 -2590bp
CACAGCGGGUGUAGACUCCG	g37	308	上流 -2590bp
ACAGCGGGUGUAGACUCCGA	g38	94	上流 -2590bp
CAGCGGGUGUAGACUCCGAG	g39	352	上流 -2590bp
AGCGGGUGUAGACUCCGAGG	g40	180	上流 -2590bp
CCGUUGCAGCUGGAACAUCG	g41	499	上流 -1475bp
CGUUGCAGCUGGAACAUCGU	g42	564	上流 -1475bp
GUUGCAGCUGGAACAUCGUG	g43	948	上流 -1475bp
UUGCAGCUGGAACAUCGUGG	g44	1192	上流 -1475bp
CUGGAACAUCGUGGGGGAGA	g45	601	上流 -1475bp
UGGAACAUCGUGGGGGAGAU	g46	1090	上流 -1475bp
AUCGUGGGGAGAUGGGAAG	g47	249	上流 -1475bp
GGAGUCCAGCUGCGGGAAA	g57	786	上流 -141Sbp
GCUGCGGGAAAGGGAUUCCC	g58	755	上流 -141Sbp
GGGAAUCCUUUCCCGCAGC	g59	819	上流 -141Sbp
GGAAUCCUUUCCCGCAGCU	g60	772	上流 -1415bp
CAAAUGUCAGAAUAUCAUG	g27	287	上流
AAAUGUCAGAAUAUCAUGU	g28	1191	上流
ACCAAGGCUCAGGGCGUUGG	g67	1193	イントロン3
CCUGUUGCUCAGUCCGGGC	g32	1194	イントロン4
CCAGCCCGGACUCGAGCAAC	g33	1195	イントロン4
UCCCUCCUAGGGUCUAGCCA	g34	1196	イントロン4
AGUCCGGCUGGGAGCGGGU	g35	1197	イントロン4
AUGUUUAUUGGCCAGAUGC	g29	1198	3UTR
GUGGGCAGCUGAGGUGACCC	g30	1199	3UTR
CACCCACACUCUCCAGCAUC	g31	1200	3UTR
UGUCAAGCCCCAGAGGCCAC	g61	1122	下流 +2968bp
GUCAAGCCCCAGAGGCCACA	g62	889	下流 +2968bp
GUCUCUGUCCUGUGGCCUC	g63	913	下流 +2968bp
UCUCUGUCCUGUGGCCUCU	g64	1046	下流 +2968bp
CUCUGUCCUGUGGCCUCUG	g65	1190	下流 +2968bp
UGUCAAGCCCCAGAGGCCAC	g66	1122	下流 +2968bp

10

20

30

40

【 0 2 8 4 】

実施例 2：切除戦略の実現可能性を証明する

HeLa細胞をspCas9-WTとRNAのペア(複数)で同時導入したが、戦略1a、1b及び2のためにそれぞれsg35(INT4)とsg39(rs10414837)、sg58(rs3761005)又はsg62(rs1683564)のいずれかだった。遺伝子導入後72時間で、gDNAを抽出し、droplet digital PCR(ddPCR)キット(10042958及び10031228、バイオ・ラッドラボラトリーズ)を使用して、エキソン1(戦略1)又はエキソン5(戦略2)のコピー数の減少を測定することにより切除効率を評価した。さらに、戦略2の切除率を正規化するため

50

にエキソン 1 を使用する一方、戦略 1 の切除率を正規化するためにエキソン 5 を使用した。表 4 に開示される結果には、2 個の独立した実験の平均%切除 ± S D (標準偏差) を示す。

