

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和3年2月25日(2021.2.25)

【公表番号】特表2020-513784(P2020-513784A)

【公表日】令和2年5月21日(2020.5.21)

【年通号数】公開・登録公報2020-020

【出願番号】特願2019-539270(P2019-539270)

【国際特許分類】

C 12 N	15/11	(2006.01)
C 12 N	15/09	(2006.01)
C 12 N	15/63	(2006.01)
C 12 N	5/10	(2006.01)
C 12 N	15/53	(2006.01)
C 12 N	15/113	(2010.01)
A 61 K	38/46	(2006.01)
A 61 K	38/44	(2006.01)
A 61 K	48/00	(2006.01)
A 61 K	35/76	(2015.01)
A 61 P	1/16	(2006.01)

【F I】

C 12 N	15/11	Z N A Z
C 12 N	15/09	1 1 0
C 12 N	15/63	Z
C 12 N	5/10	
C 12 N	15/53	
C 12 N	15/113	1 3 0 Z
A 61 K	38/46	
A 61 K	38/44	
A 61 K	48/00	
A 61 K	35/76	
A 61 P	1/16	

【手続補正書】

【提出日】令和3年1月13日(2021.1.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞内のHSD17B13遺伝子の発現を改変または変更するための組合せ物であって

（a）Cas9タンパク質または前記Cas9タンパク質をコードする核酸；および

（b）第1のガイドRNAまたは前記第1のガイドRNAをコードするDNAであって、前記第1のガイドRNAが、第1のCRISPR RNA(crrRNA)部分および第1のトランスクリプション活性化CRISPR RNA(tracrRNA)部分を含み、前記第1のガイドRNAが、前記Cas9タンパク質と複合体を形成し、前記HSD17B13遺伝子内の第1のガイドRNA標的配列を標的とし、前記第1のガイドRNA標的配列が、前

記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンを含むかまたはそれに近接する、第 1 のガイド R N A または前記第 1 のガイド R N A をコードする D N A を含み、前記 C a s 9 タンパク質が、前記第 1 のガイド R N A 標的配列を切断し、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子において標的化遺伝子改変を生成するか、または前記 C a s 9 タンパク質が、前記第 1 のガイド R N A 標的配列に結合し、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の発現を変更し；

前記組合せ物が、前記細胞に導入される、
組合せ物。

【請求項 2】

(a) 前記 C a s 9 タンパク質がヌクレアーゼ活性 C a s 9 タンパク質であり、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子が、組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位に対応するヌクレオチドと 1 2 6 6 6 位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを有さない；

(b) 前記 C a s 9 タンパク質が、転写リブレッサードメインと融合したヌクレアーゼ不活性 C a s 9 タンパク質であり、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子が、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位に対応するヌクレオチドと 1 2 6 6 6 位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを有さない；または

(c) 前記 C a s 9 タンパク質が、転写活性化ドメインと融合したヌクレアーゼ不活性 C a s 9 タンパク質であり、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子が、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位に対応するヌクレオチドと 1 2 6 6 6 位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む、請求項 1 に記載の組合せ物。

【請求項 3】

(a) 前記第 1 のガイド R N A 標的配列が、配列番号 2 0 ~ 8 1 および 2 5 9 ~ 2 6 3 のいずれか 1 つを含み、かつ／または

(b) 前記第 1 のガイド R N A が、配列番号 1 4 2 3 ~ 1 4 8 4 および 1 6 4 3 ~ 1 6 4 7 のいずれか 1 つを含む D N A 標的化セグメントを含み、かつ／または

(c) 前記第 1 のガイド R N A が、配列番号 5 0 0 ~ 5 6 1 、 7 3 0 ~ 7 9 1 、 9 6 0 ~ 1 0 2 1 、 1 1 9 0 ~ 1 2 5 1 、 7 2 0 ~ 7 2 4 、 9 5 0 ~ 9 5 4 、 1 1 8 0 ~ 1 1 8 4 、 および 1 4 1 0 ~ 1 4 1 4 のいずれか 1 つを含む、

請求項 1 または 2 に記載の組合せ物。

【請求項 4】

前記第 1 のガイド R N A 標的配列が、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 1 または 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 または 2 のエクソン 1 に対応する領域内にある、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 5】

