

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7685246号  
(P7685246)

(45)発行日 令和7年5月29日(2025.5.29)

(24)登録日 令和7年5月21日(2025.5.21)

(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	15/115 (2010.01)	C 1 2 N	15/115 Z Z N A
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11 Z
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85 Z
C 1 2 N	15/82 (2006.01)	C 1 2 N	15/82 Z
請求項の数 28 外国語出願 (全36頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-170959(P2022-170959)	(73)特許権者	507044516
(22)出願日	令和4年10月25日(2022.10.25)		プレジデント アンド フェローズ オブ
(62)分割の表示	特願2019-221158(P2019-221158)		ハーバード カレッジ
	)の分割		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
原出願日	平成26年9月5日(2014.9.5)		1 3 8 , ケンブリッジ , クインシー
(65)公開番号	特開2023-10712(P2023-10712A)		ストリート 1 7
(43)公開日	令和5年1月20日(2023.1.20)	(74)代理人	100102842
審査請求日	令和4年11月24日(2022.11.24)		弁理士 葛和 清司
(31)優先権主張番号	61/874,682	(72)発明者	リウ , デービッド , アール .
(32)優先日	平成25年9月6日(2013.9.6)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		2 4 2 0 , レキシントン , ウィットマン
			サークル 3
(31)優先権主張番号	14/326,329	(72)発明者	フー , ジョニー , ハオ
(32)優先日	平成26年7月8日(2014.7.8)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
(33)優先権主張国・地域又は機関			2 1 3 8 , ケンブリッジ , リナイアン
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 スイッチ可能 C A S 9 スクレアーゼおよびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

シングルガイドRNA ( s g R N A ) であって、

( i ) 少なくとも 1 0 個のヌクレオチドの配列を含む、標的核酸の第 1 の部分とハイブリダイズする領域と； ( i i ) 少なくとも 1 0 個のヌクレオチドの配列を含む、領域 ( i ) の配列とハイブリダイズする領域であって、ここで、 s g R N A は、ステム・ループ構造を形成し、ステムは、領域 ( i i ) の配列とハイブリダイズされる領域 ( i ) の配列を含む、前記領域と； ( i i i ) 少なくとも 1 0 個のヌクレオチドの配列を含む、標的核酸の第 2 の部分とハイブリダイズする領域と

を含み、

領域 ( i ) の配列が、領域 ( i i ) の配列とハイブリダイズする場合に、ステム・ループ構造のループが、領域 ( i i i ) の配列により形成され；

領域 ( i i i ) の配列とハイブリダイズする標的核酸の第 2 の部分の非存在下で、ステム・ループ構造が形成され；

標的核酸の第 2 の部分が領域 ( i i i ) の配列とハイブリダイズすることにより、領域 ( i i ) の配列が領域 ( i ) の配列とハイブリダイズしないように、ステム・ループ構造がアンフォールドされるか、またはステム・ループ構造の形成が阻止され；ならびに、

s g R N A は、C a s 9 タンパク質を結合するドメインをさらに含む、

前記 s g R N A 。

【請求項 2】

領域 ( i ) および領域 ( i i ) の各配列が、少なくとも 15 個、少なくとも 20 個、または少なくとも 25 個のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の s g R N A。

【請求項 3】

領域 ( i i i ) の配列が、少なくとも 15 個、少なくとも 20 個、少なくとも 25 個、少なくとも 30 個、少なくとも 40 個、少なくとも 50 個、少なくとも 75 個、または少なくとも 100 個のヌクレオチドを含む、請求項 1 または 2 に記載の s g R N A。

【請求項 4】

領域 ( i ) が、標的核酸配列の第 1 の部分と 100 % 相補的である少なくとも 10 個もしくは少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドの配列を含み、および

領域 ( i i ) が、領域 ( i ) の配列と 100 % 相補的である少なくとも 10 個もしくは少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドの配列を含む、  
請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の s g R N A。

10

【請求項 5】

領域 ( i i ) および領域 ( i i i ) の両方が、領域 ( i ) に対して 5 ' または 3 ' 側のいずれかにある、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の s g R N A。

【請求項 6】

s g R N A が C a s 9 タンパク質を結合し、領域 ( i i i ) の配列が標的核酸の第 2 の部分とハイブリダイズすると領域 ( i ) の配列が標的核酸の第 1 の部分とハイブリダイズする、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の s g R N A。

【請求項 7】

標的核酸が D N A である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の s g R N A。

20

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の s g R N A と C a s 9 タンパク質とを含む、複合体。

【請求項 9】

標的核酸をさらに含む、請求項 8 に記載の複合体。

【請求項 10】

複合体の形成により、標的核酸が切断される、請求項 9 に記載の複合体。

【請求項 11】

標的核酸が D N A である、請求項 9 または 10 に記載の複合体。

30

【請求項 12】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の s g R N A をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 14】

C a s 9 タンパク質をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の s g R N A を発現する遺伝子構築物を含む、細胞。

【請求項 16】

C a s 9 タンパク質をさらに含む、請求項 15 に記載の細胞。

40

【請求項 17】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の s g R N A を含む、キット。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の s g R N A をコードするポリヌクレオチドを含む、キット。

【請求項 19】

組換え発現用ベクターを含むキットであって、ベクターが、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の s g R N A をコードするポリヌクレオチドを含む、前記キット。

【請求項 20】

50

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の s g R N A を発現する遺伝子構築物を含む細胞を含む、キット。

【請求項 2 1】

1 つ以上の C a s 9 タンパク質または 1 つ以上の C a s 9 タンパク質を発現するベクターをさらに含む、請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 2 2】

D N A を請求項 8 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の複合体と接触させることを含む、*in vi tro* または *ex vi vo* での部位特異的 D N A 切断方法。

【請求項 2 3】

D N A が細胞中にある、請求項 2 2 に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

細胞が *in vi tro* にある、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

細胞が *ex vi vo* にある、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

細胞が真核細胞である、請求項 2 3 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

細胞が個体からの真核細胞である、請求項 2 3 または 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

個体がヒトである、請求項 2 7 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2 0 1 4 年 7 月 8 日に出願された米国特許出願第 1 4 / 3 2 6 , 3 2 9 号、2 0 1 4 年 7 月 8 日に出願された米国特許出願第 1 4 / 3 2 6 , 3 4 0 号、2 0 1 4 年 7 月 8 日に出願された米国特許出願第 1 4 / 3 2 6 , 3 6 1 号に対して、米国特許法第 3 6 5 条 ( c ) に基づく優先権の利益を主張し、また、2 0 1 3 年 9 月 6 日に提出された米国特許仮出願第 6 1 / 8 7 4 , 6 8 2 号に対して、米国特許法第 1 1 9 条 ( e ) に基づく優先権の利益を主張し、その全開示を参照により本明細書に組み込むものである。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

部位特異的エンドヌクレアーゼは、理論上はゲノム内の単一の部位の標的操作を可能とし、標的遺伝子組換えに関して、また治療上の応用に対して有用である。哺乳動物を含む様々な有機体において、部位特異的エンドヌクレアーゼは、非相同末端結合または相同組換えのいずれかを刺激することによるゲノムエンジニアリングに使用されている。強力な研究ツールを提供することに加えて、部位特異的ヌクレアーゼは遺伝子治療剤として有望でもあり、2 つの部位特異的エンドヌクレアーゼの臨床試験が最近始まった：そのうちの 1 つの C C R 5 - 2 2 4 6 は、抗 H I V 治療法の一環としてヒト C C R - 5 アレルを標的としており ( N C T 0 0 8 4 2 6 3 4 、 N C T 0 1 0 4 4 6 5 4 、 N C T 0 1 2 5 2 6 4 1 ) 、他の 1 つの V F 2 4 6 8 4 は、抗癌治療法の一環としてヒト V E G F - A プロモーターを標的としている ( N C T 0 1 0 8 2 9 2 6 ) 。

40

【0 0 0 3】

オフターゲット活性がゼロあるいは極小で所期のヌクレアーゼ標的部位を特異的に切断することが、部位特異的エンドヌクレアーゼの臨床応用や、基礎研究応用での高効率ゲノム操作における必要条件である。例えば、操作された部位特異的結合ドメインの特異性が不完全であることが、細胞毒性および所期の標的以外のゲノム遺伝子座の望ましくない変化と関連があると考えられている。しかしながら、現在入手可能なヌクレアーゼの大部分は、有意なオフターゲット活性を示し、そのため臨床応用には適さないであろう。臨床および研究環境で使用するために注目されているヌクレアーゼプラットフォームは、C a s

50

9などのRNA誘導型ヌクレアーゼである。これらのヌクレアーゼは、特異的な標的部位の切断を指示するガイドRNA (gRNA) に結合可能であるが、オフターゲット活性が特定のCas9:gRNA複合体で依然観察されている (Pattanayak et al., "High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity." Nat Biotechnol. 2013; doi: 10.1038/nbt.2673)。従って、特異性を改善したヌクレアーゼを操作する技術が必要とされている。

#### 【発明の概要】

##### 【0004】

本開示のいくつかの側面は、操作された部位特異的エンドヌクレアーゼの報告された毒性はオフターゲットDNA切断に拠るという認識に基づいている。更に、既存のRNA誘導型ヌクレアーゼの活性は、一般に、例えば、ヌクレアーゼを「オフ」から「オン」状態へ切り換えるなどの分子レベルでの調節はできない。ヌクレアーゼの活性を調節することは、オフターゲット効果が起こる可能性を抑制することができるかもしれない。本開示のいくつかの側面は、Cas9エンドヌクレアーゼなどRNAプログラム可能エンドヌクレアーゼの結合および/または切断活性を調節する方策、組成物、システム、および方法を提供する。

##### 【0005】

従って、本開示の1つの実施態様は、「スイッチ可能」ガイドRNA (gRNA) を含むRNA誘導型ヌクレアーゼ複合体を提供する。例えば、いくつかの実施態様では、本発明は、(i) アプタマーに結合する特異的リガンドの非存在下では標的核酸にハイブリダイズしない、アプタマーを含むgRNAと；(ii) Cas9タンパク質とを含む複合体を提供する。いくつかの実施態様では、アプタマーにリガンドが結合している。いくつかの側面では、リガンドは任意の分子である。いくつかの側面では、リガンドは、小分子、代謝産物、炭水化物、ペプチド、タンパク質、または核酸である。いくつかの実施態様では、gRNA:リガンド:Cas9複合体は、標的核酸に結合しその切断を仲介する。例えば、図1参照。

##### 【0006】

他の実施態様によれば、アプタマーを含むgRNAが提供される。いくつかの実施態様では、gRNAは、アプタマーに結合したリガンドの非存在下では標的核酸にハイブリダイズしない。そのようなgRNAは、「スイッチ可能gRNA」と呼ぶことができる。例えば、いくつかの側面では、gRNAは、アプタマーに結合したリガンドの非存在下ではCas9を結合しない。例えば、図1Aおよび図1B参照。いくつかの実施態様では、gRNAは、アプタマーにそれに特異的なリガンドが結合したときにCas9に結合する。いくつかの実施態様では、gRNAは、アプタマーを結合したリガンドの存在下または非存在下でCas9に結合するが、アプタマーを結合したリガンドの存在下でのみ標的核酸に結合する。いくつかの側面では、リガンドは任意の分子である。いくつかの側面では、リガンドは、小分子、代謝産物、炭水化物、ペプチド、タンパク質、または核酸である。いくつかの実施態様では、アプタマーは、例えばリボスイッチに由来するRNAアプタマーなどのRNAアプタマーである。いくつかの実施態様では、アプタマーが由来するリボスイッチは、テオフィリンリボスイッチ、チアミンピロリン酸エステル (TPP) リボスイッチ、アデノシンコバラミン (AdoCbl) リボスイッチ、S-アデノシルメチオニン (SAM) リボスイッチ、SAHリボスイッチ、フラビンモノヌクレオチド (FMN) リボスイッチ、テトラヒドロ葉酸リボスイッチ、リジンリボスイッチ、グリシンリボスイッチ、プリンリボスイッチ、GlmSリボスイッチ、またはプレケオシン1 (PreQ1) リボスイッチから選択される。いくつかの実施態様では、アプタマーは、テオフィリンリボスイッチに由来し、配列番号3を含む。他の実施態様では、アプタマーは、天然に存在せず、またいくつかの側面では、試験管内進化法 (SELEX) プラットフォームを用いて特異的リガンドを結合するよう操作されている。いくつかの実施態様では、gRNAの非アプタマー部分は、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、少な

10

20

30

40

50

くとも130、少なくとも140、または少なくとも150個のヌクレオチドを含み、アプタマーは少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、少なくとも130、少なくとも140、少なくとも150、少なくとも175、少なくとも200、少なくとも250、または少なくとも300個のヌクレオチドを含む。

【0007】

他の実施態様によれば、本発明のCas9変異体を用いた部位特異的DNA切断方法が提供される。例えば、いくつかの側面では、前記方法は、(i) DNAの部分に結合する配列を含む、アプタマーを含むgRNAと、(ii) gRNAのアプタマーに結合した特異的リガンドと、(iii) Cas9タンパク質とを含む複合体を、Cas9タンパク質がDNAを切断する条件下で、DNAに接触させることを含む。

10

【0008】

他の実施態様によれば、細胞において部位特異的DNA切断を誘発する方法が提供される。例えば、いくつかの実施態様では、前記方法は、(a) DNA標的配列に結合可能な配列を含む、アプタマーを含むgRNAを細胞に接触させることまたは細胞中で発現させること；(b) Cas9タンパク質を細胞に接触させることまたは細胞中で発現させること；および(c) gRNAのアプタマーを結合するリガンドを細胞に接触させることにより、DNA標的を切断するgRNA：リガンド：Cas9複合体を形成することを含む。いくつかの実施態様では、細胞は、例えば生理学的または病態生理学的プロセスの一環として、細胞内でリガンドを産生する。いくつかの実施態様では、前記方法は、(a) DNA標的配列に結合可能な配列を含む、アプタマーを含むgRNAとCas9タンパク質とを含む複合体を細胞に接触させること；および(b) gRNAのアプタマーに結合するリガンドを細胞に接触させることにより、DNA標的を切断するgRNA：リガンド：Cas9複合体を形成することを含む。いくつかの側面では、工程(a)および工程(b)は、同時にまたは順次に任意の順番で実施される。いくつかの実施態様では、前記方法はin vitroで実施されるが、他の実施態様では、前記方法はin vivoで実施される。

20

【0009】

他の実施態様によれば、mRNAをセンスするgRNAを含むRNA誘導型ヌクレアーゼ複合体が提供される。例えば、いくつかの実施態様では、複合体は、(i) 標的核酸の領域とハイブリダイズする領域と；(ii) 領域(i)の配列と部分的にまたは完全にハイブリダイズする他の領域と；(iii) 転写物(mRNA)の領域とハイブリダイズする領域とを含むgRNAと、Cas9タンパク質とを含む。