【 0 2 8 5 】

【表 4】

表 4. 各戦略について試験された切除率

戦略	ガイド-RNAペア	切除率 (%)
1.a	g39+g35	49 ± 2
1.b	g58+g35	45 ± 9.6
2	g62+g35	41 ± 12.6

10

【 0 2 8 6 】

実施例 3：異なる s g RNA による編集を区別して対立遺伝子を評価する

製造業者説明書に従って、参照配列を標的とする、リボ核タンパク質複合体 (RNP) を関連している g RNA s から構築し、WT-Cas9 (#1081058) 又は HiFi Cas9 (#1081060) を Integrated DNA Technology (IDT) から購入した。次に RNP を、関連している SNP を抱える iPSC へと 4D-Nucleofector (R) システム (ロンザ) を使用してヌクレオフェクト (nucleofected) した。72 時間後、gDNA を抽出し、SNP 領域を増幅し、NGS 分析に送った。対立遺伝子の区別を参照対立遺伝子及び別の対立遺伝子で検出された編集割合にしたがって評価した。各部位でのインデル頻度を Cas-Analyzer ソフトウェアを使用して算出した。結果を表 5 に要約する。

20

【 0 2 8 7 】

【表 5】

表 5：示されたガイド配列を使用する編集%

	編集%					
	rs10414837 (g39)		rs3761005 (g58)		rs1683564 (g62)	
spCas9 バリエーション	参照対立 遺伝子	代替対立遺 伝子	参照対立遺 伝子	代替対立遺 伝子	参照対立遺 伝子	代替対立遺 伝子
WT-Cas9	65.3	34.7	50	50	100	0
HiFi-Cas9	94.3	5.7	49	51	100	0

30

【 0 2 8 8 】

実施例 4：HSC での編集効率

健常ドナーからの HSC を spCas9-WT 及び EMX1 (sgEMX1) 又は ELANE (g35:INT4; g58:rs3761005; g62:rs1683564) のいずれかを標的とする gRNA の RNA 構成要素でヌクレオフェクトした (nucleofected)。ヌクレオフェクション後 72 時間で、gDNA を抽出し、編集レベルを IDAA により定量した。図 7 には、二度繰り返して実施された 2 個の独立した実験の平均編集% ± S D を示す。

40

【 0 2 8 9 】

実施例 5：機能性成熟アッセイ

修正された細胞における表現型の救出を証明するために、患者由来の人工多能性幹細胞 (iPSC) から始める成熟アッセイを、再プログラム化された体細胞から調製した。この細胞は、患者由来細胞の再生可能な供給源を提供し、疾患表現型を正確に再現することが分かっている。簡潔には、患者の PBMC を、Oct4、Sox2、Nanog、Lin28、L-Myc、Klf4 及び SV40LT である、再プログラム化遺伝子を発現するエピソーム構築物で遺伝子導入する。同一の SNP 遺伝子型を抱える患者由来 iPSC 及び通常の iPSC を、市販のキット (STEMdiff (商標) Hematopoie

50

tic Kit、STEMCELL Technologies)を使用して造血前駆細胞へと分化する。12日後、分化効率を、フローサイトメトリー分析で前駆細胞マーカーCD34及びCD45の発現のために細胞を分析することにより推定する。通常及びSCN分化前駆細胞は、遺伝子編集を受け、幹細胞因子(SCF)、IL-3及び好中球への分化を促進するGM-CSFを含む条件培地で5日間生育する。通常の未編集及び編集された細胞、すなわちSCNの編集された細胞を好中球へと分化する一方、未編集のSCNに由来する細胞は分化の早い段階で停止する。好中球への分化効率を、フローサイトメトリーで好中球表面マーカー(例えばCD16、CD66b及び汎骨髄マーカーCD33の発現上昇等)を検出することにより測定する。

【0290】

実施例6：免疫不全マウスにおけるインビボ投与量範囲知見及び体内分布パイロット研究

G-CSFを投与した後の、免疫不全NSGマウスにおける自己複製能力及び多系列能力を有するHSCの存在及び数を測定するために投与スケジュール、投与量範囲及び投与経路を研究する。長期生着を確立するための機能免疫システムを再生することができるHSCの存在及び数を測定するために再増殖アッセイを実施する。このような検証のために、ヒトの生着及び造血系再増殖を高度に支持する、NSG細胞株を使用する。NSGマウスは、複数のサイトカインシグナル経路が欠損し、自然免疫に多くの欠陥があるのに加え、成熟T細胞、B細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞を欠いているNOD SCIDマウスである。一次移植の16週間後に生着を評価する(移植後12週間後分析)。