前記第 1 のガイド R N A 標的配列が、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の前記開始コドンの約 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 1 0 0 、 2 0 0 、 3 0 0 、 4 0 0 、 5 0 0 または 1 , 0 0 0 ヌクレオチド内にあるか、または前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の前記開始コドンを含む、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 6】

第 2 のガイド R N A または前記第 2 のガイド R N A をコードする D N A をさらに含み、前記第 2 のガイド R N A が、第 2 の C R I S P R R N A (c r R N A) 部分および第 2 のトランスクレアーゼ活性化 C R I S P R R N A (t r a c r R N A) 部分を含み、

前記第 2 のガイド R N A が、前記 C a s 9 タンパク質と複合体を形成し、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の第 2 のガイド R N A 標的配列を標的とし、かつ

前記第 2 のガイド R N A 標的配列が、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンを含むかまたはそれに近接する、

請求項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 7】

前記第2のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の前記開始コドンの約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500または1,000ヌクレオチド内にあるか、または前記HSD17B13遺伝子の前記開始コドンを含む、請求項6に記載の組合せ物。

【請求項 8】

前記HSD17B13遺伝子の前記開始コドンの破壊をもたらす、請求項1から7までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 9】

第2のガイドRNAまたは前記第2のガイドRNAをコードするDNAをさらに含み、前記第2のガイドRNAが、第2のCRISPR RNA(crrNA)部分および第2のトランスクレオチド内にあるか、または前記HSD17B13遺伝子の前記開始コドンを含む、請求項8に記載の組合せ物。

前記第2のガイドRNAが、前記Cas9タンパク質と複合体を形成し、前記HSD17B13遺伝子内の第2のガイドRNA標的配列を標的とし、前記第2のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の終止コドンを含むかまたはそれに近接する、かつ

前記細胞が、前記第1のガイドRNA標的配列と前記第2のガイドRNA標的配列との間にHSD17B13コード領域の欠失を含むように改変される、請求項1から5までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 10】

(a) 前記第2のガイドRNA標的配列が、配列番号88～225のいずれか1つを含み、かつ/または

(b) 前記第2のガイドRNAが、配列番号1485～1628のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、かつ/または

(c) 前記第2のガイドRNAが、配列番号562～705、792～935、1022～1165および1252～1395のいずれか1つを含む、請求項9に記載の組合せ物。

【請求項 11】

前記第2のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号1または2と最適にアラインメントした場合、配列番号1または2のエクソン7に対応する領域内にある、請求項9または10に記載の組合せ物。

【請求項 12】

前記第2のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の前記終止コドンの約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500または1,000ヌクレオチド内にあるか、または前記HSD17B13遺伝子の前記終止コドンを含む、請求項9から11までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 13】

前記HSD17B13遺伝子の前記コード配列が欠失される、請求項9から12までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 14】

前記標的化遺伝子改変が、非相同末端結合によって切断された第1のガイドRNA標的配列の修復によって生成される、請求項1から13までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 15】

前記HSD17B13遺伝子の機能喪失をもたらす、請求項1から14までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 16】

前記組合せ物が、発現ベクターと組み合わせて前記細胞に導入されることを特徴とし、前記発現ベクターが、前記HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えHSD17B13遺伝子を含む、請

求項1から15までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項17】

前記組換えHSD17B13遺伝子がヒト遺伝子である、請求項16に記載の組合せ物。
。

【請求項18】

前記組換えHSD17B13遺伝子が、前記遺伝子の1つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型HSD17B13遺伝子に対して欠失しているHSD17B13ミニ遺伝子であり、前記欠失したセグメントが、1つまたは複数のイントロン配列を含み、前記HSD17B13ミニ遺伝子が、配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のイントロン6に対応するイントロンを含む、請求項16または17に記載の組合せ物。

【請求項19】

前記組合せ物が、発現ベクターと組み合わせて前記細胞に導入されることを特徴とし、前記発現ベクターが、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードする核酸を含み、必要に応じて、前記HSD17B13タンパク質をコードする前記核酸が、配列番号7と最適にアラインメントした場合、配列番号7(HSD17B13転写産物D)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である、請求項1から15までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項20】

前記組合せ物が、HSD17B13タンパク質またはその断片と組み合わせて前記細胞に導入されることを特徴とし、前記HSD17B13タンパク質またはその断片が、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である、請求項1から15までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項21】