30

【0010】

他の実施態様によれば、例えば、(i) 標的核酸の領域とハイブリダイズする領域と；(ii) 領域(i)の配列と部分的にまたは完全にハイブリダイズする他の領域と；(iii) 転写物(mRNA)の領域とハイブリダイズする領域とを含む、mRNAをセンスするgRNAが提供される。例えば、図2を参照。いくつかの実施態様では、領域(i)、領域(ii)、および領域(iii)の各配列は、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、または少なくとも25個のヌクレオチドを含む。いくつかの側面では、gRNAは、ステムが領域(ii)の配列の一部または全部とハイブリダイズした領域(i)の配列を含み、ループが領域(iii)の配列の一部または全部から形成されるステム・ループ構造を形成する。いくつかの実施態様では、領域(ii)および領域(iii)の両方が、領域(i)に対して5'または3'側のいずれかにある。例えば、図2A対図2Cを参照。いくつかの実施態様では、領域(iii)の配列とハイブリダイズする転写物の非存在下でステム・ループ構造が形成される。この例では、gRNAは「オフ」状態であるという。例えば、図2Aおよび図2Cを参照。いくつかの実施態様では、転写物が領域(iii)の配列へ結合することにより、領域(ii)の配列が領域(i)の配列にハイブリダイズしないように、ステム・ループ構造がアンフォールディングされるかまたはステム・ループ構造の形成が阻止される。この例では、gRNAは「オ

40

50

ン」状態であるという。例えば、図 2 B および図 2 D を参照。いくつかの実施態様では、gRNA は、Cas9 タンパク質を結合し、領域 (iii) の配列が転写物を結合する (例、「センスする」と、領域 (i) の配列が標的核酸とハイブリダイズする。

【0011】

他の実施態様によれば、例えば、複合体が DNA に結合し切断することが可能となるように mRNA が結合する、mRNA をセンスする gRNA と会合する Cas9 タンパク質を含む複合体を、DNA に接触させることを含む、部位特異的 DNA 切断方法が提供される。

【0012】

他の実施態様によれば、伸長 DNA 認識 (xDNA をセンスする) gRNAs が提供される。例えば、図 3 を参照。いくつかの実施態様では、xDNA をセンスする gRNA は、(i) 標的核酸の領域とハイブリダイズする領域と；(ii) 領域 (i) の配列と部分的にまたは完全にハイブリダイズする他の領域と；(iii) 標的核酸の他の領域とハイブリダイズする領域とを含む。いくつかの実施態様では、領域 (i) および領域 (ii) の各配列は、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、または少なくとも 25 個のヌクレオチドを含み、領域 (iii) の配列は、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 40、少なくとも 50、少なくとも 75、または少なくとも 100 個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、gRNA は、ステムが領域 (ii) の配列の一部または全部とハイブリダイズした領域 (i) の配列を含み、ループが領域 (iii) の配列の一部または全部により形成されているステム・ループ構造を形成する。いくつかの実施態様では、領域 (ii) および領域 (iii) の両方が、領域 (i) に対して 5' または 3' 側のいずれかにある。例えば、図 3 A 対図 3 C 参照。いくつかの実施態様では、ステム・ループ構造は、領域 (iii) における配列に相補・結合する標的核酸の領域の非存在下で形成される。例えば、図 3 A および図 3 C を参照。いくつかの実施態様では、標的核酸の領域の領域 (iii) の配列へのハイブリダイゼーションにより、領域 (ii) の配列が領域 (i) の配列にハイブリダイズしないように、ステム・ループ構造がアンフォールディングされるかまたはステム・ループ構造の形成が阻止される。例えば、図 3 B および図 3 D を参照。いくつかの実施態様では、gRNA は、Cas9 タンパク質を結合し、領域 (iii) における配列が標的核酸を結合すると (i) 中の配列が標的核酸を結合する。

【0013】

他の実施態様によれば、任意に標的核酸を含み、xDNA をセンスする gRNA と Cas9 タンパク質とを含む複合体が提供される。いくつかの実施態様では、複合体の形成により、標的核酸が切断される。

【0014】

他の実施態様によれば、xDNA をセンスする gRNA と Cas9 タンパク質とを含む複合体を DNA に接触させることを含む、部位特異的 DNA 切断方法が提供される。

【0015】

本明細書で提供される方法はいずれも、例えば、in vitro または in vivo の細胞などの細胞中の DNA に対して実施することが可能である。いくつかの実施態様では、本明細書で提供される方法はいずれも、真核細胞中の DNA に対して実施される。いくつかの実施態様では、真核細胞は、例えばヒトなどの個体中にある。

【0016】

他の実施態様によれば、例えば本明細書に記載の gRNA、複合体、またはタンパク質 (例、Cas9 タンパク質) のいずれかをコードするポリヌクレオチドが提供される。いくつかの実施態様では、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。いくつかの実施態様では、本明細書に記載の gRNA、複合体、またはタンパク質 (例、Cas9 タンパク質) のいずれかの組換え発現用ベクターが提供される。いくつかの実施態様では、本明細書に記載の gRNA、複合体、またはタンパク質 (例、Cas9 タンパク質) のいずれかを発現する遺伝子構築物を含む細胞が提供される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 7 】

いくつかの実施態様では、キットが提供される。例えば、本明細書に記載の gRNA、複合体、またはタンパク質（例、Cas9 タンパク質）のいずれかを含むキットが提供される。いくつかの実施態様では、本明細書に記載のポリヌクレオチドのいずれかを含むキットが提供される。いくつかの実施態様では、本明細書に記載の gRNA、複合体、またはタンパク質（例、Cas9 タンパク質）のいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現用ベクターを含むキットが提供される。いくつかの実施態様では、本明細書に記載の gRNA、複合体、またはタンパク質（例、Cas9 タンパク質）のいずれかを発現する遺伝子構築物を含む細胞を含むキットが提供される。

## 【 0 0 1 8 】

本発明のその他の利点、特徴、および使用は、本発明のいくつかの実施態様の詳細な説明、模式的であり正確な縮尺ではない図面、および請求の範囲から明らかとなるであろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 1 9 】

【図 1】図 1A ~ 図 1D は、アプタマーにリンクした gRNA に関する本発明のいくつかの実施態様を示す。(A) 本図では、アプタマーを含むスイッチ可能 gRNA を模式的に図示する。アプタマーを結合する特異的リガンド（本図では代謝産物）の非存在下で、標的核酸に結合すべき配列は、アプタマーの部分（「スイッチング配列」と示された一番左の部分参照）とハイブリダイズしている。代謝産物の結合に際して、アプタマーは、標的核酸に結合すべき配列がもはやアプタマー配列とハイブリダイズしないような立体構造変化を受けて、標的にハイブリダイズすることを可能とする。(B) 「オン」状態へのスイッチングに際して、Cas9 と結合すると、gRNA は、ハイブリダイズしている標的部位へとヌクレアーゼを配向させ、Cas9 が標的核酸の各鎖を切断することを可能とする。(C および D) 本図では、gRNA にリンクしたアプタマーは、テオフィリンリボスイッチに由来する。テオフィリンの非存在下で (C)、アプタマーの部分（「テオフィリン・リボスイッチ」と示す）は、標的核酸（パネルの上部の二本鎖配列により示す）に結合すべき配列（「標的切断ガイド」と示す）の部分を結合して、gRNA が標的核酸にハイブリダイズすることを阻止する。図 1C において、配列は、上から下へ、配列番号 4 ~ 6 に対応する。アプタマーにテオフィリン（アプタマー配列に結合している中実の小分子として示す）が結合すると (D)、立体構造変化を受けて、「ガイド」配列が標的核酸に自由にハイブリダイズすることになる。図 1D において、配列は、上から下へ、配列番号 4、5、および 11 に対応する。

## 【 0 0 2 0 】

【図 2】図 2A ~ 図 2D は、mRNA をセンスする gRNA に関する本発明のいくつかの実施態様を示す。(A および B) 本図は、5' 転写物センサー / ガイドブロックモチーフを含む gRNA を示す。特定の mRNA の非存在下では (A)、転写物センサーの部分が結合されないままであり、標的核酸（パネル上部の二本鎖配列により示す）を結合すべき配列の特定の部分（「標的切断ガイド」と示す）をブロックするステム・ループ構造を形成し、その結果 gRNA が標的核酸にハイブリダイズすることを阻止する。図 2A において、配列は、上から下へ、配列番号 4、5、および 7 に対応する。転写物センサーがハイブリダイズする mRNA の存在下で (B)、gRNA は立体構造変化を受けて、「ガイド」配列が標的核酸に自由にハイブリダイズする。配列は、上から下へ、配列番号 4、5、7、および 12 に対応する。(C および D) 同様に、mRNA の非存在下で (C)、gRNA が「オフ」状態であり（配列は、上から下へ、配列番号 4、5、および 8 に対応する）、mRNA の存在下で (D)、gRNA が「オン」状態（配列は、上から下へ、配列番号 4、5、および 12 に対応する）であるように、この方策を、3' 転写物センサー / ガイドブロックを含む gRNA に応用できる。

## 【 0 0 2 1 】

【図 3】図 3A ~ 図 3D は、伸長 DNA (xDNA) 認識方策に関する本発明のいくつかの実施態様を示す。(A および B) 本実施態様では、5' xDNA センサー / ガイドブロッ

10

20

30

40

50

クモチーフを含む gRNA を示す。xDNA センサーモチーフは、標的核酸の他の部分（例えば、「標的切断ガイド」配列に追加して）に相補・ハイブリダイズする。（A）適正な標的配列（例、「ガイド」配列の標的と xDNA センサー配列の標的の両方を含む）の非存在下では、xDNA センサーの部分は結合しないままであり、その結果、標的核酸（パネルの上部に二本鎖配列で示す）に結合すべき配列の特定の部分（「標的切断ガイド」として示す）をブロックするステム・ループ構造を形成し、gRNA が標的核酸にハイブリダイズすることを阻止する。配列は、上から下へ、配列番号 4、5、および 9 に対応する。xDNA センサーの部位がハイブリダイズする適正な標的核酸の存在下では（B）、gRNA は立体構造変化を受けて、「ガイド」配列が自由に標的核酸にハイブリダイズする。配列は、上から下へ、13、14、および 9 に対応する。このように、適正な標的核酸の存在下でのみ、gRNA（および関連する Cas9 タンパク質）の結合は起こる。これは、例えば Cas9 : gRNA 複合体により認識される標的ヌクレオチドの数を効果的に増加させ（すなわち、延長させ）、特異性を高めることになる。（C および D）同様に、この方策は、標的核酸の非存在下では（C）、gRNA は「オフ」状態（配列は、上から下へ、配列番号 4、5、および 10）であり、標的核酸の存在下では（D）gRNA は「オン」状態であるよう、3' xDNA センサー / ガイドブロックを含む gRNA に応用できる。配列は上から下へかつ左から右へ配列番号 4、15、5、16、および 10 に対応する。

#### 【0022】

##### 定義

本明細書および請求の範囲で使用される、単数型の「a」、「an」、および「the」は、文脈から明らかに判別されない限り、単数型および複数型を含むものである。従って、例えば、「薬剤」という場合には、単一の薬剤および複数の薬剤を含む。

#### 【0023】

「アプタマー」という用語は、例えば特異的リガンドなどの特異的な標的分子に結合する核酸またはペプチド分子を意味する。いくつかの実施態様では、リガンドのアプタマーへの結合が、アプタマーと、例えばアプタマーへ接合またはリンクした他の分子とにおける立体構造変化を誘導する。いくつかの実施態様では、核酸（例、DNA または RNA）アプタマーは、例えば、小分子、大分子、代謝産物、タンパク質、タンパク質、炭水化物、金属、核酸、細胞、組織および有機体などの様々な分子標的に結合するように、in vitro の選択または同等の SELEX（試験管内進化法）を繰り返し行うことにより操作されている。小分子を結合するようにアプタマーを操作する方法は、当分野で公知であり、例えば、全内容を参照により本明細書に取り込む、米国特許第 5,580,737 号および第 8,492,082 号；Ellington and Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." *Nature*. 1990; 346:818-822; Tuerk and Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." *Science*. 1990; 249:505-510; Burke and Gold, "RNA aptamers to the adenosine moiety of S-adenosyl methionine: structural inferences from variations on a theme and the reproducibility of SELEX." *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(10):2020-4; Ulrich et al., "DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications." *Comb Chem High Throughput Screen*. 2006; 9(8):619-32; Svobodova et al., "Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes." *Anal Bioanal Chem*. 2012; 404:835-842 に記載のものが含まれる。核酸アプタマーは、例えば、リボスイッチの一部を形成するものなど天然にも存在している。「リボスイッチ」は、例えば代謝産物などの小分子を結合する mRNA 分子の制御セグメントであり、mRNA によりコードされるタンパク質（例、リボスイッチに結合する代謝産物の産生に関与するタンパク質）の産生に変化をもたらす。リボスイッチは、しばしば概念的に、アプタマーと発現プラットフォーム（例、mRNA）との 2 つの部分に分けられる。アプタマーは、小分子（例、代謝産物）を直接結合し、アプタマーの変化に応じて mRNA は構



造変化を起こす。通常、mRNAの構造変化により、タンパク質発現の減少または阻害が起こる。アプタマーは、当分野の常法により、リボスイッチからクローン（例、分離）し、それにリンクした他の分子（例、RNA、DNA）の活性を調節するために使用可能である。更に、天然に存在するアプタマーを、公知の方法により、合成の非天然小分子リガンドに結合するように再操作して、それにリンクした他の分子の活性を調節することが可能である。例えば、Dixon et al., "Reengineering orthogonally selective riboswitches." PNAS 2010; 107 (7): 2830-2835を参照、その全開示を参照により本明細書に組み込むものである。以下は、アプタマーを含むリボスイッチのリストであるが、これに限定するものではない。

#### 【 0 0 2 4 】

コバラミンリボスイッチ（B12エレメントとも呼ぶ）は、アデノシルコバラミン（ビタミンB12の補酵素型）を結合してコバラミン生合成およびコバラミンおよび同様の代謝産物の輸送、および他の遺伝子を制御する。例えば、Nahvi et al., "Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes." Nucleic Acids Res. 2004; 32: 143-150; Vitreschak et al., "Regulation of the vitamin B12 metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element." RNA. 2003; 9:1084-1097を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。

#### 【 0 0 2 5 】

サイクリックジGMPリボスイッチは、シグナル伝達分子サイクリックジGMPに調節される様々な遺伝子を制御するために、この2番目のメッセンジャーを結合する。サイクリックジGMP - IリボスイッチおよびサイクリックジGMP - IIリボスイッチの少なくとも2つのクラスのサイクリックジGMPリボスイッチが公知である。例えば、Sudarsan et al., "Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP." Science. 2008; 321 (5887): 411-3; Lee et al., "An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger." Science. 2010; 329 (5993): 845-8を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。

#### 【 0 0 2 6 】

FMNリボスイッチ（RFNエレメントとも呼ばれる）は、フラビンモノヌクレオチド（FMN）を結合して、リボフラビンの生合成および輸送を制御する。例えば、Winkler et al., "An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN." Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99 (25): 15908-15913; Serganov et al., "Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch." Nature. 2009; 458 (7235): 233-7を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。

#### 【 0 0 2 7 】

GlmSリボスイッチは、グルコサミン - 6 - リン酸が結合したとき自分自身を切断するリボザイムである。例えば、Winkler et al., "Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme." Nature. 2004; 428: 281-286; Jansen et al., "Backbone and nucleobase contacts to glucosamine-6-phosphate in the glmS ribozyme." Nat Struct Mol Biol. 2006; 13: 517-523; Hampel and Tinsley, "Evidence for preorganization of the glmS ribozyme ligand binding pocket." Biochemistry. 2006; 45: 7861-7871を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。