【0291】

NSGマウスにおける16週間の体内分布パイロット研究では、投与量及び最大持続時間を調べ、いくつかの細胞投与量レベルで実施する。この研究には、3個の投与量レベルと未編集のSCN細胞を受けたマウスのグループが含まれる。パイロット研究の期間は16週間であるが、投与量が高い2個のグループのうちの1個は6か月間まで継続する。このパイロット研究でマウスは6か月間生存し、中心的な体内分布研究の期間は6か月である。この研究の間、qPCRによる発現の持続性及び免疫組織化学を研究する。

【0292】

実施例7：免疫不全マウスにおける中心的な体内分布研究

中心的な体内分布研究ではNSGマウスを利用し、実施例6のパイロット投与量範囲の知見に従う。この研究は、優良試験所基準(GLP)を遵守して実行され、中心的な非臨床薬物動態、薬力学及び毒性学研究である。毒性研究は、HSC注入後の死亡率、臨床的知見、体重及び器官重量、並びに臨床的及び解剖学的病理学に基づく。

【0293】

遺伝子を編集したCD34+細胞をNSGマウスに移植するには、内在性骨髄の枯渇を提供し、ドナー細胞の生着を許容するために、前処理が必要となる。したがって、臨床状況を模倣するためにブスルファン前処理を利用する。グループあたり10匹の雄と雌のマウスの3個のグループ(遺伝子を編集した細胞、未編集の細胞及びブスルファン媒体のみのコントロール)を利用する。

【0294】

NSGマウスモデルはヒト好中球を枯渇した状況と完全に類似するものではないけれども、エクスピボ遺伝子編集細胞をインビボ注射する前に、全ての割合のマウスをブスルファンで処理し、骨髄機能を枯渇させるので、この研究は遺伝子編集CD34+細胞の体内分布研究に使用するためのモデルの妥当性に影響しない。利用可能な好中球欠乏マウス株、Ly22Cre/CreMcl-1^{fllox/fllox}(Mcl-1^{Myelo})の骨髄系細胞白血病(Mcl-1)抗アポトーシス性タンパク質から、Mcl-1が骨髄系特異的に欠乏すると非常に重度の好中球減少症が生じることが分かる(Csepregiら、2018)。Mcl-1^{Myelo}マウスは繁殖することができ、その生存率は、特定の病原体がない(specific pathogen-free)条件と従来の収容条件の両方で正常に近かった。しかしながら、NSGマウスとは対照的に、Mcl-1^{Myelo}マウスモデルでは限られた経験しかない。

10

20

30

40

50

【0295】

実施例8：修正分析

配列番号1～1192に記載されている17～20個の近接しているヌクレオチドの配列中の17～20個のヌクレオチドを含むガイド配列を、標的上の活性の高さについてスクリーニングする。標的上の活性は、DNAキャピラリー電気泳動分析により測定される。

【0296】

DNAキャピラリー電気泳動分析によると、配列番号1～1192に記載されている17～20個の近接しているヌクレオチドの配列中の17～20個のヌクレオチドを含むガイド配列は、ELANE遺伝子の修正に適していることが分かる。

【0297】

実施例9：ELANEの対立遺伝子特異的ノックアウトの有効性

ELANE遺伝子の変異対立遺伝子の特異的ノックアウトは、ELANE遺伝子の変異対立遺伝子のイントロン4及びエキソン5を切除することにより媒介される。これは、図8に描かれるような対立遺伝子特異的DSBを媒介するために、イントロン4でのDSBを媒介しSNPrs1683564を利用することにより成し遂げられる。この戦略を用いるとHSCが効率的に成熟好中球及び機能性好中球へと分化できることを証明するために、健常ドナーを、イントロン4のそれぞれのSNP(表1参照)を標的とするg35及びg62を含むRNPを有するHSC(ロンザ)でヌクレオフェクトする(nucleofected)。未編集の細胞をポジティブコントロールとして使用する。ヌクレオフェクション後48(48)時間で、公表された手順書(Zhenwang Jieら、PLOS One 2017)にしたがってHSCを好中球に分化する。編集された細胞と未編集の細胞の分化効率を、好中球特異的マーカーCD66b及びCD177で染色した後FACSによって測定する。HSC媒介好中球の機能を評価するために、以下のアッセイを実行する。