前記組合せ物が、外因性ドナー配列と組み合わせて前記細胞に導入されることを特徴とし、前記外因性ドナー配列を、前記HSD17B13遺伝子内の標的ゲノム遺伝子座と組換えて、標的化遺伝子改変を生じさせる、請求項1から15までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項22】

前記外因性ドナー配列による前記HSD17B13遺伝子の修復が、非相同末端結合媒介性挿入を介して生じる、請求項21に記載の組合せ物。

【請求項23】

前記外因性ドナー配列による前記HSD17B13遺伝子の修復が、相同組換え修復を介して生じる、請求項21に記載の組合せ物。

【請求項24】

前記外因性ドナー配列が、配列番号2の12666位に対応する位置の5'側の標的配列とハイブリダイズする5'相同アーム、および配列番号2の12666位に対応する位置の3'側の標的配列とハイブリダイズする3'相同アームを含み、前記外因性ドナー配列が、前記HSD17B13遺伝子と組換えられる、請求項23に記載の組合せ物。

【請求項25】

前記外因性ドナー配列が、5'相同アームと3'相同アームに挟まれた核酸挿入物をさらに含む、請求項24に記載の組合せ物。

【請求項26】

前記核酸挿入物がチミンを含み、前記外因性ドナー配列がHSD17B13遺伝子と組換えられると、前記HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレ

オチドとの間に前記チミンが挿入される、請求項 25 に記載の組合せ物。

【請求項 27】

前記外因性ドナー配列が、約 50 ヌクレオチド～約 1 kb の長さである、請求項 21 から 26 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 28】

前記外因性ドナー配列が、約 80 ヌクレオチド～約 200 ヌクレオチドの長さである、請求項 27 に記載の組合せ物。

【請求項 29】

前記外因性ドナー配列が、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドである、21 から 28 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 30】

前記第 1 のガイド RNA が、前記第 1 の c r RNA 部分が前記第 1 の t r a c r RNA 部分に連結している単一分子ガイド RNA である、請求項 1 から 28 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 31】

前記第 1 のガイド RNA が、配列番号 1420、256、257 または 258 に記載の配列を含む、請求項 30 に記載の組合せ物。

【請求項 32】

前記第 1 の c r RNA 部分および前記第 1 の t r a c r RNA 部分が、別々の RNA 分子である、請求項 1 から 28 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 33】

前記第 1 の c r RNA 部分が、配列番号 1421 に記載の配列を含み、かつ / または前記第 1 の t r a c r RNA 部分が、配列番号 1422 に記載の配列を含む、請求項 32 に記載の組合せ物。

【請求項 34】

前記第 1 のガイド RNA が、改変または制御された安定性をもたらす改変を含む、請求項 1 から 33 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 35】

前記 Cas9 タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記 Cas9 タンパク質をコードする前記核酸が DNA を含む、請求項 1 から 34 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 36】

前記 Cas9 タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記 Cas9 タンパク質をコードする前記核酸が RNA を含む、請求項 1 から 34 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 37】

RNA の形態で前記第 1 のガイド RNA を含む、請求項 1 から 36 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 38】

前記第 1 のガイド RNA をコードする DNA を含む、請求項 1 から 36 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 39】

脂質ナノ粒子中にある、請求項 1 から 38 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 40】

アデノ随伴ウイルスベクター中にある、請求項 1 から 39 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 41】

前記細胞が、マウス細胞、ラット細胞またはヒト細胞である、請求項 1 から 40 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 42】

前記細胞が、ヒト肝臓細胞、マウス肝臓細胞、ラット肝臓細胞、マウス多能性細胞またはラット多能性細胞である、請求項41に記載の組合せ物。

【請求項43】

前記細胞がヒト肝臓細胞である、請求項42に記載の組合せ物。

【請求項44】

前記細胞がヒト細胞であり、

(a) 前記第1のガイドRNA標的配列が、配列番号20～81のいずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記第1のガイドRNAが、配列番号1423～1484のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、かつ／または

(c) 前記第1のガイドRNAが、配列番号500～561、730～791、960～1021および1190～1251のいずれか1つを含み、必要に応じて、

(a) 前記第1のガイドRNA標的配列が、配列番号20～41のいずれか1つ、配列番号21～23、33および35のいずれか1つ、または配列番号33および35のいずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記第1のガイドRNAが、配列番号1447～1468のいずれか1つ、配列番号1448～1450、1460および1462のいずれか1つ、または配列番号1460および1462のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、かつ／または