#### 【 0 0 2 8 】

グリシンリボスイッチは、グリシンを結合して、エネルギー源としてのグリシンの使用などのグリシン代謝遺伝子を制御する。例えば、"A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression." Science. 2004; 306 (5694): 275-279; Kwon and Strobel, "Chemical basis of glycine riboswitch cooperativity." RNA. 2008; 14 (1): 25-34を参照、それらの全内容を参照により本明細書

10

20

30

40

50

に取り込むものである。

【 0 0 2 9 】

リジンリボスイッチ ( L - b o x と呼ばれる ) は、リジンを結合して、リジンの生合成、異化および輸送を制御する。例えば、Sudarsan et al., "An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine." *Genes Dev.* 2003;17:2688-2697; Grundy et al., "The L box regulon: Lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100:12057-12062を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。

【 0 0 3 0 】

P r e Q 1 リボスイッチは、プレケオシン 1 を結合し、この前駆体のケエオシンへの合成または輸送に關与する遺伝子を制御する。P r e Q 1 - I リボスイッチおよび P r e Q 1 - I I リボスイッチの少なくとも 2 つの異なるクラスの P r e Q 1 リボスイッチが公知である。例えば、Roth et al., "A riboswitch selective for the queuosine precursor preQ1 contains an unusually small aptamer domain," *Nat Struct Mol Biol.* 2007; 14 (4): 308-317; Klein et al., "Cocrystal structure of a class I preQ1 riboswitch reveals a pseudoknot recognizing an essential hypermodified nucleobase," *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009; 16 (3): 343-344; Kang et al., "Structural Insights into riboswitch control of the biosynthesis of queuosine, a modified nucleotide found in the anticodon of tRNA." *Mol. Cell* 33 2009; (6): 784-90; Meyer et al., "Confirmation of a second natural preQ1 aptamer class in Streptococcaceae bacteria." *RNA* 2008; 14 (4): 685を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。

【 0 0 3 1 】

プリンリボスイッチは、プリンを結合して、プリンの代謝および輸送を制御する。異なる形態のプリンリボスイッチは、グアニン ( 元々 G - b o x として知られていた形態 ) またはアデニンを結合する。グアニンまたはアデニンのどちらかへの特異性は、例えば Y 7 4 などの特定の位置でのリボスイッチにおける単一のピリミジンとのワトソン・クリック型相互作用に完全に依存する。グアニンリボスイッチでは、この残基は通常シトシン ( 例、C 7 4 ) であり、アデニンリボスイッチでは通常ウラシル ( 例、U 7 4 ) である。プリンリボスイッチの相同型は、デオキシグアノシンを結合するが、一塩基変異以上の重要な相違がある。例えば、Serganov et al., "Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs." *Chem Biol.* 2004; 11 (12): 1729-41; Batey et al., "Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine." *Nature.* 2004; 432 (7015): 411-415; Mandal and Breaker, "Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator." *Nat Struct Mol Biol.* 2004; 11 (1): 29-35を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。

【 0 0 3 2 】

S A H リボスイッチは、S - アデノシルホモシステインを結合し、S - アデノシルメチオニンがメチレーション反応で使用されるときに産生されるこの代謝産物の再利用に關与する遺伝子を制御する。例えば、Wang et al., "Riboswitches that Sense S-adenosylhomocysteine and Activate Genes Involved in Coenzyme Recycling." *Mol. Cell* 2008; 29 (6): 691-702; Edwards et al., "Structural basis for recognition of S-adenosylhomocysteine by riboswitches." *RNA* 2010; 16 (11): 2144-2155を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。

【 0 0 3 3 】

S A M リボスイッチは、S - アデノシルメチオニン ( S A M ) を結合して、メチオニンおよび S A M の生合成および輸送を制御する。S A M - I ( 元々 S - b o x と呼ばれる ) 、S A M - I I 、S M K ボックスリボスイッチおよび S a m - I V の、少なくとも 4 つの S A M リボスイッチが知られている。S A M - I は、バクテリアにおいてよくみられるが

、SAM-Iはプロテオバクテリア およびプロテオバクテリア そして数種のプロテオバクテリア にだけ存在する。SMKボックスリボスイッチは、ラクトバチルス目にだけ存在すると考えられている。SAM-IVリボスイッチは、SAM-Iリボスイッチと類似のリガンド結合コアを有するが、異なるスカフォールドと関連している。例えば、Montange et al., "Structure of the S-adenosyl methionine riboswitch regulatory mRNA element." *Nature*. 2006; 441:1172 -1175; Winkler et al., "An mRNA structure that controls gene expression by binding Sadenosylmethionine." *Nat Struct Biol*. 2003; 10: 701 -707; Zasha et al., "The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches." *RNA*. 2008; 14(5): 822-828を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。

10

#### 【0034】

テトラヒドロ葉酸リボスイッチは、テトラヒドロ葉酸を結合して合成および輸送遺伝子を制御する。例えば、Ames et al., "A eubacterial riboswitch class that senses the coenzyme tetrahydrofolate." *Chem. Biol*. 2010; 17 (7): 681-5; Huang et al., "Long-range pseudoknot interactions dictate the regulatory response in the tetrahydrofolate riboswitch." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108 (36): 14801-6; Trausch et al., "The structure of a tetrahydrofolate-sensing riboswitch reveals two ligand binding sites in a single aptamer." *Structure*. 2011; 19 (10): 1413-23を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。

#### 【0035】

20

テオフィリンリボスイッチは、SELEXにより同定されたものであり、選択的に小分子テオフィリンを結合する。アプタマーは、テオフィリン結合に必要な15ヌクレオチドコアモチーフを含む。例えば、Jenison et al., "High-resolution molecular discrimination by RNA." *Science*. 1994; 263:1425-1429; Zimmerman et al., "Molecular interactions and metal binding in the theophylline-binding core of an RNA aptamer." *RNA*. 2000; 6(5):659-67; Suess et al., "A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo." *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(4): 1610-1614を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。例えば、図1Cおよび図1D。

#### 【0036】

30

TPPリボスイッチ(THI-ボックスとも呼ぶ)は、チアミンピロリン酸エステル(TPP)を結合して、チアミン生合成および輸送と同様の代謝産物の輸送を制御する。それは、真核生物で今までに見つかった唯一のリボスイッチと考えられている。例えば、Edwards et al., "Crystal structures of the thi-box riboswitch bound to thiamine pyrophosphate analogs reveal adaptive RNA-small molecule recognition." *Structure* 2006; 14 (9): 1459-68; Winkler et al., "Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression." *Nature*. 2002; 419 (6910): 952-956; Serganov et al., "Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch." *Nature*. 2006; 441 (7097): 1167-1171を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである。

40

#### 【0037】

「Cas9」または「Cas9ヌクレアーゼ」という用語は、Cas9タンパク質またはその断片を含むRNA誘導型ヌクレアーゼを意味する。Cas9ヌクレアーゼは、casn1ヌクレアーゼまたはCRISPR(集まって規則的に間を空けて配置された短い回文配列の繰り返し)関連ヌクレアーゼとも呼ばれることがある。CRISPRは、可動遺伝要素(例、ウィルス、転移因子および接合プラスミド)からの防御を提供する獲得免疫システムである。CRISPRクラスターは、スペーサー、先行可動エレメントに相補的な配列、および標的侵入核酸を含む。CRISPRクラスターは、CRISPRRNA(crRNA)へ転写・プロセシングされる。II型CRISPRシステムでは、crRNA前駆体の適正なプロセシングは、トランスコード化スモールRNA(tracrRNA

50

)、内因性リボヌクレアーゼ3 ( r n c ) および C a s 9 タンパク質を必要とする。 t r a c r R N A は、 c r R N A 前駆体のリボヌクレアーゼ3 支援プロセッシング用ガイドとして機能する。その後、 C a s 9 / c r R N A / t r a c r R N A は、スパーサーに相補的な直鎖または環状 d s D N A 標的を核酸内部で切断する。 c r R N A に相補的でない標的鎖は、まず核酸内部で切断され、その後 3 ' - 5 ' で末端から切断される。自然界では、 D N A の結合および切断は、通常タンパク質と両種類の R N A を必要とする。しかしながら、単一ガイド R N A ( 「 s g R N A 」、または単に「 g R N A 」) を操作して、 c r R N A および t r a c r R N A の両方の部分を単一の R N A 分子に組み込むことが可能である。例えば、Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)を参照、その全開示を参照により本明細書に組み込むものである。 C a s 9 は、 C R I S P R 反復配列 ( P A M すなわちプロトスパー隣接モチーフ) 中の短いモチーフを認識し、自己と非自己の区別を助ける。 C a s 9 ヌクレアーゼの配列および構造は当業者には公知である (例えば、"Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes." Ferretti J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najjar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L. expand/collapse author list McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 4658-4663(2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607(2011); and "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)を参照、その全開示を参照により本明細書に組み込むものである)。 C a s 9 相同分子種は、様々な種類が記載されており、限定するものではないが、 S . ピオゲネスおよび S . サーモフィルスが挙げられる。その他の好適な C a s 9 ヌクレアーゼおよび配列は、当業者には本開示に基づいて明らかであろう。そのような C a s 9 ヌクレアーゼおよび配列には、全開示を参照により本明細書に組み込むChylinski, Rhun, and Charpentier, "The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems" (2013) RNA Biology 10:5, 726-737に開示された有機体および遺伝子座由来の C a s 9 配列も含まれる。いくつかの実施態様では、 C a s 9 を含むタンパク質またはその断片タンパク質は、「 C a s 9 変異体」と呼ばれている。 C a s 9 変異体は、 C a s 9 またはその断片に対して相同である。例えば、 C a s 9 変異体は、野生型 C a s 9 と少なくとも約 7 0 % 同一、少なくとも約 8 0 % 同一、少なくとも約 9 0 % 同一、少なくとも約 9 5 % 同一、少なくとも約 9 8 % 同一、少なくとも約 9 9 % 同一、少なくとも約 9 9 . 5 % 同一、または少なくとも約 9 9 . 9 % 同一である。いくつかの実施態様では、 C a s 9 変異体は、野生型 C a s 9 の対応する断片と少なくとも約 7 0 % 同一、少なくとも約 8 0 % 同一、少なくとも約 9 0 % 同一、少なくとも約 9 5 % 同一、少なくとも約 9 8 % 同一、少なくとも約 9 9 % 同一、少なくとも約 9 9 . 5 % 同一、または少なくとも約 9 9 . 9 % 同一である C a s 9 の断片 (例、 g R N A 結合ドメインまたは D N A 切断ドメイン) を含む。いくつかの実施態様では、野生型 C a s 9 は、ストレプトコッカス・ピオゲネス ( N C B I リファレンス配列: N C \_ 0 1 7 0 5 3 . 1、配列番号 1 (ヌクレオチド); 配列番号 2 (アミノ酸)) 由来の C a s 9 に対応する。

【数 1】

10

20

30

40

ATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCACAAATAGCGTCGGATGGGCGGTGATCACTGATG  
ATTATAAGGTTCCGTCTAAAAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACAGACCGCCACAGTATCAAAAAAATCT  
TATAGGGGCTCTTTTATTTGGCAGTGGAGAGACAGCGGAAGCGACTCGTCTCAAACGGACAGCTCGTAGA  
AGGTATACACGTCGGAAGAATCGTATTTGTTATCTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAG  
ATGATAGTTTCTTTTCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTGGTGGAAGAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCC  
TATTTTTGGAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATATCCAACATCTATCATCTGCGAAAA  
AAATTGGCAGATTCTACTGATAAAGCGGATTGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTAAGT  
TTCGTGGTCATTTTTTGATTGAGGGAGATTTAAATCCTGATAATAGTGATGTGGACAACTATTTATCCA

10

【数 2】

20

30

40

50

GTTGGTACAAATCTACAATCAATTATTTGAAGAAAACCCATTATAACGCAAGTAGAGTAGATGCTAAAGCG  
ATTCTTTCTGCACGATTGAGTAAATCAAGACGATTAGAAAATCTCATTGCTCAGCTCCCCGGTGAGAAGA  
GAAATGGCTTGTTGGGAATCTCATTGCTTTGTTCATTGGGATTGACCCCTAATTTTAAATCAAATTTTGA  
TTTGGCAGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAAGATACTTACGATGATGATTAGATAATTTATTGGCG  
CAAATTGGAGATCAATATGCTGATTGTTTTTGGCAGCTAAGAATTTATCAGATGCTATTTTACTTTTCAG  
ATATCCTAAGAGTAAATAGTGAAATAACTAAGGCTCCCTATCAGCTTCAATGATTAAGCGCTACGATGA  
ACATCATCAAGACTTGACTCTTTTAAAAGCTTTAGTTTCGACAACAACCTCCAGAAAAGTATAAAGAAATC  
TTTTTTGATCAATCAAAAACGGATATGCAGGTTATATTGATGGGGGAGCTAGCCAAGAAGAATTTTATA  
AATTTATCAAACCAATTTTAGAAAAATGGATGGTACTGAGGAATTATTGGTGAAACTAAATCGTGAAGA  
TTTGCTGCGCAAGCAACGGACCTTTGACAACGGCTCTATTCCCATCAAATTCACCTGGGTGAGCTGCAT  
GCTATTTTGAAGAACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTTAAAGACAATCGTGAGAAGATTGAAAAATCT  
TGACTTTTCGAATTCCTTATTATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTGCATGGATGACTCG  
GAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAATTTTGAAGAAGTTGTCGATAAAGGTGCTTCAGCTCAATCA  
TTTATTGAACGCATGACAACTTTGATAAAAAATCTTCCAAATGAAAAAGTACTACCAAAACATAGTTTGC  
TTTATGAGTATTTTACGGTTTATAACGAATTGACAAAGGTCAAATATGTTACTGAGGGAATGCGAAAACC  
AGCATTTCTTTCAGGTGAACAGAAGAAAGCCATTGTTGATTTACTCTTCAAAACAAATCGAAAAGTAACC  
GTTAAGCAATTAAGAAGATTATTTCAAAAAATAGAATGTTTTGATAGTGTTGAAATTTTCAGGAGTTG  
AAGATAGATTTAATGCTTCATTAGGCGCCTACCATGATTGCTAAAAATTATTAAAGATAAAGATTTTTT  
GGATAATGAAGAAAATGAAGATATCTTAGAGGATATTGTTTTAACATTGACCTTATTTGAAGATAGGGGG  
ATGATTGAGGAAAGACTTAAACATATGCTCACCTCTTTGATGATAAGGTGATGAAACAGCTTAAACGTC  
GCCGTTATACTGGTTGGGGACGTTTGTCTCGAAAATTGATTAATGGTATTAGGGATAAGCAATCTGGCAA  
AACAAATATTAGATTTTTTGAATCAGATGGTTTTGCCAATCGCAATTTTATGACGCTGATCCATGATGAT  
AGTTTGACATTTAAAGAAGATATTCAAAAAGCACAGGTGTCTGGACAAGGCCATAGTTTACATGAACAGA  
TTGCTAACTTAGCTGGCAGTCTGTCTATTAAAAAGGTATTTTACAGACTGTAAAAATTGTTGATGAACT  
GGTCAAAGTAATGGGGCATAAGCCAGAAAATATCGTTATTGAAATGGCACGTGAAAATCAGACAACCTCAA  
AAGGGCCAGAAAATTCGCGAGAGCGTATGAAACGAATCGAAGAAGGTATCAAAGAATTAGGAAGTCAGA  
TTCTTAAAGAGCATCTGTGAAAATACTCAATTGCAAAATGAAAAGCTCTATCTCTATTATCTACAAAA  
TGGAAGAGACATGTATGTGGACCAAGAATTAGATATTAATCGTTTAAAGTGATTATGATGTCGATCACATT  
GTTCCACAAAGTTTCATTAAAGACGATTCAATAGACAATAAGGTACTAACGCGTTCTGATAAAAAATCGTG  
GTAAATCGGATAACGTTCCAAGTGAAGAAGTAGTCAAAAAGATGAAAAACTATTGGAGACAACCTTCTAAA  
CGCCAAGTTAATCACTCAACGTAAGTTTGATAATTTAACGAAAGCTGAACGTGGAGGTTTGAGTGAACTT  
GATAAAGCTGGTTTTATCAACGCCAATTGGTTGAAACTCGCCAAATCACTAAGCATGTGGCACAAATTT  
TGGATAGTCGATGAATACTAAATACGATGAAAAATGATAAACTTATTCGAGAGGTTAAAGTGATTACCTT  
AAAATCTAAATTAGTTTCTGACTTCCGAAAAGATTTCGAATTTATAAAGTACGTGAGATTAAACAATTAC  
CATCATGCCCATGATGCGTATCTAAATGCCGTCGTTGGAACGCTTTGATTAAAGAAATATCCAAAACCTTG  
AATCGGAGTTTGTCTATGGTGATTATAAAGTTTATGATGTTTCGTAAGTATGATTGCTAAGTCTGAGCAAGA  
AATAGGCAAAGCAACCGCAAAATATTCTTTTACTCTAATATCATGAACCTTCTTCAAAACAGAAATTACA  
CTTGCAAAATGGAGAGATTTCGCAACGCCCTCTAATCGAAACTAATGGGGAAACTGGAGAAATTGCTGCGG  
ATAAAGGGCGAGATTTTGCCACAGTGCAGCAAGTATTGTCCATGCCCCAAGTCAATATTGTCAAGAAAAC  
AGAAGTACAGACAGGCGGATTCTCCAAGGAGTCAATTTTACCAAAAGAAATTCGGACAAGCTTATTGCT  
CGTAAAAAAGACTGGGATCCAAAAAATATGGTGGTTTTGATAGTCCAACGGTAGCTTATTCAGTCCTAG  
TGGTTGCTAAGGTGAAAAAGGGAATCGAAGAAGTTAAATCCGTTAAAGAGTTACTAGGGATCACAAT  
TATGGAAAGAAGTTCCTTTGAaaaaATCCGATTGACTTTTTAGAAGCTAAAGGATATAAGGAAGTTAAA  
AAAGACTTAATCATTAAACTACCTAAATATAGTCTTTTTGAGTTAGAAAACGGTCGTAAACGGATGCTGG