1. 貪食性をEZCell(商標)Phagocytosis Assay Kit(BioVision)を使用してアッセイする。このキットは、フローサイトメトリーによる迅速で正確な検出及びインビトロでの貪食性の定量化のためのツールとして事前に標識されたザイモサン粒子を利用する。

2. HSC由来好中球を大腸菌と共に培養し、次に細菌をコロニー形成のために寒天板に播種することによってキリングアッセイを実施する。未処理の細菌または未分化のHSCと培養した細菌をコントロールとして使用する。死滅効率は次のように計算される：(コロニー数Neutrophils /コロニー数コントロール) × 100。

3. EZCell(商標)Cell Migration/Chemotaxis Assay Kit(Biovision)を使用して走化性をアッセイする。

【0298】

実施例10：治療用の患者選択

ステップ1：SCN又はCyNと診断された4人の患者A～Dを、エキソンシーケンシングしてELANE遺伝子内のELANE病原性変異を同定することにより選別する。ステップ2：同定された変異を有する対象を、次にサンガーシーケンシングしてrs1683564、rs10414837及びrs3761005の少なくとも1つのヘテロ接合性を確認することにより選別する。ステップ3. rs1683564、rs10414837及びrs3761005少なくとも1つでヘテロ接合性であると決定された各対象について、ELANE遺伝子内の変異対立遺伝子のヘテロ接合性SNPのヌクレオチドを、BAC bioを使用して決定する。ステップ4. 表6にしたがって適切なガイドを選択する。

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6：SNPを区別するよう設計され、編集戦略のために使用されるガイド

gRNA	配列番号	標的SNP	DNA配列	位置	機構
g39 REF	352	rs10414837	CAGC <u>G</u> GGTGTAGACTCC GAG	プロモータ ー領域	切除、対立 遺伝子ノッ クアウト
ALT	351		CAGC <u>A</u> GGTGTAGACTCC GAG		
g58 REF	755	rs3761005	GCTGCGGGA <u>A</u> GGGATT CCC	プロモータ ー領域	切除、対立 遺伝子ノッ クアウト
ALTt	756		GCTGCGGGA <u>T</u> GGGATT CCC		
g62 REF	889	rs1683564	GTCAAGCCCCAGAG <u>G</u> CC ACA	3' UTRの下 流	切除、対立 遺伝子ノッ クアウト
ALT	888		GTCAAGCCCCAGAG <u>G</u> AC ACA		
g35	1197		AGTCCGGGCTGGGAGCG GGT	イントロン 4	切除、対立 遺伝子ノッ クアウト

【 0 2 9 9 】

ステップ 5 . 選択されたガイドをそれぞれの対象から取得した P B M C に導入し、P B M C における病原性 E L A N E 変異の減少を次世代シーケンス技術により検証する。患者 A ~ D のための方法論を以下に説明する。

1 . 患者 A をステップ 1 にしたがって選別し、表現型及び臨床的状況と一致している、E L A N E の既知の病原性変異があることが分かる。患者 A を関心のある S N P の周りで、ステップ 2 にしたがって選別し、3 個の S N P r s 1 0 4 1 4 8 3 7、r s 1 6 8 3 5 6 4 及び r s 3 7 6 1 0 0 5 の全てでホモ接合性であることが分かる。患者 A を、治療に好適ではないと判断する。