(c) 前記第1のガイドRNAが、配列番号524～545、754～775、984～1005および1214～1235のいずれか1つ、配列番号295～297、525～527、755～757、985～987、1215～1217、307、309、537、539、767、769、997、999～1005および1214～1235のいずれか1つ、または配列番号307、309、537、539、767、769、997、999～1227および1229のいずれか1つを含む、

請求項1から43までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項45】

前記細胞がマウス細胞であり、

(a) 前記第1のガイドRNA標的配列が、配列番号259～263のいずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記第1のガイドRNAが、配列番号1643～1647のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、かつ／または

(c) 前記第1のガイドRNAが、配列番号720～724、950～954、1180～1184および1410～1414のいずれか1つを含む、

請求項1から42までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項46】

前記細胞がex vivoまたはin vivoである、請求項1から45までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項47】

前記細胞がin vivoである、請求項46に記載の組合せ物。

【請求項48】

前記細胞が肝臓細胞であり、前記組合せ物がin vivoで肝臓に導入される、請求項47に記載の組合せ物。

【請求項49】

前記細胞が、慢性肝疾患有するか、またはそのリスクがある対象における肝臓細胞であり、必要に応じて、前記慢性肝疾患が、非アルコール性肝疾患、アルコール性脂肪性肝疾患、肝硬変、または肝細胞癌であり、必要に応じて、前記対象が、脂肪性肝炎、線維症、肝硬変および／または肝細胞癌を有するか、またはそのリスクがある、請求項1から48までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【手続補正2】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0066****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0066】**

上記の方法のいずれかでは、対象は、ヒトであり得る。上記の方法のいずれかでは、慢性肝疾患は、非アルコール性脂肪性肝疾患（N A F L D）、アルコール性脂肪性肝疾患、肝硬変、または肝細胞癌であり得る。同様に、上記の方法のいずれかでは、治療または予防方法は、アルコール性肝疾患または非アルコール性肝疾患である肝疾患に対するものであり得る。上記の方法のいずれかでは、対象に導入するステップは、流体力学的送達、ウイルス媒介性送達、脂質ナノ粒子媒介性送達、または静脈内注入を含み得る。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に結合させるかまたはH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を切断するよう
にC a s 酵素を方向付けるのに有効なガイドR N A であって、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝
子内のガイドR N A 標的配列を標的とするD N A 標的化セグメントを含む、ガイドR N A
。

(項目2)

前記ガイドR N A 標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアラ
インメントした場合、配列番号2の1 2 6 6 6位に対応する位置を含むかまたはその位置
に近接している、項目1に記載のガイドR N A 。

(項目3)

(a) 前記ガイドR N A 標的配列が、配列番号2 2 6 ~ 2 3 9 および2 6 4 ~ 2 6 8 の
いずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記D N A 標的化セグメントが、配列番号1 6 2 9 ~ 1 6 4 2 および1 6 4 8 ~
1 6 5 2 のいずれか1つを含み、かつ／または

(c) 前記ガイドR N A が、配列番号7 0 6 ~ 7 1 9 ; 9 3 6 ~ 9 4 9 ; 1 1 6 6 ~ 1
1 7 9 、1 3 9 6 ~ 1 4 0 9 、7 2 5 ~ 7 2 9 、9 5 5 ~ 9 5 9 、1 1 8 5 ~ 1 1 8 9 、
および1 4 1 5 ~ 1 4 1 9 のいずれか1つを含む、項目2に記載のガイドR N A 。

(項目4)

(a) 前記ガイドR N A 標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適
にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および／またはイントロン6および
／またはエクソン7に対応する領域内であり、かつ／または

(b) 前記ガイドR N A 標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適
にアラインメントした場合、配列番号2の1 2 6 6 6位に対応する位置から約1 0 0 0 、
5 0 0 、4 0 0 、3 0 0 、2 0 0 、1 0 0 、5 0 、4 5 、4 0 、3 5 、3 0 、2 5 、2 0
、1 5 、1 0 、または5ヌクレオチドの範囲内であり、必要に応じて、前記ガイドR N A
標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合
、配列番号2の1 2 6 6 6位に対応する位置を含む、項目2または3に記載のガイドR N
A 。

(項目5)

前記ガイドR N A 標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンを含むかまた
はそれに近接している、項目1に記載のガイドR N A 。

(項目6)