10

20

30

40

【数 3】

CTAGTGCCGGAGAATTACAAAAAGGAAATGAGCTGGCTCTGCCAAGCAAATATGTGAATTTTTTATATT  
AGCTAGTCATTATGAAAAGTTGAAGGGTAGTCCAGAAGATAACGAACAAAAACAATTGTTTGTGGAGCAG  
CATAAGCATTATTTAGATGAGATTATTGAGCAAATCAGTGAATTTTCTAAGCGTGTTATTTTAGCAGATG  
CCAATTTAGATAAAGTTCTTAGTGACATATAACAAACATAGAGACAAACCAATACGTGAACAAGCAGAAAA  
TATTATTCAATTTATTTACGTTGACGAATCTTGAGCTCCCGCTGCTTTTAAATATTTTGATACAACAATT  
GATCGTAAACGATATACGTCTACAAAAGAAGTTTTAGATGCCACTCTTATCCATCAATCCATCACTGGTC  
TTTATGAAACACGCATTGATTTGAGTCAGCTAGGAGGTGACTGA (配列番号1)

10

## 【数4】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSSKFKVLGNDRHSIKKNLIGALLFGSGETAETRLKRTARR  
RYTRRNKRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK  
KLADSTDKADLRILIYLAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQIYNQLFEENPINASRVDAKA  
ILSARLSKSRRLNLIQAQLPGEKRNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA  
QIGDQYADFLAANKLSDAILLSDILRVNSEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI  
FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH  
AILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQS  
FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVT  
VKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGAYHDLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDRG  
MIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKITLDFLKSDFANRNFQMQLIHDD  
SLTFKEDIQKAQVSGQGHSLHEQIANLAGSPAIKKGILQTVKIVDELVKVMGHKPENIVIEMARENQTTQ  
KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHI  
VPQSF IKDSDIDNKVLTSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL  
DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNY  
HHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVIDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT  
LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIA  
RKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVK  
KDLIIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQ  
HKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTI  
DRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号2)

20

30

## 【0038】

「接合している」、「接合した」、および「接合」という用語は、例えば、2つのタンパク質などの2つの分子、2つのドメイン（例、結合ドメインおよび切断ドメイン）、またはタンパク質および薬剤、例えばタンパク質結合ドメインおよび小分子などの2つの実体の会合を意味する。いくつかの側面では、会合は、タンパク質（例、RNAプログラム可能ヌクレアーゼ）と核酸（例、ガイドRNA）の間でおこる。会合は、例えば直接的または間接的（例、リンカーを介する）な共有結合を介してもよい。いくつかの実施態様では、会合は共有結合による。いくつかの実施態様では、2つの分子は、両分子を結合するリンカーを介して接合している。例えば、アプタマー（すなわち核酸をセンスするドメイン）およびgRNAなどのRNAの2つの部分が相互に接合している実施態様では、2つのRNAは、例えば1つのRNAの3'末端を他のRNAの5'末端に結合するヌクレオチド配列などのポリヌクレオチドリンカーを介して接合することができる。いくつかの実施態様では、リンカーは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、または少なくとも30個のヌクレオチドを含む。

40

## 【0039】

核酸配列と関連して本明細書で使用される「コンセンサス配列」という用語は、複数の類似の配列の各位置において最も頻繁に見られるヌクレオチド残基を表す計算された配列を意味する。通常、コンセンサス配列は、類似の配列を相互に比較し類似の配列モチーフ

50

を計算する配列アライメントにより決定される。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用される「有効量」という用語は、所望の生物学的応答を誘発するのに十分な生理活性薬剤の量を意味する。例えば、いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼの有効量は、好ましくはオフターゲット切断が最小または存在せずに、ヌクレアーゼが特異的に結合・切断する所望の標的部位の切断を誘導するのに十分なヌクレアーゼの量を意味することができる。当業者には理解されるであろうように、例えば、ヌクレアーゼ、ハイブリッドタンパク質、融合タンパク質、タンパク質ダイマー、タンパク質（またはタンパク質ダイマー）とポリヌクレオチドの複合体、またはポリヌクレオチドなどの薬剤の有効量は、例えば、所望の生物学的応答、標的となる特異的なアレル、ゲノム、標的部位、細胞、または組織、および使用される薬剤などの様々な因子により変化するであろう。

10

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用される「操作されている」という用語は、人工的に設計、産生、調製、合成および/または製造された核酸分子、タンパク質分子、複合体、物質、または実体を意味する。従って、操作された産物は、天然に存在しない産物である。

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用される「リンカー」という用語は、例えばアプタマー（すなわち核酸をセンスするドメイン）と gRNA などの 2 つの隣接分子または部分を連結する化学基または分子を意味する。通常、リンカーは、2 つの基、分子、または他の部分の間に位置するかまたはそれらに隣接し、共有結合によりそれぞれに結合することで、それら 2 つのものを結合する。いくつかの実施態様では、リンカーは、ヌクレオチドリリンカーである。いくつかの実施態様では、ヌクレオチドリリンカーは、少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 25、または少なくとも 30 個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、リンカーは、アミノ酸または複数のアミノ酸（例、ペプチドまたはタンパク質）である。いくつかの実施態様では、リンカーは、有機分子、基、ポリマー、または化学部分である。

20

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される「変異」という用語は、例えば核酸またはアミノ酸配列などの配列内の残基を、他の残基と置換すること、配列内の 1 つ以上の残基を欠失または挿入することを意味する。本明細書には、変異は、通常、元の残基を特定すること、その後配列内に残基を配置すること、および新たに置換した残基の特定により表される。本明細書で提供されるアミノ酸置換（変異）方法は、当分野で公知であり、例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012)により提供される。

30

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される「ヌクレアーゼ」という用語は、核酸分子中のヌクレオチド残基を連結するリン酸ジエステル結合を切断することが可能な、例えばタンパク質または小分子などの薬剤を意味する。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼは、例えば核酸分子を結合し、核酸分子内のヌクレオチド残基を連結するリン酸ジエステル結合を切断可能な酵素などのタンパク質である。ヌクレアーゼは、ポリヌクレオチド鎖内のリン酸ジエステル結合を切断するエンドヌクレアーゼ、あるいはポリヌクレオチド鎖の末端リン酸ジエステル結合を切断するエキソヌクレアーゼであってもよい。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼは、本明細書では「認識配列」、「ヌクレアーゼ標的部位」、または「標的部位」とも呼ばれる特異的なヌクレオチド配列内の特異的なリン酸ジエステル結合を連結および/または切断する部位特異的ヌクレアーゼである。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼは、標的部位に相補する配列を有する RNA（例、ガイド RNA、「gRNA」）と複合体を形成する（例えばそれと結合する）ことでヌクレアーゼの配列特異性を提供する RNA 誘導型（すなわち、RNA プログラム可能）ヌクレアーゼである。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼは、一本鎖標的部位を認識する。他の実施態様では、ヌクレアーゼ

40

50



は、例えば二本鎖DNA標的部位などの二本鎖標的部位を認識する。例えば多くの天然に存在するDNA制限ヌクレアーゼなどの多くの天然に存在するヌクレアーゼ標的部位は、当業者には公知である。多くのケースでは、EcoRI、HindIII、またはBamHIなどのDNAヌクレアーゼは、長さが4～10個の塩基対のパリンドロームである二本鎖DNA標的部位を認識し、標的部位内の特異的な位置で二本のDNA鎖の各鎖を切断する。いくつかのエンドヌクレアーゼは、二本鎖核酸標的部位を対称的に、すなわち本明細書では平滑末端とも呼ぶ末端が塩基対をなすヌクレオチドからなるように両鎖を同じ位置で切断する。他のエンドヌクレアーゼは、二本鎖核酸標的部位を非対称的に、すなわち末端が対をなさないヌクレオチドからなるように両鎖を異なる位置で切断する。二本鎖DNA分子の末端の不對のヌクレオチドは、不對のヌクレオチドがそれぞれのDNA鎖の5'または5'末端を形成するかにより、例えば「5'突出」または「3'突出」のように「突出」とも呼ばれる。末端が不對のヌクレオチドである二本鎖DNA分子の末端は、相補的不對ヌクレオチドを含む他の二本鎖DNA分子末端に「粘着」可能なので、粘着末端とも呼ばれる。ヌクレアーゼタンパク質は、通常タンパク質と核酸基質との相互作用を仲介し、更にいくつかのケースでは、特異的に標的部位に結合する「結合ドメイン」と、核酸主鎖内のリン酸ジエステル結合の切断を触媒する「切断ドメイン」とを含む。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼタンパク質は、単量体の形態で核酸分子を結合・切断可能であるが、他の実施態様では、ヌクレアーゼタンパク質は、標的核酸分子を切断するために二量体化または多量体化する必要がある。天然に存在するヌクレアーゼの結合ドメインおよび切断ドメインと、融合して特異的な標的部位に結合するヌクレアーゼを作成可能なモジュールの結合ドメインおよび切断ドメインは、当業者には公知である。例えば、RNAプログラム可能ヌクレアーゼ(例、Cas9)の結合ドメイン、すなわち不活性DNA切断ドメインを有するCas9タンパク質を、所望の標的部位を特異的に結合する結合ドメイン(例、gRNAに結合して標的部位への結合を指示する)として使用し、例えばFokIの切断ドメインなどの切断ドメインと融合または接合し標的部位を切断するよう操作されたヌクレアーゼを作成することが可能である。

#### 【0045】

本明細書で使用される「核酸」および「核酸分子」という用語は、例えばヌクレオシド、ヌクレオチド、ヌクレオチドの多量体などの核酸塩基および酸性部分を含む化合物を意味する。通常、例えば3つ以上のヌクレオチドを含む核酸分子などの核酸多量体は、隣接するヌクレオチドがリン酸ジエステル結合により相互に連結された直鎖分子である。いくつかの実施態様では、「核酸」は、個々の核酸残基を意味する(例、ヌクレオチドおよび/またはヌクレオシド)。いくつかの実施態様では、「核酸」は3つ以上の個々のヌクレオチド残基を含むオリゴヌクレオチド鎖を意味する。本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語は、互換可能に使用でき、ヌクレオチドの多量体(例、少なくとも3つのヌクレオチドがつながったもの)を意味する。いくつかの実施態様では、「核酸」は、一本鎖および/または二本鎖DNAと同様に、RNAも含む。核酸は、例えばゲノム、転写物、mRNA、tRNA、rRNA、siRNA、snRNA、プラスミド、コスミド、染色体、染色分体、または他の天然に存在する核酸分子などとして、天然に存在するものでもよい。他方、核酸分子は、例えば組換えDNAまたはRNA、人工染色体、操作されたゲノムまたはその断片、または合成DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、または天然に存在しないヌクレオチドまたはヌクレオシドを含むものなどの、天然に存在しない分子でもよい。更に、「核酸」、「DNA」、「RNA」という用語および/または類似の用語には、核酸類似体、すなわちリン酸ジエステル主鎖以外を有する類似体が含まれる。核酸は、天然の原料から精製する、組換え発現システムを使用して産生し任意に精製する、化学的に合成するなどが可能である。必要に応じて、例えば化学的に合成された分子の場合には、核酸は、化学修飾した塩基または糖および主鎖修飾を有する類似体などのヌクレオシド類似体を含むことが可能である。核酸配列は、特に記載がない限り、5'から3'の方向に記述される。いくつかの実施態様では、核酸は、天然のヌクレオシド(例、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウ

10

20

30

40

50

リジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、およびデオキシチジン）；ヌクレオシド類似体（例、2 - アミノアデノシン、2 - チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3 - メチルアデノシン、5 - メチルシチジン、2 - アミノアデノシン、C 5 - プロモウリジン、C 5 - フルオロウリジン、C 5 - ヨードウリジン、C 5 - プロピニルウリジン、C 5 - プロピニルシチジン、C 5 - メチルシチジン、2 - アミノアデノシン、7 - デアザアデノシン、7 - デアザグアノシン、8 - オキソアデノシン、8 - オキソグアノシン、O ( 6 ) - メチルグアニン、および2 - チオシチジン）；化学修飾した塩基；生物学的に修飾した塩基（例、メチル化塩基）；挿入塩基；修飾糖（例、2' - フルオロリボース、リボース、2' - デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース）；および/または修飾したリン酸基（例、ホスホロチオエートおよび5' - N - ホスホラミダイト連鎖）であるか、それらを含む。