2 . 患者 B を既知の病原性 E L A N E 変異について検証する。患者 B を、ステップ 2 にしたがって選別し、S N P r s 1 6 8 3 5 6 4 及び r s 1 0 4 1 4 8 3 7 でホモ接合性であることが分かる。患者 B は、プロモーター領域の r s 3 7 6 1 0 0 5 でヘテロ接合性であると分かる。患者 B を、治療に好適であると判断する。ステップ 3 にしたがって病原性 E L A N E 変異と同一の対立遺伝子に存在するヌクレオチド（連鎖決定）を決定する。患者 B は、E L A N E 病原性変異と同一の対立遺伝子の r s 3 7 6 1 0 0 5 S N P 位置に参照ヌクレオチド塩基があることが分かる。g 5 8 r e f は、この S N P の提示と完全に相補性があり、イントロン 4 の非コード領域に向けられる g 3 5 と併せて選択される。ステップ 4 にしたがって、選択されたガイド組成物は、ガイド g 5 8 r e f 及び g 3 5 のペアを含む。この選択されたガイドのペアを使用する変異した対立遺伝子の切除が成功したかを患者 P M B C に N G S 読み取りを使用するステップ 5 にしたがって検証する。

3 . 患者 C は、幼児期から重度の好中球減少症に苦しんでいる。ステップ A にしたがって選別し、E L A N E 遺伝子には病原性変異を見出さなかった。患者 C を、治療に好適ではないと判断する。

4 . 患者 D は、E L A N E 遺伝子に既知の病原性変異があると検証され、ステップ 2 にしたがって S N P の遺伝子型を同定すると、3 個の S N P のうち、2 個でヘテロ接合性であることが分かる、つまり r s 1 0 4 1 4 8 3 7 と r s 1 6 8 3 5 6 4 の両方がヘテロ接合性であると分かる一方、r s 3 7 6 1 0 0 5 はホモ接合性であると分かる。遺伝子操作に使用する 2 個の可能性のある S N P 間の選択をする。選択をするために、ステップ 3 を実行して S N P と病原性変異間の連鎖を決定する、すなわち、S N P（参照又は代替）のどのヌクレオチドが E L A N E 病原性変異と同一の対立遺伝子に存在するかを決定する（

10

20

30

40

50

SNP提示)。患者Dをrs10414837の参照提示があると判断し、sg39refが使用に適していると判断する。rs1683564 SNPを参照すると、代替提示は、ELANE病原性変異と関連づけられていることが分かり、ガイドとしてsg62altが使用に適していると判断する。これらのガイドの各々をg35と併せて使用する。ステップ4にしたがって、可能性のあるガイド組成物の2個のペア、sg39ref+g35及びg62alt+g35を同定する。ガイドペアのいずれが好ましいか決定するために、ガイドの各々及びガイドペアの編集特性及び特徴のデータベースを評価してオフターゲット効果及び編集効率を決定する。データベース評価に基づいてガイドペアを選択し、NGS読み取りを提供するPMB Cにステップ5にしたがって、利用する。

REFERENCES

1. Ahmad and Allen(1992) “Antibody-mediated Specific Binding and Cytotoxicity of Liposome-entrapped Doxorubicin to Lung Cancer Cells in Vitro”, *Cancer Research* 52:4817-20
2. Anders(1992) “Human gene therapy”, *Science* 256:808-13
3. Basha et al. (2011) “Influence of Cationic Lipid Composition on Gene Silencing Properties of Lipid Nanoparticle Formulations of siRNA in Antigen-Presenting Cells”, *Mol. Ther.* 19(12):2186-200
4. Behr(1994) “Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: Prospects for gene therapy”, *Bioconjugate Chem* 5:382-89
5. Blaese(1995) “Vectors in cancer therapy: how will they deliver”, *Cancer Gene Ther.* 2:291-97
6. Blaese et al. (1995) “T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years”, *Science* 270(5235):475-80
7. Boxer, L. A. (2012) “How to approach neutropenia”, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012:174-182
8. Buchschacher and Panganiban(1992) “Human immunodeficiency virus vectors for inducible expression of foreign genes”, *J. Virol.* 66:2731-39
9. Burstein et al. (2017) “New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes”, *Nature* 542:237-41
10. Carlsson, G et al. (2012) “Incidence of severe congenital neutropenia in Sweden and risk of evolution to myelodysplastic syndrome/leukaemia”, *Br J Haematol* 158(3):363-369
11. Chung et al. (2006) “Agrobacterium is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria”, *Trends Plant Sci.* 11(1):1-4
12. Connelly, J. A. et al. (2012) “Hematopoietic stem cell transplantation for severe congenital neutropenia”, *Curr Opin Hematol* 19(1):44-51
13. Crystal(1995) “Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success”, *Science* 270(5235):404-10
14. Dale, D. C. (2017) “How I manage children with neutropenia”, *Br J Haematol* 178(3):351-363
15. Dillon(1993) “Regulation gene expression in gene therapy” *Trends in Biotechnology* 11(5):167-173