(a) 前記ガイドR N A 標的配列が、配列番号2 0 ~ 8 1 および2 5 9 ~ 2 6 3 のい
ずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記D N A 標的化セグメントが、配列番号1 4 2 3 ~ 1 4 8 4 および1 6 4 3 ~
1 6 4 7 のいずれか1つを含み、かつ／または

(c) 前記ガイドR N A が、配列番号5 0 0 ~ 5 6 1 、7 3 0 ~ 7 9 1 、9 6 0 ~ 1 0

21、1190～1251、720～724、950～954、1180～1184、および1410～1414のいずれか1つを含む、項目5に記載のガイドRNA。

(項目7)

(a) 前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン1に対応する領域内であり、かつ/または

(b) 前記ガイドRNA標的配列が、前記開始コドンから約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内である、項目5または6に記載のガイドRNA。

(項目8)

前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の終止コドンを含むかまたはそれに近接している、項目1に記載のガイドRNA。

(項目9)

(a) 前記ガイドRNA標的配列が、配列番号82～225のいずれか1つを含み、かつ/または

(b) 前記DNA標的化セグメントが、配列番号1485～1628のいずれか1つを含み、かつ/または

(c) 前記ガイドRNAが、配列番号562～705、792～935、1022～1165、および1252～1395のいずれか1つを含む、項目8に記載のガイドRNA。

。

(項目10)

(a) 前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン7に対応する領域内であり、かつ/または

(b) 前記ガイドRNA標的配列が、終止コドンから約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内である、項目8または9に記載のガイドRNA。

(項目11)

前記HSD17B13遺伝子が、ヒトHSD17B13遺伝子またはマウスHsd17b13遺伝子であり、必要に応じて、前記HSD17B13遺伝子が、前記ヒトHSD17B13遺伝子であり、配列番号2を含む、項目1から10までのいずれか一項に記載のガイドRNA。

(項目12)

前記DNA標的化セグメントを含むクラスター化された規則的な配置の短い回文配列リピート(CRISPR)RNA(crrRNA)およびトランスクレオチド活性化型CRISPRRNA(tracrRNA)を含む、項目1から11までのいずれか一項に記載のガイドRNA。

(項目13)

前記crrRNAおよび前記tracrRNAが、互いにハイブリダイズする別々の分子であるモジュラーガイドRNAであり、必要に応じて、前記crrRNAが、配列番号1421に記載の配列を含み、前記tracrRNAが、配列番号1422に記載の配列を含む、項目12に記載のガイドRNA。

(項目14)

前記crrRNAが前記tracrRNAとリンクして融合している单一大分子RNAであり、必要に応じて、配列番号1420および256～258のいずれか1つに記載の配列を含む、項目12に記載のガイドRNA。

(項目15)

細胞内のHSD17B13遺伝子を改変する方法、または細胞内のHSD17B13遺伝子の発現を変更するための方法における、項目1から14までのいずれか一項に記載のガイドRNAの使用。

(項目16)

項目1から14までのいずれか一項に記載のガイドRNAをコードするDNAを含む単離された核酸。

(項目17)

配列番号4(HSD17B13転写産物A)内の配列とハイブリダイズし、細胞におけるHSD17B13転写産物Aの発現を低減するアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNA。

(項目18)

(a) 配列番号7(HSD17B13転写産物D)には存在しない、配列番号4(HSD17B13転写産物A)に存在する配列とハイブリダイズし、かつ/または

(b) 配列番号4(HSD17B13転写産物A)のエクソン6とエクソン7との境界にまたがる配列とハイブリダイズする、項目17に記載のアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNA。

(項目19)

細胞内のHSD17B13遺伝子の発現を変更するための方法における、項目17または18に記載のアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAの使用。

(項目20)

項目17または18に記載のアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAをコードするDNAを含む単離された核酸。

(項目21)

項目16または20に記載の単離された核酸および異種核酸を含むベクター。

(項目22)

項目1から14までのいずれか一項に記載のガイドRNAおよび前記ガイドRNAの安定性を増大させる担体を含む組成物であって、必要に応じて、Casタンパク質をさらに含み、必要に応じて、前記Casタンパク質がCas9である、組成物。

(項目23)

項目17または18に記載のアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAと、前記アンチセンスRNA、前記siRNA、または前記shRNAの安定性を増大させる担体とを含む組成物。

(項目24)

項目1から14までのいずれか一項に記載のガイドRNAを含む細胞。

(項目25)