10

**【 0 0 4 6 】**

本明細書で使用される「医薬組成物」という用語は、疾患または障害の処置と関連して対象に投与可能な組成物を意味する。いくつかの実施態様では、医薬組成物は、例えばヌクレアーゼまたはヌクレアーゼをコードする核酸などの活性成分と医薬的に許容される賦形剤とを含む。

**【 0 0 4 7 】**

本明細書で使用される「増殖性疾患」という用語は、細胞または細胞集団が異常に高い増殖速度を示すように細胞または組織恒常性が障害された疾患を意味する。増殖性疾患には、前腫瘍過形成状態および腫瘍性疾患などの過剰増殖性疾患が含まれる。腫瘍性疾患は、細胞の異常増殖により特徴付けられ、良性および悪性新生物の両方が含まれる。悪性新生物は、癌とも呼ばれる。

20

**【 0 0 4 8 】**

「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」という用語は、本明細書では互換的に使用され、ペプチド（アミド）結合により連結したアミノ酸残基の多量体を意味する。それらの用語は、任意のサイズ、構造、機能のタンパク質、ペプチド、またはポリペプチドを意味する。通常、タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、少なくとも3個のアミノ酸長を有するであろう。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、個々のタンパク質またはタンパク質の集まりを意味することができる。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチド中の1つ以上のアミノ酸は、例えば、接合、官能基化、または他の修飾用リンカー、炭水化物基、ヒドロキシ基、リン酸基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸基などの化学成分の付加などにより修飾されていてもよい。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、単一の分子でも、多分子複合体であることもできる。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、天然に存在するタンパク質またはペプチドの断片であってもよい。タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドは、天然、組換え、または合成されたもの、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。本明細書で使用される「融合タンパク質」という用語は、少なくとも2つの異なるタンパク質由来のタンパク質ドメインを含むハイブリッドポリペプチドを意味する。1つのタンパク質を、融合タンパク質のアミノ末端（N末端）部分またはカルボキシ末端（C末端）タンパク質に配置して、それぞれ「アミノ末端融合タンパク質」または「カルボキシ末端融合タンパク質」を形成してもよい。タンパク質は、例えば、核酸結合ドメイン（例、タンパク質の標的部位への結合を指令するC a s 9のg R N A結合ドメイン）および核酸切断ドメインなどの異なるドメインを含むことができる。いくつかの実施態様では、タンパク質は、例えば核酸結合ドメインを構成するアミノ酸配列などのタンパク質性部分と、例えば核酸切断剤として作用可能な化合物などの有機化合物とを含む。いくつかの実施態様では、タンパク質は、核酸、例えばRNAとの複合体であるか、会合している。本明細書で提供されるタンパク質のいずれも、当分野で公知の任意の方法により産生できる。例えば、本明細書で提供されるタンパク質は、組換えタンパク質の発現・精製により産生でき、これはペプチドリナーを含む融合タンパク質に特に好適である。組換えタンパク質の発現・精製の方法は公知であり、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory M

30

40

50

anual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012))に記載されるの方法が挙げられ、その全開示を参照により本明細書に組み込むものである。

#### 【0049】

「RNAプログラム可能ヌクレアーゼ」および「RNA誘導型ヌクレアーゼ」という用語は、本明細書では互換的に使用され、切断の標的ではない1つ以上のRNAと複合体を形成（例えば、結合または会合）するヌクレアーゼを意味する。いくつかの実施態様では、RNAとの複合体であるとき、RNAプログラム可能ヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ：RNA複合体と呼ばれる。通常、結合したRNAは、ガイドRNA（gRNA）と呼ばれる。gRNAは、2つ以上のRNAの複合体または単一のRNA分子として存在可能である。「gRNA」は単一の分子または2つ以上の分子の複合体のいずれかとして存在するガイドRNAを意味するよう互換的に使用されるが、単一のRNA分子として存在するgRNAは、シングルガイドRNA（sgRNA）と呼ぶことができる。通常、単一のRNA種として存在するgRNAは、少なくとも2つのドメイン：（1）標的核酸との相同性を共有するドメイン（例、Cas9複合体の標的への結合を指令する）；および（2）Cas9タンパク質を結合するドメインを有する。いくつかの実施態様では、ドメイン（2）は、「図1～図4のいずれかに示す「sgRNA主鎖」である。いくつかの実施態様では、ドメイン（2）は、tracrRNAとして知られる配列に対応し、ステム・ループ構造を含む。例えば、いくつかの実施態様では、ドメイン（2）は、全開示を参照により本明細書に組み込むJinek et al., Science 337:816-821(2012)の図1Eに示すtracrRNAに相同である。いくつかの実施態様では、ドメイン2は、図1～図4のいずれかの「sgRNA主鎖」と、またはJinek et al., Science 337:816-821(2012)に記載のtracrRNAと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である。いくつかの実施態様では、gRNAは、2つ以上のドメイン（1）および（2）を含み、「伸長gRNA」と呼ぶことができる。例えば、伸長gRNAは、2つ以上のCas9タンパク質を結合し、2つ以上の異なる領域で標的核酸を結合する。gRNAは、ヌクレアーゼ/RNA複合体の標的部位への結合を仲介する、標的部位に相補するヌクレオチド配列を含み、ヌクレアーゼ：RNA複合体の配列特異性を提供する。標的核酸を結合するgRNAの配列は、標的の領域に相補し、ヌクレアーゼ：RNA複合体が結合するのに好適な配列を含むことが可能である。いくつかの実施態様では、RNAプログラム可能ヌクレアーゼは、（CRISPR関連システム）Cas9エンドヌクレアーゼ、例えば、ストレプトコッカスピオゲネス由来のCas9（Csn1）である（例えば、"Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes." Ferretti J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L. expand/collapse author list McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663(2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607(2011); and "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)を参照、その全開示を参照により本明細書に組み込むものである）。

#### 【0050】

RNAプログラム可能ヌクレアーゼ（例、Cas9）は、RNA：DNAハイブリダイゼーションを使用して標的DNA切断部位を決定し、これらのタンパク質は原理的にはガイドRNAに特定された任意の配列を切断可能である。部位特異的切断のため（例、ゲノムを修飾するため）に、Cas9などのRNAプログラム可能ヌクレアーゼを使用する方法は、当分野で公知である（例、Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823 (2013); Mali, P. et al. RNA-gui

10

20

30

40

50

ded human genome engineering via Cas9. Science 339, 823-826 (2013); Hwang, W.Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nature biotechnology 31, 227-229 (2013); Jinek, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife 2, e00471 (2013); Dicarlo, J.E. et al. Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems. Nucleic acids research (2013); Jiang, W. et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature biotechnology 31, 233-239 (2013)を参照、その全開示を参照により本明細書に組み込むものである)。

#### 【0051】

「小分子」および「有機化合物」という用語は、本明細書では互換的に使用され、比較的小さい分子量を有する天然または人工的に作成された(例、化学合成により)分子を意味する。通常、有機化合物は炭素を含む。有機化合物は、複数の炭素-炭素結合、立体中心、および他の官能基(例、アミン類、ヒドロキシ、カルボニル類、またはヘテロサイクリック環類)を含むことができる。いくつかの実施態様では、有機化合物は単量体であり、約1500 g/mol未満の分子量を有する。ある実施態様では、小分子の分子量は、約1000 g/mol未満または約500 g/mol未満である。ある実施態様では、小分子は、例えばヒトまたは動物における使用で適切な、政府機関または規制団体により既に安全および効果的であるとみなされた薬物などの薬物である。ある実施態様では、小分子は、アプタマーを結合することが知られている。いくつかの実施態様では、有機化合物は、例えば、ジネマイシン、ネオカルチノスタチン、カリチアマイシン、エスペラミシン、ブレオマイシン、またはそれらの誘導体などの抗がん抗生物質などの抗生物質である。

#### 【0052】

本明細書で使用される「対象」という用語は、例えば個々の哺乳動物などの個々の有機体を意味する。いくつかの実施態様では、対象はヒトである。いくつかの実施態様では、対象は、ヒト以外の哺乳動物である。いくつかの実施態様では、対象は、ヒト以外の霊長類である。いくつかの実施態様では、対象はげっ歯動物である。いくつかの実施態様では、対象は、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ネコまたはイヌである。いくつかの実施態様では、対象は、脊椎動物、両生類、爬虫類、魚類、昆虫、ハエ、または線虫である。いくつかの実施態様では、対象は、研究動物である。いくつかの実施態様では、対象は、遺伝操作されており、例えば遺伝操作されているヒト以外の対象である。対象は、どちらの性別でも、発達のどの段階でもよい。

#### 【0053】

ヌクレアーゼと関連して本明細書で使用される「標的核酸」および「標的ゲノム」という用語は、それぞれ、所与のヌクレアーゼが標的とする少なくとも1つの標的部位を含む核酸分子またはゲノムを意味する。

#### 【0054】

本明細書では「ヌクレアーゼ標的部位」という用語と互換的に使用される「標的部位」という用語は、ヌクレアーゼが結合して切断する核酸分子内の配列を意味する。標的部位は、一本鎖でも二本鎖であってもよい。RNA誘導型(例、RNAプログラム可能)ヌクレアーゼ(例、Cas9 gRNA結合ドメインおよび活性Cas9 DNA切断ドメインを含むタンパク質ダイマー)と関連して、標的部位は、通常、RNAプログラム可能ヌクレアーゼのgRNAと相補的なヌクレオチド配列と、gRNA相補配列に隣接する3'末端にプロト Spacer 隣接モチーフ(PAM)とを含む。RNA誘導型ヌクレアーゼCas9では、いくつかの実施態様では、標的部位は、20塩基対プラス3塩基対PAM(例、NNN、Nは任意のヌクレオチドを示す)であってもよい。通常、PAMの1番目のヌクレオチドは、任意のヌクレオチドであり得るが、下流の2個のヌクレオチドは、特定のRNA誘導型ヌクレアーゼに依存して特定される。Cas9などのRNA誘導型ヌクレアーゼの標的部位の例は、当業者には公知であり、限定することなく、NNG、NGN、NAG、およびNGGが含まれ、Nは任意のヌクレオチドである。更に、異なる種由来のCas9ヌクレアーゼ(例、S.ピオゲネスの代わりにS.サーモフィルス)は、配列：NNG

NGを含むPAMを認識する。その他のPAM配列は公知であり、限定するものではないが、NNAGAAWおよびNAAR（例えば、Esvelt and Wang, Molecular Systems Biology, 9:641 (2013)を参照、その全開示を参照により本明細書に組み込むものである）が挙げられる。例えばCas9などのRNA誘導型ヌクレアーゼの標的部位は、〔NZ〕-〔PAM〕構造を含んでもよく、各Nは独立して任意のヌクレオチドであり、Zは1～50の整数である。いくつかの実施態様では、Zは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、または少なくとも50である。いくつかの実施態様では、Zは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50である。いくつかの実施態様では、Zは20である。いくつかの実施態様では、「標的部位」は、ヌクレアーゼが結合するが切断しない核酸分子内の配列を意味することもできる。

#### 【0055】

「処置」、「処置する」、および「処置している」という用語は、本明細書で記載されるような疾患または障害またはその1つ以上の症状を逆行、軽減、発症の遅延または進行の阻止を目的とする臨床介入を意味する。本明細書で使用される「処置」、「処置する」、および「処置している」という用語は、本明細書で記載されるような疾患または障害またはその1つ以上の症状を逆行、軽減、発症の遅延または進行の阻止を目的とする臨床介入を意味する。いくつかの実施態様では、処置は、1つ以上の症状が起こった後および/または疾患が診断された後に施してもよい。他の実施態様では、処置は、症状の非存在下で施されてもよく、例えば症状の発症を防止または遅延するまたは疾患の発症または進行を阻止する。例えば、処置は、症状の発症前に感受性の高い個体に施すことができる（例、症状の病歴および/または遺伝的または他の感受性因子に照らして）。処置は、症状がなくなった後にも、例えば再発を防止または遅延するために継続することもできる。

#### 【0056】

「ベクター」という用語は、例えば本明細書で提供されるgRNAおよび/またはCas9タンパク質をコードするものなどの、本発明の1つ以上の組換えポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを意味する。ベクターには、限定するものではないが、プラスミド、ウイルスベクター、コスミド、人工染色体、およびファージミドが含まれる。ベクターは、宿主細胞中で複製可能であり、ベクターが切断され得る1つ以上のエンドヌクレアーゼ制限部位で更に特徴付けられ、その中へ所望の核酸配列を挿入できるものである。ベクターは、ベクターで形質転換またはゲノム修飾した細胞の同定および/または選択の使用に好適である1つ以上のマーカー配列を含むことができる。マーカーの例としては、抗生物質（例、カナマイシン、アンピシリン）または他の化合物への抵抗性または感受性のどちらかを増加または減少させるタンパク質をコードする遺伝子、当分野で公知の通常の試験法により検出される活性をもつ酵素（例、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼまたはルシフェラーゼ）をコードする遺伝子、および形質転換または形質移入された細胞、宿主、コロニーまたはプラークの表現型に可視的に影響を与える遺伝子が挙げられる。本発明に含まれる宿主細胞（例、E. coli、CHO細胞などの哺乳動物細胞、昆虫細胞など）の形質転換に好適な任意のベクターの例としては、pUC系、pGEM系、pET系、pBAD系、pTET系、またはpGEX系に属するベクターが挙げられる。いくつかの実施態様では、ベクターは、組換えタンパク質産生用に宿主細胞を形質転換するのに好適である。gRNAおよび/またはタンパク質（例、本明細書で提供されるもの）を発現するベクターおよび宿主細胞を選択・操作し、細胞を形質転換し、組換えタンパク質を発現・精製する方法は、当分野で公知であり、例えば、Green and Sambrook,

10

20

30

40

50

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012) により提供される)。

【 0 0 5 7 】

本発明の実施態様の詳細な説明

部位特異的ヌクレアーゼは、in vitroおよびin vivoでの標的ゲノム修飾のための強力なツールである。いくつかの部位特異的ヌクレアーゼは、理論的には、他のゲノムの部位に影響を与えずに、ゲノム中の単一の特有な部位を切断の標的とすることを可能とするレベルの標的切断部位特異性を達成することが可能である。生細胞中でのヌクレアーゼ切断が、例えば相同組換えまたは非相同末端結合により切断・修復されたゲノム配列の修飾を頻繁にもたらすDNA修復機構を誘発することが報告されている。従って、ゲノム内のある特定の配列の標的切断は、多くのヒト体細胞または胚性幹細胞など、従来の標的遺伝子組換え法での操作が困難である細胞などの生細胞中での標的遺伝子組換えおよび遺伝子修飾のための新しい道を開くものである。例えばHIV/AIDS患者におけるCCR-5アレルの疾患関連配列または腫瘍血管新生に必要な遺伝子のヌクレアーゼ仲介修飾は臨床の環境においても使用可能であり、2つの部位特異的ヌクレアーゼが現在臨床試験中である(Perez, E.E. et al., "Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases." Nature Biotechnology. 26, 808-816 (2008); ClinicalTrials.gov identifiers: NCT00842634, NCT01044654, NCT01252641, NCT01082926)。部位特異的ヌクレアーゼを使用して処置可能な他の疾患としては、例えば、トリプレット病と関連する疾患(例、ハンチントン病、筋緊張性ジストロフィー、脊髄小脳失調症など)、嚢胞性線維症(CFTR遺伝子を標的とすることによる)、がん、自己免疫疾患、およびウイルス感染症が挙げられる。