10

20

30

40

50

16. Donadieu, J. et al. (2011) "Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management", *Orphanet J Rare Dis* 6:26.
17. Dranoff et al. (1997) "A phase I study of vaccination with autologous, irradiated melanoma cells engineered to secrete human granulocyte macrophage colony stimulating factor", *Hum. Gene Ther.* 8(1):111-23
18. Donadieu et al. (2011) "Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management", *Orphanet J Rare Dis.* 6:26
19. Dunbar et al. (1995) "Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation", *Blood* 85:3048-57 10
20. Ellem et al. (1997) "A case report: immune responses and clinical course of the first human use of granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor-transduced autologous melanoma cells for immunotherapy", *Cancer Immunol Immunother* 44:10-20
21. Gao and Huang (1995) "Cationic liposome-mediated gene transfer" *Gene Ther.* 2(10):710-22
22. Germeshausen et al. (2013) "The spectrum of ELANE mutations and their implications in severe congenital and cyclic neutropenia", *Hum Mutat.* 34(6):905-14 20
23. Haddada et al. (1995) "Gene Therapy Using Adenovirus Vectors", in: *The Molecular Repertoire of Adenoviruses III: Biology and Pathogenesis*, ed. Doerfler and Bohm, pp. 297-306
24. Han et al. (1995) "Ligand-directed retro-viral targeting of human breast cancer cells", *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 92(21):9747-51
25. Horwitz, M.S. et al. (2013) "ELANE mutations in cyclic and severe congenital neutropenia: genetics and pathophysiology", *Hematol Oncol Clin North Am* 27(1):19- 41, vii.
26. Inaba et al. (1992) "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor", *J Exp Med.* 176(6):1693-702 30
27. Jinek et al. (2012) "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity," *Science* 337(6096):816-21
28. Johan et al. (1992) "GLVR1, a receptor for gibbon ape leukemia virus, is homologous to a phosphate permease of *Neurospora crassa* and is expressed at high levels in the brain and thymus", *J Virol* 66(3):1635-40
29. Judge et al. (2006) "Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo", *Mol Ther.* 13(3):494-505 40

30. Kohn et al. (1995) "Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency", *Nature Medicine* 1:1017-23
31. Koonen et al. (2017) "Diversity, classification and evolution of CRIPR-Cas systems", *Current Opinion in Microbiology* 37:67-78
32. Kremer and Perricaudet (1995) "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer", *Br. Med. Bull.* 51(1):31-44
33. Macdiarmid et al. (2009) "Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug", *Nat Biotechnol.* 27(7): 643-51 10
34. Malech et al. (1997) "Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease", *PNAS* 94(22):12133-38
35. Makaran et al. (2015) "The diversity of mutations and clinical outcomes for ELANE-associated neutropenia", *Curr Opin Hematol.* 22(1):3-11
36. Miller et al. (1991) "Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus", *J Virol.* 65(5):2220-24
37. Miller (1992) "Human gene therapy comes of age", *Nature* 357:455-60 20
38. Mitani and Caskey (1993) "Delivering therapeutic genes - matching approach and application", *Trends in Biotechnology* 11(5):162-66
39. Nabel and Feigner (1993) "Direct gene transfer for immunotherapy and immunization", *Trends in Biotechnology* 11(5):211-15
40. Remy et al. (1994) "Gene Transfer with a Series of Lipophilic DNA-Binding Molecules", *Bioconjugate Chem.* 5(6):647-54
41. Rosenberg, P. S. et al. (2010) "Stable long-term risk of leukaemia in patients with severe congenital neutropenia maintained on G-CSF therapy", *Br J Haematol* 150(2):196-199. 30
42. Schaffer, A et al. (2007) "Genetic heterogeneity in severe congenital neutropenia: how many aberrant pathways can kill a neutrophil?", *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7(6):481-494
43. Sentmanat et al. (2018) "A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing", *Scientific Reports* 8:888, doi:10.1038/s41598-018-19441-8
44. Skokowa, J. et al. (2017) "Severe congenital neutropenias", *Nat Rev Dis Primers* 3:17032
45. Sommerfelt et al. (1990) "Localization of the receptor gene for type D simian retroviruses on human chromosome 19", *J. Virol.* 64(12):6214-20 40