項目17または18に記載のアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAを含む細胞。

(項目26)

ヒト細胞であり、必要に応じて、肝細胞である、項目24または25に記載の細胞。

(項目27)

齧歯類細胞、マウス細胞、またはラット細胞であり、必要に応じて、多能性細胞または肝細胞である、項目24または25に記載の細胞。

(項目28)

細胞内のHSD17B13遺伝子を改変する方法であって、前記細胞のゲノムを、

(a) Casタンパク質；および

(b) 前記Casタンパク質と複合体を形成し、前記HSD17B13遺伝子内のガイドRNA標的配列を標的とするガイドRNAであって、前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含むかまたはその位置に近接している、ガイドRNAと接触させるステップを含み、

前記Casタンパク質が、前記HSD17B13遺伝子を切断する、方法。

(項目29)

(a) 前記ガイドRNA標的配列が、配列番号226～239および264～268の

いずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記DNA標的化セグメントが、配列番号1629～1642および1648～1652のいずれか1つを含み、かつ／または

(c) 前記ガイドRNAが、配列番号706～719；936～949；1166～1179、1396～1409、725～729、955～959、1185～1189、および1415～1419のいずれか1つを含む、項目28に記載の方法。

(項目30)

(a) 前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および／またはイントロン6および／またはエクソン7に対応する領域内であり、かつ／または

(b) 前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置から約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内であり、必要に応じて、前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含む、項目28または29に記載の方法。

(項目31)

前記ゲノムを、配列番号2の12666位に対応する位置の5'側の標的配列とハイブリダイズする5'相同アームおよび配列番号2の12666位に対応する位置の3'側の標的配列とハイブリダイズする3'相同アームを含む外因性ドナー配列と接触させるステップをさらに含み、前記外因性ドナー配列が、前記HSD17B13遺伝子と組換えられる、項目28から30までのいずれか一項に記載の方法。

(項目32)

前記外因性ドナー配列が、前記5'相同アームと前記3'相同アームとに挟まれた核酸挿入物をさらに含む、項目31に記載の方法。

(項目33)

前記核酸挿入物がチミンを含み、前記外因性ドナー配列が前記HSD17B13遺伝子と組換えられると、前記HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に前記チミンが挿入される、項目32に記載の方法。

(項目34)

(a) 前記外因性ドナー配列が、約50ヌクレオチド～約1kbの長さであり、必要に応じて、前記外因性ドナー配列が、約80ヌクレオチド～約200ヌクレオチドの長さであり、かつ／または

(b) 前記外因性ドナー配列が、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドである、項目31から33までのいずれか一項に記載の方法。

(項目35)

細胞内のHSD17B13遺伝子を改変する方法であって、前記細胞のゲノムを、

(a) Casタンパク質；および

(b) 前記Casタンパク質と複合体を形成し、前記HSD17B13遺伝子内の第1のガイドRNA標的配列を標的とする第1のガイドRNAであって、前記第1のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の開始コドンを含むか、または前記開始コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内である、第1のガイドRNAと接触させるステップを含み、

前記Casタンパク質が、前記HSD17B13遺伝子を切断するかまたは前記HSD17B13遺伝子の発現を変更する、方法。

(項目36)

(a) 前記第1のガイドRNA標的配列が、配列番号20～81および259～263のいずれか1つを含み、必要に応じて、前記第1のガイドRNA標的配列が、配列番号2

0～41のいずれか1つ、配列番号21～23、33、および35のいずれか1つ、または配列番号33および35のいずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記第1のガイドRNAが、配列番号1423～1484および1643～1647のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、必要に応じて、前記第1のガイドRNAが、配列番号1447～1468のいずれか1つ、配列番号1448～1450、1460、および1462のいずれか1つ；または配列番号1460および1462のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、かつ／または

(c) 前記第1のガイドRNAが、配列番号500～561、730～791、960～1021、1190～1251、720～724、950～954、1180～1184、および1410～1414のいずれか1つを含み、必要に応じて、前記第1のガイドRNAが、配列番号524～545、754～775、984～1005、および1214～1235のいずれか1つ、または配列番号295～297、525～527、755～757、985～987、1215～1217、307、309、537、539、767、769、997、999、1227、および1229のいずれか1つ、または配列番号307、309、537、539、767、769、997、999、1227、および1229のいずれか1つを含む、項目35に記載の方法。

(項目37)

(a) 前記Casタンパク質が、ヌクレアーゼ-活性Casタンパク質である；または

(b) 前記Casタンパク質が、転写活性化ドメインまたは転写リプレッサードメインと融合したヌクレアーゼ-不活性Casタンパク質である、項目35または36のいずれかに記載の方法。

(項目38)

前記細胞のゲノムを、前記Casタンパク質と複合体を形成し、前記HSD17B13遺伝子内の第2のガイドRNA標的配列を標的とする第2のガイドRNAと接触させるステップをさらに含み、前記第2のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の終止コドンを含むか、または前記終止コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内であり、前記細胞が、前記第1のガイドRNA標的配列と前記第2のガイドRNA標的配列との間に欠失を含むように改変されている、項目35から37までのいずれか一項に記載の方法。

(項目39)

(a) 前記第2のガイドRNA標的配列が、配列番号82～225のいずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記第2のガイドRNAが、配列番号1485～1628のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、かつ／または

(c) 前記第2のガイドRNAが、配列番号562～705、792～935、1022～1165、および1252～1395のいずれか1つを含む、項目38に記載の方法。

(項目40)

細胞内のHSD17B13遺伝子の発現を低減するための方法であって、前記細胞のゲノムを、配列番号4(HSD17B13転写産物A)内の配列とハイブリダイズし、HSD17B13転写産物Aの発現を低減するアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAと接触させるステップを含む、方法。

(項目41)

前記アンチセンスRNA、前記siRNA、または前記shRNAが、配列番号7(HSD17B13転写産物D)には存在しない配列番号4(HSD17B13転写産物A)に存在する配列とハイブリダイズし、必要に応じて、前記アンチセンスRNA、前記siRNA、または前記shRNAが、配列番号4(HSD17B13転写産物A)のエクソン6とエクソン7との境界にまたがる配列とハイブリダイズする、項目40に記載の方法。

(項目42)

前記細胞に発現ベクターを導入するステップをさらに含み、前記発現ベクターが、組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む前記組換えHSD17B13遺伝子を含み、必要に応じて、前記組換えHSD17B13遺伝子がヒト遺伝子である、項目35から41までのいずれか一項に記載の方法。

(項目43)

前記組換えHSD17B13遺伝子が、前記遺伝子の1つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型HSD17B13遺伝子に対して欠失しているHSD17B13ミニ遺伝子であり、必要に応じて、前記欠失したセグメントが、1つまたは複数のイントロン配列を含み、必要に応じて、前記HSD17B13ミニ遺伝子が、配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のイントロン6に対応するイントロンを含む、項目42に記載の方法。

(項目44)

前記細胞に発現ベクターを導入するステップをさらに含み、前記発現ベクターが、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードする核酸を含み、必要に応じて、前記HSD17B13タンパク質をコードする前記核酸が、配列番号7と最適にアラインメントした場合、配列番号7(HSD17B13転写産物D)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である、項目35から41までのいずれか一項に記載の方法。

(項目45)

前記細胞にHSD17B13タンパク質またはその断片を導入するステップをさらに含み、前記HSD17B13タンパク質またはその断片が、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である、項目35から41までのいずれか一項に記載の方法。

(項目46)

前記Casタンパク質がCas9である、項目28から45までのいずれか一項に記載の方法。

(項目47)

細胞を改変するための方法であって、前記細胞に発現ベクターを導入するステップを含み、前記発現ベクターが、組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む前記組換えHSD17B13遺伝子を含み、必要に応じて、前記組換えHSD17B13遺伝子がヒト遺伝子である、方法。

(項目48)

前記組換えHSD17B13遺伝子が、前記遺伝子の1つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型HSD17B13遺伝子に対して欠失しているHSD17B13ミニ遺伝子であり、必要に応じて、前記欠失したセグメントが、1つまたは複数のイントロン配列を含み、必要に応じて、前記HSD17B13ミニ遺伝子が、配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のイントロン6に対応するイントロンを含む、項目47に記載の方法。

(項目49)

細胞を改変するための方法であって、前記細胞に発現ベクターを導入するステップを含み、前記発現ベクターが、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%

%、少なくとも 99%、または 100% 同一である H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸を含み、必要に応じて、前記 H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする前記核酸が、配列番号 7 と最適にアラインメントした場合、配列番号 7 (H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D) と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である、方法。

(項目 50)

細胞を改変するための方法であって、前記細胞に H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片を導入するステップを含み、前記 H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片が、配列番号 1 5 (H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D) と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である、方法。

(項目 51)

前記細胞が、齧歯類細胞、マウス細胞、またはラット細胞であり、必要に応じて、前記細胞が、多能性細胞または肝細胞である、項目 2 8 から 5 0 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 52)

前記細胞が、ヒト細胞であり、必要に応じて、前記細胞が、肝細胞である、項目 2 8 から 5 0 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 53)

前記細胞が、*ex vivo* または *in vivo* にある、項目 2 8 から 5 2 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 54)

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリエントの保因者ではなく、慢性肝疾患有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象に、

(a) C a s タンパク質または前記 C a s タンパク質をコードする核酸；

(b) ガイド R N A または前記ガイド R N A をコードする核酸であって、前記ガイド R N A が、前記 C a s タンパク質と複合体を形成し、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内のガイド R N A 標的配列を標的とし、前記ガイド R N A 標的配列が、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位に対応する位置を含むかまたはその位置に近接している、ガイド R N A または前記ガイド R N A をコードする核酸；および

(c) 配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位に対応する位置の 5' 側の標的配列とハイブリダイズする 5' 相同アーム、配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位に対応する位置の 3' 側の標的配列とハイブリダイズする 3' 相同アーム、および前記 5' 相同アームと前記 3' 相同アームに挟まれたチミンを含む核酸挿入物を含む外因性ドナー配列を導入するステップを含み、

前記 C a s タンパク質が、前記対象の肝細胞内で前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を切断し、前記外因性ドナー配列が、前記肝細胞内で前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子と組換えられ、前記外因性ドナー配列が前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子と組換えられると、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位に対応するヌクレオチドと 1 2 6 6 6 位に対応するヌクレオチドとの間に前記チミンが挿入される、方法。

(項目 55)

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリエントの保因者ではなく、慢性肝疾患有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象に、

(a) C a s タンパク質または前記 C a s タンパク質をコードする核酸；

(b) 第 1 のガイド R N A または前記第 1 のガイド R N A をコードする核酸であって、前記第 1 のガイド R N A が、前記 C a s タンパク質と複合体を形成し、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の第 1 のガイド R N A 標的配列を標的とし、前記第 1 のガイド R N A 標的配列が、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンを含むか、または前記開始コドンから約 1 0

、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内であるか、または配列番号20～81から選択される、第1のガイドRNAまたは前記第1のガイドRNAをコードする核酸；および

(c)組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む前記組換えHSD17B13遺伝子を含む発現ベクタ

ー

を導入するステップを含み、

前記Casタンパク質が、前記対象の肝細胞内で前記HSD17B13遺伝子を切断するか、またはその発現を変更し、前記発現ベクターが、前記対象の前記肝細胞内で前記組換えHSD17B13遺伝子を発現する、方法。

(項目56)

HSD17B13 rs72613567バリエントの保因者ではなく、慢性肝疾患有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象に、前記対象の肝細胞内で配列番号4(HSD17B13転写産物A)内の配列とハイブリダイズし、HSD17B13転写産物Aの発現を低減するアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAを導入するステップを含む、方法。

(項目57)

HSD17B13 rs72613567バリエントの保因者ではなく、慢性肝疾患有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象に発現ベクターを導入するステップを含み、前記発現ベクターが、組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む前記組換えHSD17B13遺伝子を含み、前記発現ベクターが、前記対象の肝細胞内で前記組換えHSD17B13遺伝子を発現する、方法。

(項目58)

HSD17B13 rs72613567バリエントの保因者ではなく、慢性肝疾患有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象に発現ベクターを導入するステップを含み、前記発現ベクターが、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードする核酸を含み、前記発現ベクターが、前記対象の肝細胞内で前記HSD17B13タンパク質をコードする前記核酸を発現する、方法。

(項目59)

HSD17B13 rs72613567バリエントの保因者ではなく、慢性肝疾患有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象にメッセンジャーRNAを導入するステップを含み、前記メッセンジャーRNAが、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードし、前記mRNAが、前記対象の肝細胞内で前記HSD17B13タンパク質を発現する、方法。

(項目60)

HSD17B13 rs72613567バリエントの保因者ではなく、慢性肝疾患有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象の肝臓にHSD17B13タンパク質またはその断片を導入するステップを含み、前記HSD17B13タンパク質またはその断片が、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である、方法。