10

20

【 0 0 5 8 】

部位特異的ヌクレアーゼ - が仲介する修飾に関する重要な問題のひとつは、例えば、所期の標的配列と1つ以上のヌクレオチドが異なるゲノム配列の切断などオフターゲットヌクレアーゼ効果である。オフターゲット切断の望ましくない副作用には、標的遺伝子組換え中の不所望の遺伝子座への挿入から、臨床場面での重度の合併症までに及ぶ。対象に投与されたエンドヌクレアーゼによる腫瘍抑制遺伝子または重要な遺伝子機能をコードする配列のオフターゲット切断は、対象の疾患または死に至ることもあり得る。従って、オフターゲット効果を最小とする可能性が最も高いヌクレアーゼを設計する新たな方策を用いることが望ましい。

30

【 0 0 5 9 】

本開示の方法および組成物は、いくつかの側面では、一時的な活性の調節および/またはRNA誘導型ヌクレアーゼの特異性の増加の手段を提供することによる既存の方法および組成物の改良である。例えば、当分野で公知の天然に存在するものおよび操作されているものの両方のRNA誘導型ヌクレアーゼは、通常、標的に相補するRNA(例、gRNA)と複合体を形成してDNAに結合・これを切断する。本発明の側面は、RNA誘導型ヌクレアーゼ: RNA複合体の標的への結合のタイミングを一時的に調節することが、複合体が標的に結合しこれを切断できる時間の長さを最小とするまたは調節することによりオフターゲット効果の可能性を小さくするという認識に関する。更に、例えば標的の非存在下で結合をブロックする伸長標的認識ドメインを有するgRNAを使用して切断すべき標的部位にだけ結合するようにgRNAを操作することは、RNA誘導型ヌクレアーゼの特異性を向上させ、オフターゲット効果の可能性を低減する。

40

【 0 0 6 0 】

本明細書で提供される方策、方法、組成物、キット、およびシステムは、任意のRNA誘導型ヌクレアーゼ(例、Cas9)の活性を調節および/または特異性を向上させるために使用可能である。本明細書で記載される修飾したgRNAに使用される好適なヌクレアーゼは、当業者には本開示に基づいて明らかであろう。

【 0 0 6 1 】

ある実施態様では、本明細書で提供される方策、方法、組成物、キット、およびシステ

50

ムは、RNA誘導型（例、RNAプログラム可能）ヌクレアーゼ活性のタイミングを調節するために利用される。典型的なRNA誘導型ヌクレアーゼはヌクレアーゼ：RNA複合体を形成した際に標的配列を認識・切断する一方、本明細書で提供される修飾したgRNAは標的結合および切断の調節を可能とする。他の側面は、RNA誘導型ヌクレアーゼの特異性を向上するように、所期の標的部位が存在するときのみ標的部位を結合するように操作されているgRNAを提供する。Cas9：gRNA複合体は、細胞（Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 339, 819-823 (2013); Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science. 339, 823-826 (2013); Jinek, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife 2, e00471 (2013)）および有機体（Hwang, W.Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nature Biotechnology. 31, 227-229 (2013)）の両方を修飾するために効果的に使用されているが、ゼブラフィッシュ胚を修飾するためにCas9：ガイドRNA複合体を使用する研究は、ZFNおよびTALEN（Hwang, W.Y. et al. Nature Biotechnology. 31, 227-229 (2013)）と同様の割合で毒性（例、オフターゲット効果）を観察した。従って、本開示の側面は、標的結合および切断のタイミングを調節および/またはRNA誘導型ヌクレアーゼの特異性を向上する新規のgRNAプラットフォームを使用して、Cas9オフターゲット効果の可能性を低減することを目的とする。

#### 【0062】

DNAおよびCas9などのDNA切断ヌクレアーゼに特に関連して、本明細書で提供される本発明の概念、方法、組成物、方策、キット、およびシステムはこの点に関して限定されるものではないが、標的核酸への結合を指令するRNAなどの核酸テンプレートを利用した任意の核酸：ヌクレアーゼシステムへ応用可能である。

#### 【0063】

修飾したガイドRNA（gRNA）

本開示のいくつかの側面は、「オン」および「オフ」状態の両方を有するように操作されているgRNAを提供する。そして、いくつかの側面では、これらのgRNAは、「スイッチ可能gRNA」と総称できる。例えば、スイッチ可能gRNAは、gRNAの標的核酸への結合を阻止する構造状態にあるとき「オフ」状態であると言われる。いくつかの側面では、「オフ」状態のgRNAは、それと同種のRNA誘導型ヌクレアーゼ（例、Cas9）に結合可能であるが、ヌクレアーゼ：gRNA複合体（gRNAが「オフ」状態にあるとき）は、標的核酸を結合して切断を仲介することはできない。他の側面では、「オフ」状態のgRNAは、標的配列またはCas9などのRNA誘導型ヌクレアーゼに結合できない。逆に、スイッチ可能gRNAは、gRNAが、（例、Cas9などのRNA誘導型ヌクレアーゼとの複合体として）gRNAの標的核酸への結合を可能とする構造状態であるとき「オン」状態であると言われる。本開示のいくつかの実施態様では、Cas9などのRNA誘導型ヌクレアーゼと関連する本発明のgRNAを含む複合体、およびそれらの使用方法が提供される。本開示のいくつかの実施態様は、そのようなgRNAおよび/またはRNA誘導型ヌクレアーゼ（例、Cas9）をコードする核酸を提供する。本開示のいくつかの実施態様は、そのようなコードする核酸を含む発現構築物を提供する。

#### 【0064】

アプタマーに基づいたgRNA

1つの実施態様では、アプタマーを含むgRNAが提供される。例えば、図1を参照。例えば、いくつかの実施態様では、gRNAは、本明細書で記載されるように、ヌクレオチドリンカーを介してアプタマーに連結している。アプタマーは、通常、例えば抗体抗原相互作用に競合する親和性で特異的リガンドを結合するRNAまたはペプチドに基づいた分子である。いくつかの実施態様では、アプタマーは、約1nM～10μM、約1nM～1μM、約1nM～500nM、または約1nM～100nMのK<sub>d</sub>でリガンドを結合する。RNAに基づいたアプタマー、例えば、mRNAのリボスイッチ中にあるものに関しては、リガンドのアプタマードメインへの結合により、mRNAの発現（例、翻訳）を調

10

20

30

40

50

節する立体構造的変化をもたらす。RNAアプタマーは、例えば遺伝子発現を調節するために他の分子にクローン化・適応されていたり、またはSELEXを使用して特定のリガンドに対して操作・選択されている（例えば、Dixon et al., "Reengineering orthogonally selective riboswitches." PNAS 2010; 107 (7): 2830-2835; Suess et al., "A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo." Nucleic Acids Res. 2004; 32(4): 1610-1614; Ellington and Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." Nature. 1990; 346:818-822; Tuerk and Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." Science. 1990; 249:505-510; Burke and Gold, "RNA aptamers to the adenosine moiety of S-adenosyl methionine: structural inferences from variations on a theme and the reproducibility of SELEX." Nucleic Acids Res. 1997; 25(10):2020-4; Ulrich et al., "DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications." Comb Chem High Throughput Screen. 2006; 9(8):619-32; Svobodova et al., "Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes. Anal Bioanal Chem. 2012; 404:835-842を参照、それらの全内容を参照により本明細書に取り込むものである）。アプタマーを結合するリガンドとしては、限定されるものではないが、小分子、代謝産物、炭水化物、タンパク質、ペプチド、または核酸が挙げられる。図1に示されるように、アプタマーに連結したgRNAは、アプタマーを結合する特異的リガンドの非存在下で「オフ」状態が存在する。通常、「オフ」状態は、標的核酸とハイブリダイズするgRNAの配列の全部または一部が標的核酸に自由にハイブリダイズするのを阻止する構造的特徴により仲介される。例えば、いくつかの側面では、アプタマーを含むgRNAは、アプタマー配列の一部が、標的とハイブリダイズするgRNAの配列の一部または全部とハイブリダイズするように設計されている。標的を結合するgRNAの配列（例、図1Cおよび図1Dに「標的切断ガイド」として示す、本明細書では「ガイド」配列と呼ぶ）は、任意の所望の核酸標的を標的とする配列を含むように、当分野で公知の方法を使用して操作可能であり、従って、図に示す配列は例示の目的であって限定するものではない。同様に、任意の好適なアプタマーは、gRNA配列に5'または3'側で連結することが可能であり、当分野の常法を使用してgRNA中の特定のガイド配列にハイブリダイズするであろうヌクレオチドを含むように修飾することが可能である。いくつかの実施態様では、本明細書で提供される任意のgRNAに連結するアプタマーは、本明細書に記載されるようなRNAアプタマーである。いくつかの実施態様では、RNAアプタマーは、リボスイッチに由来する（例えばそれからクローンされる）。任意のリボスイッチをRNAアプタマーに使用することができる。リボスイッチの例としては、限定されるものではないが、テオフィリンリボスイッチ、チアミンピロリン酸エステル（TPP）リボスイッチ、アデノシンコバラミン（AdoCbl）リボスイッチ、S-アデノシルメチオニン（SAM）リボスイッチ、SAHリボスイッチ、フラビンモノヌクレオチド（FMN）リボスイッチ、テトラヒドロ葉酸リボスイッチ、リジンリボスイッチ、グリシンリボスイッチ、プリンリボスイッチ、GlmSリボスイッチ、およびプレケオシン1（PreQ1）リボスイッチが挙げられる。いくつかの実施態様では、RNAアプタマーは、テオフィリンリボスイッチに由来する。いくつかの実施態様では、テオフィリンリボスイッチに由来するアプタマーは、配列番号3を含む。いくつかの実施態様では、配列番号3の太字の下線部分を、そこにある任意のヌクレオチドを他の任意のヌクレオチドで置換するように修飾可能であり、および/または1つ以上のヌクレオチドを付加または欠失することにより修飾可能である。例えば、太字の下線部分は、標的核酸とハイブリダイズするgRNAの配列の一部または全部とハイブリダイズする配列を含むように修飾可能である。例えば、図1Cを参照。いくつかの実施態様では、RNAアプタマーは、配列番号3と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である。

10

20

30

40

50



5' - GGUGAUACCA CAUCGUCUUGAUGCCCUUGGCAGCACCC  
- 3' (配列番号3)

【0065】

いくつかの実施態様では、アプタマーは天然に存在しない（例えば、自然界に見つからない）。例えば、いくつかの実施態様では、アプタマーは、操作されているか、またはS E L E Xを使用してライブラリーから選択される。いくつかの実施態様では、アプタマーは少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、少なくとも130、少なくとも140、少なくとも150、少なくとも175、少なくとも200、少なくとも250、または少なくとも300個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、アプタマーは20～200、20～150、20～100、または20～80個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、提供されるRNA（例、アプタマーに連結するgRNAを含むRNA）のgRNA部分は、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、少なくとも130、少なくとも140、少なくとも150、少なくとも175、または少なくとも200個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、gRNA部分は60～150、60～100、または60～80個のヌクレオチドを含む。

10

【0066】

mRNAをセンスするgRNA

20

他の実施態様によれば、ある条件下で（例、代謝産物、小分子、核酸などの存在下で）標的核酸を結合するgRNAが提供される。いくつかの実施態様では、gRNAは、他の分子がgRNAに結合（例、ハイブリダイズ）して、「オン」状態に対応する構造再構成をもたらさない限り、構造的に、標的と結合する（例、ハイブリダイズする）ことから阻止されている（例えば、「オフ」状態にある）。いくつかの実施態様では、特定の転写物（例、mRNA）のgRNAへの結合は、gRNAを「オフ」状態から「オン」状態へ移行させる。例えば、図2を参照。そのようなgRNAは、「mRNAをセンスする」gRNAと呼ばれる。例えば、いくつかの側面では、(i) 標的核酸の領域とハイブリダイズする領域（例、「ガイド」配列）と；(ii) 領域(i)の配列と部分的にまたは完全にハイブリダイズする他の領域（例、「ガイドブロック」配列）と；(iii) 転写物(mRNA)の領域とハイブリダイズする領域（例、「転写物センサー」）とを含むgRNAが提供される。いくつかの実施態様では、各領域（例、i～iii）は、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、または少なくとも25個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、gRNAは、ステム・ループ構造を形成する。いくつかの実施態様では、ステムが、領域(ii)の配列の一部または全部とハイブリダイズした領域(i)の配列を含み、ループが領域(iii)の配列の一部または全部からなる。いくつかの実施態様では、領域(ii)および領域(iii)の両方が、領域(i)に対して5'または3'側のいずれかにある。例えば、図2A対図2Cを参照。標的を結合するgRNAの配列（例、「ガイド」配列）は、当分野で公知の方法を使用して、任意の所望の核酸標的を標的とする任意の配列を含むよう操作することが可能であり、従って、例として図に示す配列に限定されるものではない。同様に、領域(iii)（例、転写物センサー）は、当分野の常法を使用して、目的のmRNAとハイブリダイズする任意の配列を含むよう操作することが可能である。同様に、領域(ii)は、当分野の常法を使用して、「ガイド」配列の一部または全部とハイブリダイズする配列を含むよう操作可能である。例えば、いくつかの側面では、mRNAは、細胞中で発現されるとき、標的核酸（例、遺伝子）のゲノム修飾が望まれるものである。このように、mRNAの非存在下で、細胞へ送達される（または、発現される）と、gRNAは「オフ」状態のままである。mRNAが存在する（例、発現される）と、それはgRNAの転写物センサーを結合して、「ガイド」配列の標的核酸へのハイブリダイゼーションを阻止していたステム・ループ構造のアンフォールディングをもたらし、それによってgRNAを「オン」とする。例えば

30

40

50

、図 2 B および 2 D を参照。提供された「オン」状態の g R N A は、R N A 誘導型ヌクレアーゼ（例、C a s 9 タンパク質）と会合して、標的核酸の結合をガイドすることができる。