46. Van Brunt(1988) “Molecular framing:transgenic animals as bioactors” *Biotechnology* 6:1149-54

47. Vigne et al. (1995) “Third-generation adenovectors for gene therapy” , *Restorative Neurology and Neuroscience* 8(1,2):35-36

48. Wilson et al. (1989) “Formation of infectious hybrid virion with gibbon ape leukemia virus and human T-cell leukemia virus retroviral envelope glycoproteins and the gag and pol proteins of Moloney murine leukemia virus” , *J.Virol.* 63:2374-78

10

49. Yu et al. (1994) “Progress towards gene therapy for HIV infection” , *Gene Ther.* 1(1):13-26

50. Yu, K et al. (2016) “Gene Editing of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: Promise and Potential Hurdles” , *Hum Gene Ther* 27(10):729-740

51. Zetsche et al. (2015) “Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system” *Cell* 163(3):759-71

52. Zhenwang et al. (2017) “Large-scale ex vivo generation of human neutrophils from cord blood CD34 cells” , *PLOS ONE*, available at <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180832>

20

53. Zuris et al. (2015) “Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein based genome editing in vitro and in vivo” *Nat Biotechnol.* 33(1):73-80

30

40

50

【図面】

【図 1】

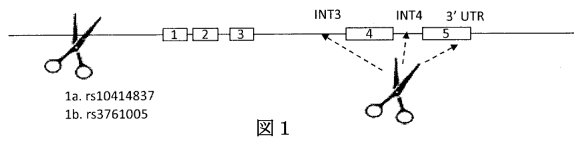


図 1

【図 2】

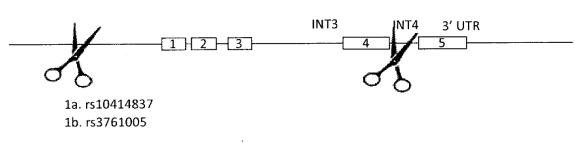


図 2

【図 3】

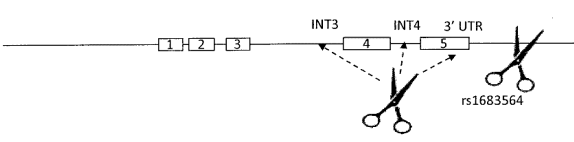


図 3

【図 4】

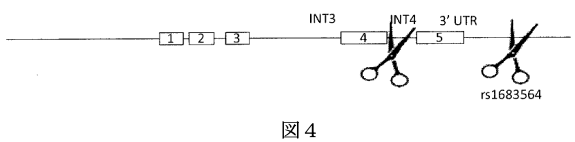


図 4

【図 5】

RSID	ヘテロ接合体 頻度
rs10414837	33%
rs3761005	46%
rs1683564	42%

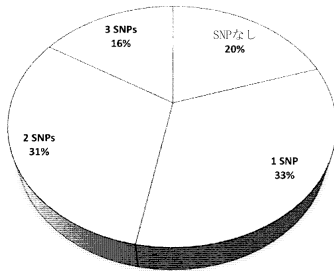


図 5

【図 6】

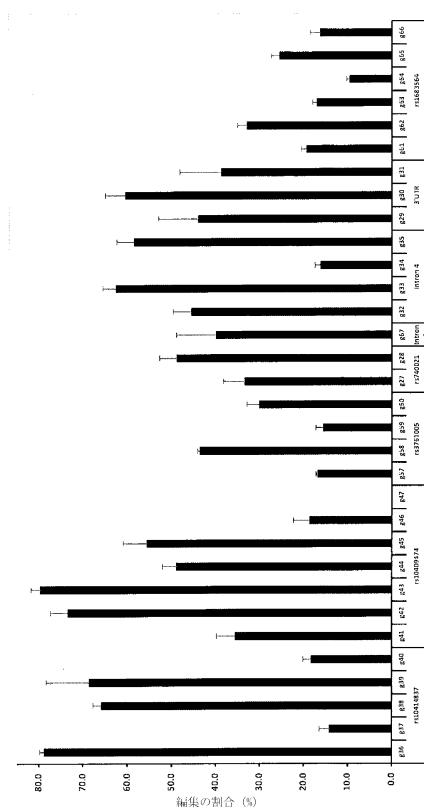


図 6

10

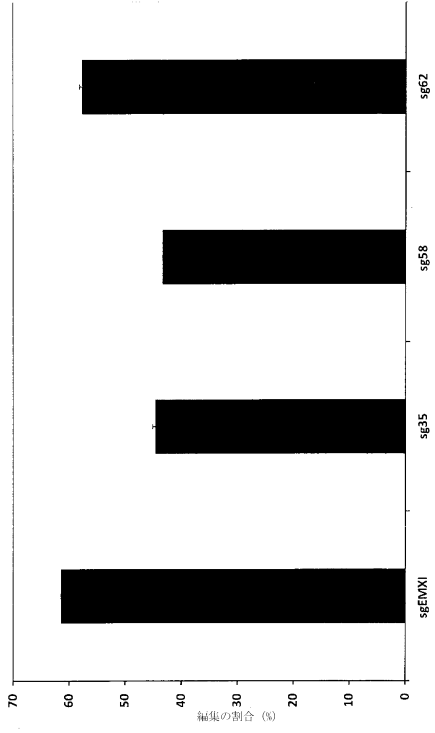
20

30

40

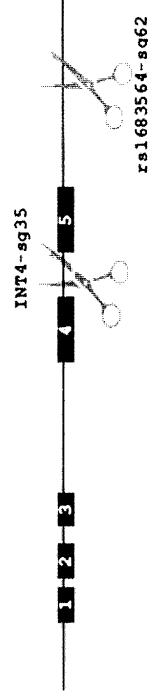
50

【 7 】



7

【 8 】



8

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	35/15 (2025.01)	A 6 1 K	35/15
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00
C 1 2 N	5/0787(2010.01)	C 1 2 N	5/0787

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/667,536

(32)優先日 平成30年5月6日(2018.5.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(72)発明者 イザール, リオール
イスラエル国 6 9 1 0 4 1 4 テル アヴィヴ, パート ストリート 8

(72)発明者 ヘルマン, アサエル
イスラエル国 7 4 2 0 9 0 3 ネル - ジオナ, シザフ ストリート 3

(72)発明者 エマニュエル, ラフィ
イスラエル国 7 2 3 6 7 1 0 ラムラ, イスラエル フレンケル 1 7

(72)発明者 ゴラン マシアッチ, ミカル
イスラエル国 7 4 0 5 9 0 0 ネル - ジオナ, スニール ストリート 8

(72)発明者 ジョージソン, ジョセフ
イスラエル国 7 6 2 8 9 1 2 レホヴォト, バスタナイ ストリート 4

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 0 0 4 6 1 6 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 8 / 0 4 9 0 7 3 (W O , A 1)
J. Clin. Invest. , 2015年 , Vol.125, No.8 , pp.3103-3116
Blood , 2017年 , Vol.130, Supplement 1 , p.542
Human Molecular Genetics , 2016年 , Vol.25, No.20 , pp.4566-4576
Pediatr. Blood Cancer , 2011年 , Vol.57 , pp.332-335
Sci. Transl. Med. , 2016年 , Vol.8, No.360, 360ra134 , Author manuscript pp.1-20

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0
C 1 2 N 5 / 0 0
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)