#### 【 0 0 6 7 】

伸長 D N A をセンスする（ x D N A をセンスする） g R N A

他の実施態様によれば、g R N A が少なくとも 2 つの異なる領域で標的核酸とハイブリダイズしない限り「オフ」状態のままでいる修飾した g R N A が提供される。例えば、図 3 を参照。そのような g R N A は、特定の g R N A / 標的相互作用の認識配列を効果的に延長するので、R N A 誘導型ヌクレアーゼ（例、C a s 9）への特異性が改善されている。そのような g R N A は、「x D N A をセンスする」g R N A（「x」は、「伸長」D N A 認識の略語である）と呼ばれる。例えば、（i）標的核酸の領域とハイブリダイズする領域（例、「ガイド」配列）と；（i i）領域（i）の配列と部分的にまたは完全にハイブリダイズする他の領域（例、「ガイドブロック」）と；（i i i）標的核酸の他の領域とハイブリダイズする領域（例、「x D N A センサー」）とを含む g R N A が提供される。いくつかの実施態様では、x D N A センサーは、ガイド配列が標的に結合できる前に、まず標的核酸を結合しなくてはならない。いくつかの実施態様では、x D N A センサーは、ガイド配列を結合する標的の同一の鎖を結合する。いくつかの実施態様では、x D N A センサーおよびガイド配列は、標的核酸の異なる鎖を結合する。いくつかの実施態様では、領域（i）および領域（i i）の配列が、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、または少なくとも 25 個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、領域（i i i）の配列は、少なくとも 5、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 40、少なくとも 50、少なくとも 75、または少なくとも 100 個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、g R N A は、ステム・ループ構造を形成する。例えば、いくつかの実施態様では、ステムが領域（i i）の配列の一部または全部とハイブリダイズした領域（i）の配列を含み、ループが領域（i i i）の配列の一部または全部からなる。いくつかの実施態様では、領域（i）および領域（i i i）は、g R N A 中で隣接する配列を含む。いくつかの実施態様では、領域（i i）および領域（i i i）の両方が、領域（i）に対して 5' または 3' 側のいずれかにある。例えば、図 3 A 対図 3 C を参照。いくつかの実施態様では、領域（i i）は、領域（i）と領域（i i i）の間に配置されている。標的を結合する g R N A の配列（例、「ガイド」配列）は、当分野で公知の方法を使用して任意の所望の核酸標的を標的とする任意の配列を含むように操作可能であり、従って図に例として示す配列に限定するものではない。同様に、領域（i i i）（例、x D N A センサー）は、当分野の常法を使用して、標的核酸の他の領域（例、「ガイド」配列により標的とされる領域と異なる領域）とハイブリダイズする任意の配列を含むように操作可能である。同様に、領域（i i）は、当分野の常法を使用して、「ガイド」配列の一部または全部とハイブリダイズする配列を含むように操作してもよい。従って、適正な標的核酸（例、g R N A がハイブリダイズするよう設計された両方の領域を含む標的）の非存在下では、g R N A は、細胞へ送達される（またはそこで発現される）と、「オフ」状態のままである。特定の理論に束縛されるものではないが、g R N A が（例、C a s 9 と会合して）標的核酸と接触すると、x D N A センサーが標的とハイブリダイズし、それは次に「ガイド」配列をブロックするステム・ループ構造をほどこき、g R N A を「オン」にすると考えられる。それが適正な標的核酸であれば、ガイド配列は標的にハイブリダイズし、複合体は任意に標的核酸を切断するであろう。例えば、図 3 B および図 3 D を参照。

#### 【 0 0 6 8 】

複合体

いくつかの実施態様では、本明細書で記載される任意の R N A / g R N A（例、アプタマーに連結した g R N A、m R N A をセンスする g R N A、または x D N A センサーを含む g R N A を含む R N A）を含む複合体が提供される。いくつかの側面では、R N A 誘導型ヌクレアーゼと会合する、提供された R N A / g R N A を含む複合体が提供される。い

10

20

30

40

50

いくつかの実施態様では、RNA誘導型ヌクレアーゼは、例えば本明細書に記載されるCas9、Cas9の変異体、またはCas9の断片である。いくつかの実施態様では、RNA誘導型ヌクレアーゼは、全内容を参照により本明細書に取り込む、2013年9月6日に出願された米国特許仮出願第61/874,609号名称「Cas9変異体およびその使用」、および2014年9月6日に出願された米国特許仮出願第61/874,746号名称「機能性ヌクレアーゼの送達システム」に提供されるCas9タンパク質の任意の形態である。

#### 【0069】

いくつかの実施態様では、複合体は、例えば本明細書に記載されるRNA誘導型ヌクレアーゼと会合したRNAのアプタマーを結合するリガンドなどのリガンドを更に含む。いくつかの実施態様では、複合体（例、提供されたRNA（gRNA）：リガンド：Cas9タンパク質を含む）は、標的核酸に結合し、任意に切断する。いくつかの側面では、「センスする」gRNA（例、mRNAまたはxDNA）およびCas9を含む複合体は、標的核酸に結合し、任意に切断する。

#### 【0070】

##### 医薬組成物

いくつかの実施態様では、本明細書に記載される任意のgRNAが、医薬組成物の一部として提供される。いくつかの実施態様では、医薬組成物は、本発明のgRNAと複合体を形成するRNA誘導型ヌクレアーゼ（例、Cas9）を更に含む。例えば、いくつかの実施態様は、本明細書で提供されるgRNAおよびRNA誘導型ヌクレアーゼ、またはそのようなgRNAおよび/またはヌクレアーゼをコードする核酸と、医薬的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。医薬組成物は、更に治療的に活性のある物質を1つ以上任意に含むことができる。

#### 【0071】

いくつかの実施態様では、本明細書で提供される組成物は、対象において標的とするゲノム修飾を実施するために、対象、例えばヒト対象に投与される。いくつかの実施態様では、細胞を対象から入手し、RNA誘導型ヌクレアーゼと会合する提供されたgRNAまたはそれをコードする核酸を、生体外で接触させる。いくつかの実施態様では、対象から除去し、本発明のgRNA：ヌクレアーゼ複合体と生体外で接触させた細胞を、任意に所望のゲノム修飾が実施または細胞中で検出された後に、対象に再導入される。ヌクレアーゼを含む医薬組成物を送達する方法は公知であり、例えば、その全開示を参照により本明細書に組み込む米国特許第6,453,242号；第6,503,717号；第6,534,261号；第6,599,692号；第6,607,882号；第6,689,558号；第6,824,978号；第6,933,113号；第6,979,539号；第7,013,219号；および第7,163,824号に記載されている。本明細書で提供される医薬組成物の記載は、主にヒトへの投与に好適な医薬組成物に対してのものであるが、そのような組成物が一般にすべての種類の動物または有機体への投与に好適であることは当業者には理解されるであろう。ヒトへの投与に好適な医薬組成物を、種々の動物への投与に好適な組成物とするための修飾は、良く理解されており、通常の熟練獣医学者は、もし必要なら単に通常の実験によりそのような修飾を設計および/または実施可能である。医薬組成物の投与が意図される対象としては、限定されるものではないが、ヒトおよび/または他の霊長類；哺乳動物、家畜、ペット、およびウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウスおよび/またはラットなどの商業的に重要な哺乳動物；および/または、チキン、ダック、グースおよび/またはターキーなどの商業的に重要な鳥類などの鳥類が挙げられる。

#### 【0072】

本明細書に記載の医薬組成物の製剤は、薬理学の分野で公知のまたは今後開発される任意の方法により調製できる。一般に、そのような調製方法には、活性成分を賦形剤および/または1つ以上の他の副成分と会合させ、その後必要および/または所望なら、生成物を所望の単一用量または複数用量ユニットに成形および/または包装する工程が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 3 】

医薬製剤は、本明細書で使用されるように、所望の特定の剤形に適する任意のおよびすべての溶媒、分散媒体、希釈剤、または他の液体媒体、分散または懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘または乳化剤、保存剤、固形結合剤、潤滑剤などの医薬的に許容される賦形剤を更に含むことができる。Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006、その全開示を参照により本明細書に組み込む)には、医薬組成物の処方に使用される種々の賦形剤およびその調製のための公知の技術が記載されている。また、全開示を参照により本明細書に組み込む、国際特許第 P C T / U S 2 0 1 0 / 0 5 5 1 3 1 号 (公開番号第 W O 2 0 1 1 0 5 3 9 8 2 A 8 号、2 0 1 0 年 1 1 月 2 日出願)を、ヌクレアーゼを含む医薬組成物の製造のための他の好適な方法、試薬、賦形剤および溶媒に関して参照できる。望ましくない生物学的効果をもたらしたり、あるいは医薬組成物の他の成分と有害な仕方で相互作用して、従来の任意の賦形媒体が物質またはその誘導体と適合しない場合を除いて、その使用は、本開示の範囲内であるとみなされる。

10

## 【 0 0 7 4 】

いくつかの実施態様では、本発明による組成物は、任意の様々な疾患、障害および/または病状の処置に使用することができ、その例としては、限定するものではないが、以下の1つ以上が挙げられる：自己免疫疾患（例、糖尿病、ループス、多発性硬化症、乾癬、関節リウマチ）；炎症性疾患（例、関節炎、骨盤内炎症性疾患）；感染症（例、ウイルス感染症（例、H I V、H C V、R S V）、細菌感染症、真菌感染症、敗血症）；神経疾患（例、アルツハイマー病、ハンチントン病；自閉症；デュシェンヌ型筋ジストロフィー）；心血管障害（例、粥状動脈硬化、高コレステロール血症、血栓症、凝固障害、黄斑変性症などの血管新生障害）；増殖性障害（例、がん、良性腫瘍）；呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患）；消化障害（例、炎症性腸疾患、潰瘍）；筋骨格系疾患（例、線維筋痛症、関節炎）；内分泌、代謝、および栄養障害（例、糖尿病、骨粗鬆症）；泌尿器障害（例、腎疾患）；心理的疾患（例、うつ病、統合失調症）；皮膚障害（例、創傷、湿疹）；血液およびリンパ管疾患（例、貧血症、血友病）；など。

20

## 【 0 0 7 5 】

## 部位特異的核酸切断方法

本開示の他の実施態様では、部位特異的核酸（例、D N A）切断方法が提供される。いくつかの実施態様では、この方法は、D N Aを本明細書に記載の任意の C a s 9：R N A複合体に接触させることを含む。例えば、いくつかの実施態様では、この方法は、（ i ）D N Aの部分に結合する配列を含み、本明細書に記載されるアプタマーに連結した g R N Aと；（ i i ）g R N Aのアプタマーに結合したリガンドと；（ i i i ）R N A誘導型ヌクレアーゼ（例、C a s 9タンパク質）とを含む複合体に、C a s 9ヌクレアーゼがD N Aを切断するのに好適な条件下でD N Aを接触させることを含む。

30

## 【 0 0 7 6 】

いくつかの実施態様では、細胞中での部位特異的D N A切断を誘発する方法が提供される。いくつかの実施態様では、この方法は、（ a ）D N A標的配列に結合可能な配列を含み、本明細書に記載されるアプタマーを含む g R N Aを、細胞に接触させることまたは細胞中で発現させること；（ b ）R N A誘導型ヌクレアーゼ（例、C a s 9タンパク質）を細胞に接触させることまたは細胞中で発現させること；および（ c ）g R N Aのアプタマーを結合する特異的リガンドを細胞に接触させて、D N A標的を切断する g R N A：リガンド：C a s 9複合体を形成することを含む。いくつかの実施態様では、この方法は、（ a ）D N A標的配列に結合可能な配列を含み、本明細書に記載されるアプタマーを含む g R N AおよびC a s 9タンパク質を含む複合体を細胞に接触させること；および（ b ）g R N Aのアプタマーを結合する特異的リガンドを細胞に接触させて、D N A標的を切断する g R N A：リガンド：C a s 9複合体を形成することを含む。いくつかの実施態様では、工程（ a ）および工程（ b ）は同時に実施される。いくつかの実施態様では、工程（ a ）および工程（ b ）は順次実施される。従って、細胞に複合体を接触した後にリガンドを

40

50

接触させるいくつかの実施態様では、切断はリガンドが細胞へ送達された後にだけ起こるので、切断の調節が達成される。これらの方法のいくつかの実施態様では、リガンドは細胞へ送達されないが、例えば生理学的または病態生理学的プロセスの一部として、細胞により内部で産生される。

#### 【0077】

いくつかの実施態様では、本明細書に記載される mRNA をセンスする gRNA を利用する部位特異的 DNA 切断方法が提供される。例えば、いくつかの実施態様では、この方法は RNA 誘導型ヌクレアーゼ（例、Cas9 タンパク質）と、（i）標的核酸の領域とハイブリダイズする領域；（ii）領域（i）の配列と部分的にまたは完全にハイブリダイズする他の領域；および（iii）転写物（mRNA）の領域とハイブリダイズする領域を含む mRNA をセンスする gRNA とを含む複合体を DNA に接触させることを含む。いくつかの実施態様では、領域（iii）における配列が mRNA とハイブリダイズした後に、切断が起こる。

10

#### 【0078】

他の実施態様では、本明細書に記載される xDNA をセンスする gRNA を利用する部位特異的 DNA 切断方法が提供される。例えば、いくつかの実施態様では、この方法は RNA 誘導型ヌクレアーゼ（例、Cas9 タンパク質）と、（i）標的核酸の領域とハイブリダイズする領域；（ii）領域（i）の配列と部分的にまたは完全にハイブリダイズする他の領域；および（iii）標的核酸の他の領域とハイブリダイズする領域を含む xDNA をセンスする gRNA とを含む複合体を DNA に接触させることを含む。いくつかの実施態様では、領域（iii）における配列が「ガイド」配列が標的としない標的核酸の領域とハイブリダイズした後に、切断が起こる。

20

#### 【0079】

いくつかの実施態様では、本明細書で提供される任意の方法が、細胞中の DNA に対して実施可能である。例えば、いくつかの実施態様では、本明細書で提供される任意の RNA / gRNA 含有複合体が接触した DNA は、真核細胞中にある。いくつかの実施態様では、真核細胞は、個体中にある。いくつかの実施態様では、個体はヒトである。いくつかの実施態様では、本明細書で提供される任意の方法は、in vitro で実施される。いくつかの実施態様では、本明細書で提供される任意の方法は、in vivo で実施される。

#### 【0080】

ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、キット

30

本開示の他の実施態様では、本明細書に記載のいずれかの gRNA（および任意にいずれかの Cas9 タンパク質）をコードするポリヌクレオチドが提供される。例えば、本明細書に記載のいずれかの gRNA および / または Cas9 タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本発明の gRNA、またはそれを含む複合体、例えば本発明の gRNA および RNA 誘導型ヌクレアーゼ（例、Cas9 タンパク質）を含む複合体などの組換え発現および精製のために提供される。いくつかの実施態様では、提供されるポリヌクレオチドは、gRNA をコードする 1 つ以上の配列を、単独で、または本明細書に記載のいずれかの Cas9 タンパク質をコードする配列との組み合わせで含む。

#### 【0081】

いくつかの実施態様では、本明細書に記載のいずれかの gRNA（および随意、任意の Cas9 タンパク質）をコードするベクターは、例えば本発明の gRNA、または本発明の gRNA および RNA 誘導型ヌクレアーゼ（例、Cas9 タンパク質）を含む複合体の組換え発現および精製のために提供される。いくつかの実施態様では、ベクターは、例えば本明細書に記載のものなどのポリヌクレオチドを含むか、あるいは含むように操作されている。いくつかの実施態様では、ベクターは gRNA および / または任意の Cas9 タンパク質（例、本明細書に記載されるもの）をコードする 1 つ以上の配列を含む。通常、ベクターは、gRNA が宿主細胞で発現されるようにプロモーターに作動可能に連結した本発明の gRNA をコードする配列を含む。

40

#### 【0082】

50

いくつかの実施態様では、本明細書に記載の任意の gRNA（および随意に任意の Cas9 タンパク質）の組換え発現および精製用の細胞が提供される。細胞としては、組換え RNA 発現および任意にタンパク質発現に好適な任意の細胞、例えば本発明の gRNA を発現しているまたは発現可能な遺伝子構築物を含む細胞（例、本明細書に記載の 1 つ以上のベクターで形質転換した細胞、または細胞のゲノムに組み入れられたアレルから本発明の gRNA および随意に本明細書で提供される任意の Cas9 タンパク質を発現するゲノム修飾を有する細胞）が挙げられる。細胞を形質転換する、細胞を遺伝子組み換えする、およびそのような細胞中で遺伝子およびタンパク質を発現する方法は、当分野で公知であり、例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012)) および Friedman and Rossi, Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA, A Laboratory Manual (1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2006)) により提供されるものが挙げられる。

#### 【0083】

本開示のいくつかの側面は、本明細書で提供されるいずれかの本発明の gRNA または複合体および随意に本明細書に記載の任意の Cas9 タンパク質を含むキットを提供する。いくつかの実施態様では、キットは、提供される gRNA、および随意に任意の Cas9 タンパク質をコードするいずれかのポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、キットは、任意の本発明の gRNA および随意に任意の Cas9 タンパク質の組換え発現用ベクターを含む。いくつかの実施態様では、キットは、いずれかの本発明の gRNA、複合体、および随意に本明細書で提供される任意の Cas9 タンパク質を発現する遺伝子構築物を含む細胞を含む。いくつかの実施態様では、キットは、賦形剤と、例えば本発明の gRNA および Cas9 などの RNA 誘導型ヌクレアーゼの複合体などを核酸に接触させるのに好適な組成物を生成するために、賦形剤を任意の本発明の組成物に接触させるための説明書とを含む。いくつかの実施態様では、組成物は、ゲノム内の核酸に接触させるのに好適である。いくつかの実施態様では、組成物は、本発明の組成物（例、gRNA、gRNA と Cas9 との複合体）を細胞へ送達するのに好適である。いくつかの実施態様では、組成物は、本発明の組成物（例、gRNA、gRNA と Cas9 との複合体）を対象へ送達するのに好適である。いくつかの実施態様では、賦形剤は、医薬的に許容される賦形剤である。

#### 【0084】

##### 等価物および範囲

当業者は、本明細書に記載の本発明の具体的な実施態様の多くの等価物を認識可能であるか、または単に通常の実験により確認可能であろう。本発明の範囲は、上記の記述に限定されることを意図するものではなく、添付の請求の範囲に記載されるものである。

#### 【0085】

請求の範囲において、「a」、「an」、および「the」などの冠詞は、特に他の記載がない限りまたは文脈から明らかでない限り、1 つ以上を意味するものである。グループの 1 つ以上のメンバーの間で「または」を含む請求の範囲または説明の記載は、特に他の記載がない限りまたは文脈から明らかでない限り、グループのメンバーの 1 つ、2 つ以上、またはすべてが、所与の産物またはプロセスに存在する、用いられる、または他の方法で関与する場合に満足するとみなされる。本発明は、グループの 1 つのメンバーだけが、所与の産物またはプロセスに存在する、用いられる、または他の方法で関与する実施態様を含むものである。また、本発明は、2 つ以上またはすべてが、所与の産物またはプロセスに存在する、用いられる、または他の方法で関与する実施態様も含むものである。

#### 【0086】

更に、本発明は、1 つ以上の請求項または記載の関連部分からの 1 つ以上の限定、要素、節、記述用語などが他の請求項に組み入れられたすべての変形、組み合わせ、および置換を含むと理解すべきである。例えば、他の請求項に従属した任意の請求項は、同じ元の請求項に従属する任意の他の請求項にある 1 つ以上の限定を含むよう変更可能である。更

10

20

30

40

50

に、請求項が組成物に言及する場合、特に他の記載がない限りまたは矛盾や不一致が起こることが当業者に明らかではない限り、本明細書に記載の任意の目的のための組成物の使用方法が含まれ、本明細書に記載の任意の作成方法または当分野で公知の他の方法による組成物の作成方法が含まれると理解すべきである。

【0087】

例えばマーカッシュ・クレーム形式などの要素がリストとして提示される場合、要素の各サブグループも開示されるものであり、グループから任意の要素を除去可能であると理解すべきである。また、「含む」という用語は、オープンであり、追加の要素または工程を含むことが可能であることを意図することに留意すべきである。一般に、本発明、すなわち本発明の側面は、特定の要素、特徴、工程などを含むとして言及される場合、本発明のある実施態様または本発明の側面は、それらの要素、特徴、工程などからなる、または本質的にそれらからなると理解すべきである。簡潔とするため、これらの実施態様は、本明細書では、これらの言葉で具体的に記載されていない。従って、1つ以上の要素、特徴、工程などを含む本発明の各実施態様に対しては、本発明は、それらの要素、特徴、工程などからなる、または本質的にそれらからなる実施態様も提供する。

10

【0088】

範囲が与えられる場合は、端点も含まれるものである。更に、特に他の記載がない限りまたは文脈および/または当業者の理解から明らかでない限り、範囲で表す値は、本発明の異なる実施態様では表記された範囲中で、文脈から明らかに他を示していない限り、範囲の最小値の単位の10分の1までの任意の特異的な値を想定できることを理解すべきである。特に他の記載がない限りまたは文脈および/または当業者の理解から明らかでない限り、範囲で表す値は、所与の範囲内で任意の部分的な範囲を想定できることも理解すべきであり、ここで部分的な範囲の端点は、範囲の最小値の単位の10分の1と同じ程度の正確さで記載される。

20

【0089】

更に、本発明の任意の特定の実施態様は、任意の1つ以上の請求項から明示的に除外できることを理解すべきである。範囲が与えられる場合、範囲内の任意の値は、任意の1つ以上の請求項から明示的に除外できる。本発明の組成物および/または方法の任意の実施態様、要素、特徴、応用、または側面は、任意の1つ以上の請求項から除去可能である。簡潔とするため、1つ以上の要素、特徴、目的または側面が除去される実施態様のすべてを本明細書で明示的に記載しているわけではない。

30

【0090】

本明細書に記載のすべての刊行物、特許および配列データベース登録項目は、上記に挙げたものも含めて、それぞれの刊行物または特許が、参照により取り込むと具体的におよび個別に表示したかのように、参照により本明細書に取り込むものである。矛盾する場合は、本明細書の定義も含めて、本出願が支配するであろう。

40

50

【図面】

【図 1 A】

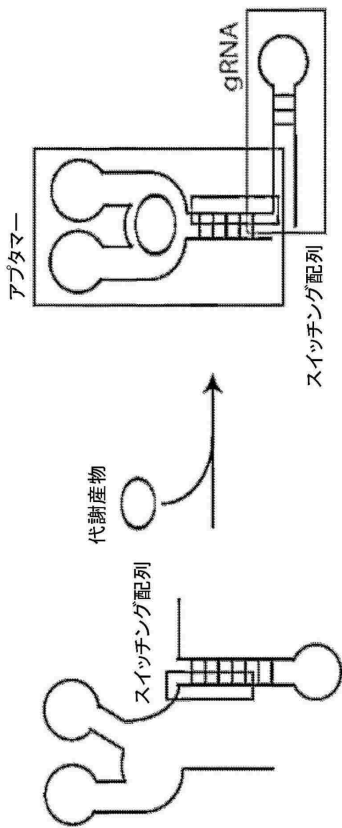


図 1A

【図 1 B】

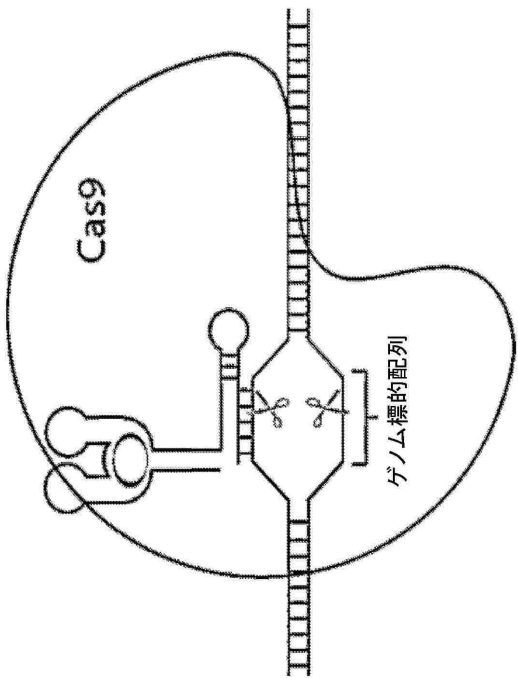


図 1B

【図 1 C】

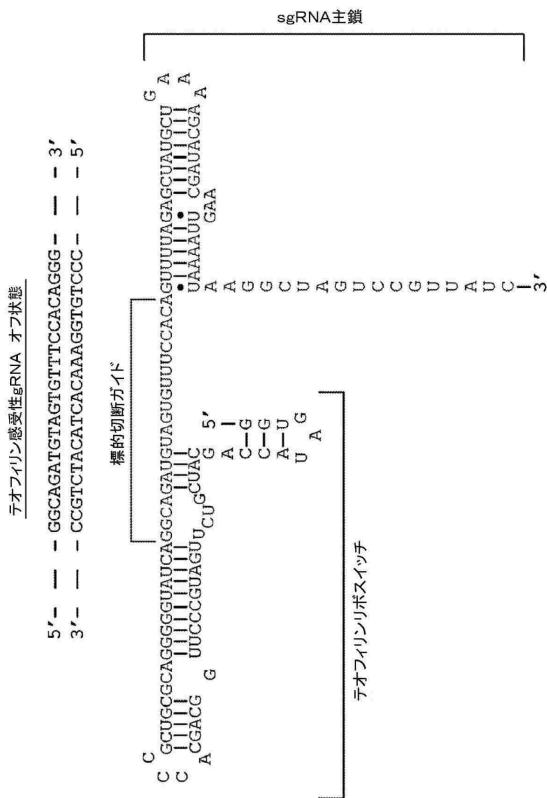


図 1C

【図 1 D】

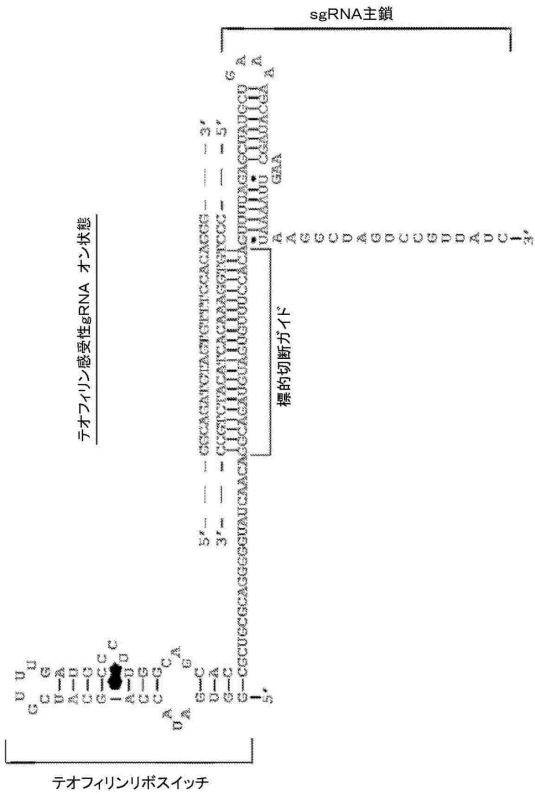


図 1D

10

20

30

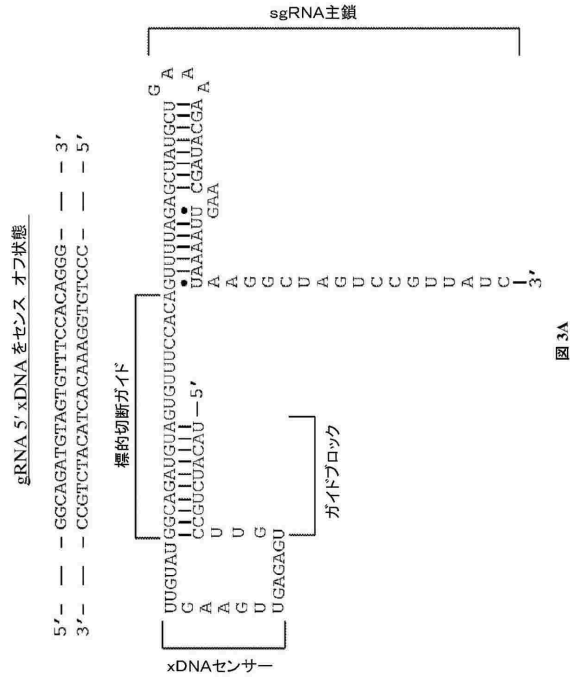
40

50





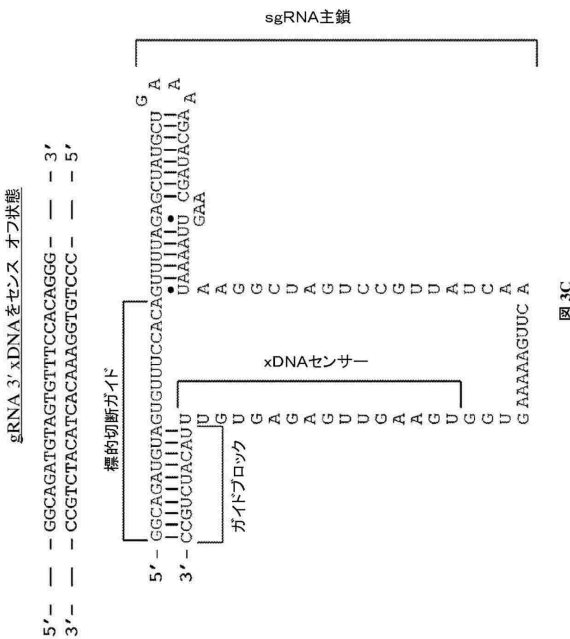
【図 3 A】



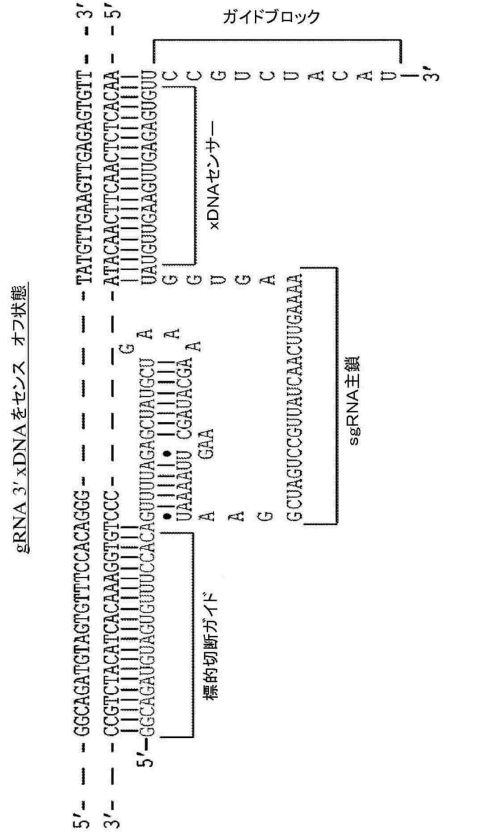
【図 3 B】



【図 3 C】



【図 3 D】



10

20

30

40

50

【配列表】  
0007685246000001.xml

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/81 (2006.01)

C 1 2 N 15/81

Z

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

米国(US)

(31)優先権主張番号 14/326,340

(32)優先日 平成26年7月8日(2014.7.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 14/326,361

(32)優先日 平成26年7月8日(2014.7.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

ストリート 60、カボット メール センター 553

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 特許第7170328(JP, B2)

特許第7075183(JP, B2)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 0 0 - 9 0

C 1 2 N 5 / 0 0 - 2 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )