

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7396783号
(P7396783)

(45)発行日 令和5年12月12日(2023.12.12)

(24)登録日 令和5年12月4日(2023.12.4)

(51)国際特許分類		F I			
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	
A 6 1 K	35/14 (2015.01)	A 6 1 K	35/14		
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17		
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28		
請求項の数 19 (全299頁) 最終頁に続く					
(21)出願番号	特願2017-564333(P2017-564333)	(73)特許権者	517372508		
(86)(22)出願日	平成28年6月9日(2016.6.9)		エディタス・メディシン、インコーポレ		
(65)公表番号	特表2018-523977(P2018-523977		イテッド		
	A)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ州		
(43)公表日	平成30年8月30日(2018.8.30)		0 2 1 4 1、ケンブリッジ、ハーレー・		
(86)国際出願番号	PCT/US2016/036602		ストリート 1 1		
(87)国際公開番号	WO2016/201047	(74)代理人	100095832		
(87)国際公開日	平成28年12月15日(2016.12.15)		弁理士 細田 芳徳		
審査請求日	令和1年6月10日(2019.6.10)	(72)発明者	ゴリ, ジェニファー リア		
審判番号	不服2021-10076(P2021-10076/J		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2		
	1)		1 3 0, ジャマイカ プレイン, スポ		
審判請求日	令和3年7月28日(2021.7.28)		ルディング ストリート 2 0, ユニット		
(31)優先権主張番号	62/294,493		1		
(32)優先日	平成28年2月12日(2016.2.12)	(72)発明者	ワン, トンヤオ		
(33)優先権主張国・地域又は機関			アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2		
	最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 移植を改善するためのC R I S P R／C A S 関連方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

血球中のヒト白血球抗原（H L A）遺伝子の第1の対立遺伝子によりコードされるタンパク質の細胞表面発現を低減する方法であって、以下：

第1の対立遺伝子特異的 g R N A 分子および C a s 9 分子と前記血球を接触させて、これにより、前記 H L A 遺伝子の前記第1の対立遺伝子によりコードされるタンパク質の前記細胞表面発現を低減するステップを含み、

前記第1の対立遺伝子特異的 g R N A 分子が、前記 H L A 遺伝子中の標的ドメインと相補的である標的化ドメインを含み、

前記第1の対立遺伝子特異的 g R N A 分子および前記 C a s 9 分子が、前記 H L A 遺伝子の前記第1の対立遺伝子と結合し、

前記第1の対立遺伝子特異的 g R N A 分子および前記 C a s 9 分子が、H L A 遺伝子の単一の対立遺伝子と結合し、

ここで、前記第1の対立遺伝子特異的 g R N A 分子は、世界保健機関により採用された命名法に基く対立遺伝子群、具体的な H L A タンパク質、およびコード領域内の同義 D N A 置換についての H L A 遺伝子型情報を含むデータセットを含むデータベーススキームを用いて、特定の単一遺伝子を標的化するように設計されたものである、方法。

【請求項2】

対立遺伝子特異的遺伝子修飾を有する細胞の集団を含む組成物を製造する方法であって

、前記方法は、

対立遺伝子特異的 gRNA 分子および Cas9 分子と血球の集団を接触させるステップ、ここで前記対立遺伝子特異的 gRNA 分子および前記 Cas9 分子が、同定可能な HLA 遺伝子産物をコードする HLA 遺伝子の変異体である単一の対立遺伝子と結合し、前記対立遺伝子特異的 gRNA 分子が、前記 HLA 遺伝子中の標的ドメインと相補的である標的化ドメインを含む；ならびに

前記同定可能な HLA 遺伝子産物を発現するが、前記 HLA 遺伝子の変異体である前記単一の対立遺伝子は発現しない細胞を富化するステップを含む、

ここで、前記対立遺伝子特異的 gRNA 分子は、世界保健機関により採用された命名法に基づく対立遺伝子群、具体的な HLA タンパク質、およびコード領域内の同義 DNA 置換についての HLA 遺伝子型情報を含むデータセットを含むデータベーススキーマを用いて、特定の単一遺伝子を標的化するように設計されたものである、方法。

【請求項 3】

前記血球が、一次血球、幹細胞、または造血幹／前駆細胞（HSC）である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記血球が、循環血球、動員血球、骨髓細胞、骨髓系前駆細胞、リンパ球系前駆細胞、リンパ球、複能性前駆細胞、または系列特異的前駆細胞からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 HLA 遺伝子が、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、HLA-DQ、および HLA-DP からなる群から選択される、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞を、第 2 の gRNA 分子と接触させるステップをさらに含み、ここで、前記第 2 の gRNA 分子は、表 16 に記載される遺伝子を標的化する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

データベーススキーマを用いて、第 1 の対立遺伝子特異的 gRNA 分子を選択するステップをさらに含む、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

データベーススキーマを用いて、前記第 1 の対立遺伝子特異的 gRNA 分子を選択するステップが、以下：

コンピューターシステムのインターフェースを介して、第 1 の対象の内在性免疫原性遺伝子の第 1 の複数の対立遺伝子の一覧を受信するステップ；

前記コンピューターシステムのインターフェースを介して、第 2 の対象の内在性免疫原性遺伝子の第 2 の複数の対立遺伝子の一覧を受信するステップ；

前記第 1 および第 2 の複数の対立遺伝子の一覧を処理して、前記第 1 の複数の対立遺伝子と第 2 の複数の対立遺伝子との間で 1 つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を同定するステップ；

1 つまたは複数の gRNA 分子が、前記第 2 の複数の対立遺伝子の前記 1 つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるか否かを決定するためにデータベースに問い合わせるステップ；

好適であることが判明した前記 1 つまたは複数の gRNA 分子を同定する gRNA 分子のリストを作成するステップ；

gRNA 分子のリストをランク付けするステップ；ならびに

前記 gRNA 分子のランク付けリストを表示するステップを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

前記 Cas 9 分子が、

(a) 酵素的に活性な Cas 9 (e a Cas 9) 分子、ここで前記 e a Cas 9 分子が、内在性免疫原性遺伝子内に一本鎖切断または二本鎖切断を生成する；

(b) 野生型 Cas 9 ；

(c) Cas 9 ニッカーゼ；

(d) 不活性型 Cas 9 (d Cas 9) ；

(e) 分割型 Cas 9 ；

(f) 誘導性 Cas 9 ；

(g) N 末端 Ruv C 様ドメイン切断活性を含むが HNH 様ドメイン切断活性は有さない Cas 9 分子；

(h) ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) Cas 9 のアミノ酸位置 N 8 6 3 に対応するアミノ酸位置にアミノ酸突然変異を含む Cas 9 分子；

(i) HNH 様ドメイン切断活性を含むが N 末端 Ruv C 様ドメイン切断活性を有さない Cas 9 分子；および

(j) ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) Cas 9 のアミノ酸位置 D 1 0 に対応するアミノ酸位置にアミノ酸突然変異を含む Cas 9 分子

からなる群から選択される、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記 Cas 9 分子が、Cas 9 ポリペプチドである、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記 Cas 9 ポリペプチドが、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) Cas 9 ポリペプチドまたはストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) Cas 9 ポリペプチドである、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記 g RNA 分子と前記 Cas 9 ポリペプチドが、事前に形成されたりボヌクレオチド複合体中で結合されている、請求項 1 0 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記細胞をテンプレート核酸と接触させるステップをさらに含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記テンプレート核酸が、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記細胞をトランスジーンと接触させるステップをさらに含み、ここで、前記接触ステップは、前記トランスジーンが、前記細胞のゲノム、または前記細胞の集団の細胞に組み込まれることを可能にする条件下で行う、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

(a) 前記トランスジーンが、免疫同一ヒト白血球抗原 (HLA) をコードする遺伝子、化学療法選択マーカー、細胞表面抗原、または自殺遺伝子である；

(b) 前記トランスジーンが、HLA 遺伝子またはその断片である；あるいは

(c) 前記トランスジーンが、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB 1、HLA-DRB 3 / 4 / 5、HLA-DQ、および HLA-DP からなる群から選択される HLA 遺伝子またはその断片である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記方法が、血球の集団中の前記 HLA 遺伝子の前記第 1 の対立遺伝子によりコードされるタンパク質の前記細胞表面発現を低減するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記方法が、対立遺伝子特異的抗体を用いて、前記細胞の集団を選別することにより、前記HLA遺伝子の特定の対立遺伝子を発現する細胞を選択するステップをさらに含む、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

ヒト白血球抗原（HLA）遺伝子の第1の対立遺伝子に修飾を含む血球または血球の集団であって、前記血球が、第1の対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子と接触しており、前記第1の対立遺伝子特異的gRNA分子および前記Cas9分子が、HLA遺伝子の単一の対立遺伝子と結合しており、ここで、前記第1の対立遺伝子特異的gRNA分子は、世界保健機関により採用された命名法に基く対立遺伝子群、具体的なHLAタンパク質、およびコード領域内の同義DNA置換についてのHLA遺伝子型情報を含むデータセットを含むデータベーススキーマを用いて、特定の単一遺伝子を標的化するように設計されたものである、血球または血球の集団。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2015年6月9日に出願された米国仮特許出願第62／173,321号明細書；および2016年2月12日に出願された米国仮特許出願第62／294,493号明細書の優先権を主張するものであり、これら各々の内容全体は、本明細書に参照により明示的に援用される。

20

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、これは、その内容全体が、本明細書に参照により援用される。前記ASCIIコピーは、2016年6月9日に作製され、2016-06-09_126454-01420_EM052PCT1_ST25.txtと命名され、サイズは227KBである。

【背景技術】

【0003】

細胞療法は、疾患の治療を受ける患者に生存細胞を投与するか、またはその患者において特定の細胞集団を成熟させる。例えば、同種異系造血幹／前駆細胞移植（アロ-HSCT）、および同種異系臍帯移植は、鎌状赤血球症（SCD）などの多様な後天性、悪性、および遺伝性血液系疾患の有効な治療法である（Bacigalupo A, et al. Haematologica 100 (5) : 696-702 (2015) ; Kamanian NR et al. Biol. Blood Marrow Transplant 18 (8) : 1265-72 (2012)）。

30

【0004】

遺伝子療法の出現によって、今日、多種の疾患が、特定の病態（例えば、血液系障害）の原因を治療するように遺伝子改変された細胞を移植することにより治療することが可能であるため、遺伝子改変細胞を用いた細胞療法は、極めて有望である。例えば、CRISPR／Cas9システムの発見および哺乳動物細胞へのその適用によって、例えば、非相同末端結合経路（NHEJ）、相同組換え修復（HDR）、またはその他のDNA修復経路を介して、標的遺伝子の有効かつ正確な編集が達成される。任意選択的にドナーDNA修復テンプレート分子と一緒に、Cas9分子および標的的特異的ガイドRNA（gRNA）分子を共送達すると、ゲノム内での標的配列の遺伝子編集（例えば、疾患関連突然変異）が促進される。従って細胞（例えば、幹細胞）中の遺伝子の修飾を目的とするCRISPR／Cas9システムの使用は、複数の遺伝性疾患を治療する上で有望な戦略である。

40

レシピエント対象由来ではない細胞（例えば、造血幹細胞（HSC若しくはHSPC）および／またはT細胞）の移植を成功させるために、ドナー細胞が、1つまたは複数の免疫原性遺伝子の遺伝子座で対立遺伝子の高いおよび／または有意なマッチング度を呈示す

50

るようなドナーを見出さなければならない。残念ながら、ヒト集団におけるハプロタイプ異質性のために、1つまたは複数の免疫原性遺伝子座でマッチする対立遺伝子を有する好適なドナー細胞の入手可能性は限られている。従って、好適なドナーセルを同定することができないために、最終的に、患者は必要な移植を受けることができないか、または医者が、ミスマッチドナー細胞を使用せざるを得なくなり、これが最終的に免疫拒絶を引き起こし得る。例えば、ヒト白血球抗原遺伝子（HLA）は、早期骨髄造血幹／前駆細胞移植（HSCT）臨床治療中に初めて同定された免疫原性遺伝子である。骨髄HSPCドナーとレシピエント対象との間のHLAのミスマッチは、免疫反応を引き起こす恐れがあり、その場合、ドナー移植片から発生するリンパ球が、宿主組織に対して免疫応答を開始する。この病状、すなわち移植片対宿主病（GVHD）を引き起こすドナーT細胞同種抗原反応は、皮膚、消化管（GI）、および肝臓に集中する。GVHDは、非再発罹患率および死亡率の主な原因であり、同種異系HSCT対象の約50%に影響を与える（Bhatia S. Expert Rev Hematol. 2011; 4 (4) : 437-452; Garnett C, et al. Ther Adv Hematol. 4 (6) : 366-78 (2013)）。反対に、レシピエントT細胞は、同種異系HSPC細胞表面上に発現若しくは提示されたHLAタンパク質またはドナー特異的抗原を認識することによって、入来したドナー同種異系HSPCを外来のものであるとして認識する可能性があり、最終的に移植片拒絶を引き起こす。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

20

【0005】

【文献】Bacigalupo A, et al. Haematologica 100 (5) : 696-702 (2015)

【文献】Kamani NR et al. Biol. Blood Marrow Transplant 18 (8) : 1265-72 (2012)

【文献】Bhatia S. Expert Rev Hematol. 2011; 4 (4) : 437-452

【文献】Garnett C, et al. Ther Adv Hematol. 4 (6) : 366-78 (2013)

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

同種異系移植ドナー細胞に対する免疫応答を抑制するための医学分野の進歩にもかかわらず、例えば、CRISPR/Cas9システムを用いて、特定の病態の原因を治療するために遺伝子改変されたドナー細胞をはじめとする、ドナー細胞の拒絶を低減し、および／またはその免疫適合性を改善することができる別の方法および組成物が依然として求められている。とりわけ、免疫原性遺伝子ハプロタイプの相違とは関係なく、レシピエント対象に首尾よく移植することができる好適なドナー細胞の利用可能性を向上させることが依然として求められる。

【課題を解決するための手段】

40

【0007】

本明細書に記載される方法および組成物は、レシピエント対象への移植のためのドナー細胞（例えば、HSCおよび／またはT細胞）の免疫適合性を高める。本明細書に記載される方法および組成物によって、細胞の1つまたは複数の免疫原性遺伝子（例えば、HLA遺伝子）の対立遺伝子特異的修飾が達成され、これにより、レシピエント対象への移植に好適なドナー細胞が得られる。特に、本明細書に記載される細胞を、Cas9分子、および内在性免疫原性遺伝子を標的化する少なくとも1つの対立遺伝子特異的gRNA分子（例えば、修飾gRNA分子）と接触させることにより、対立遺伝子は、免疫適合性細胞（例えば、免疫適合性血球）を産生するように改変される。本明細書に記載される方法および組成物を用いて産生された細胞は、レシピエント対象に移植されたとき、免疫応答を

50

誘導しにくく、および／またはレシピエント対象の免疫系によって拒絶されにくい。ドナーの免疫原性遺伝子ハプロタイプとは関係なく、あらゆるドナー対象に移植されるようにカスタム化され得るドナー細胞の免疫適合性を改善することができれば、多様な臨床用途の細胞療法の分野で使用することができるドナー細胞のプールの著しい増加をもたらすため、特に有利である。

【0008】

本明細書には、免疫適合性血球を生成する方法が提供され、これは、第1対立遺伝子特異的修飾gRNA分子およびCas9分子と血球を接触させて、第1対立遺伝子特異的修飾gRNA分子およびCas9分子を、内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子と結合させ、これにより、内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子を修飾して、免疫適合性血球を生成するステップを含む。

10

【0009】

また、血球中の内在性免疫原性遺伝子を修飾する方法も本明細書に提供され、これは、データベーススキームを用いて第1対立遺伝子特異的gRNA分子を選択するステップ、ならびに第1対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子と血球を接触させて、対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子を、内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子と結合させ、これにより、内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子を修飾するステップを含む。

【0010】

さらに、血球中の内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子の細胞表面発現を低減する方法も提供され、これは、第1対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子と血球を接触させて、対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子を、内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子と結合させ、これにより、内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子の細胞表面発現を低減するステップを含む。

20

【0011】

ハプロタイプ修飾血球を対象に移植する方法も提供され、本方法は、内在性免疫原性遺伝子に第1ハプロタイプを有する第1の対象から血球を単離するステップ、第1対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子と血球を接触させて、第1対立遺伝子特異的gRNA分子を、内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子と結合させ、これにより、内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子を修飾するステップ、ならびに内在性免疫原性遺伝子に第2ハプロタイプを有する第2の対象へと血球を移入するステップを含む。

30

【0012】

ハプロタイプ修飾血球は、ドナーとレシピエントの細胞間のマッチングの増大、ならびに混合型リンパ球または白血球反応アッセイにより決定される、免疫原性の低減に基づいて、第2の対象による拒絶が低下する傾向を有し得る。

【0013】

ハプロタイプ修飾血球は、第2の対象により拒絶されない場合もある。

【0014】

さらに、対立遺伝子特異的遺伝子修飾を有する細胞の集団を含む組成物を製造する生体外の方法も提供され、これは、対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子と細胞の集団を接触させて、対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子を、同定可能な遺伝子産物をコードする遺伝子の単一对立遺伝子と結合させるステップ；ならびに同定可能な遺伝子産物を発現するが、第1対立遺伝子は発現しない細胞を富化するステップを含む。

40

【0015】

本明細書に記載される方法で、遺伝子を発現するが、第1対立遺伝子は発現しない細胞を富化するステップは、フローサイトメトリーを用いて、細胞を選別するステップを含み得る。

【0016】

遺伝子を発現するが、第1対立遺伝子は発現しない細胞を富化するステップは、遺伝子

50

の第1対立遺伝子によりコードされる同定可能な遺伝子産物の第1変異体と特異的に結合する第1の抗体および同定可能な遺伝子産物の第2変異体に結合する第2の抗体と複数の細胞の各々を接触させるステップを含み得る。

【0017】

遺伝子を発現するが、第1対立遺伝子は発現しない細胞を富化するステップは、複数の細胞の各細胞において、同定可能な遺伝子産物の機能性変異体と結合した物質またはシグナルを検出するステップを含んでもよい。

【0018】

細胞の集団は、血球の集団であってよい。血球は、造血幹／前駆細胞（HSC）であってよい。

【0019】

細胞の集団は、循環血球の集団、動員血球の集団、骨髄細胞の集団、骨髄系前駆細胞の集団、リンパ球系前駆細胞の集団、リンパ球の集団、複能性前駆細胞の集団、系列特異的前駆細胞の集団、内皮細胞の集団、間葉系間質細胞の集団、またはこれらの組合せからなる群から選択され得る。

【0020】

血球は、幹細胞である。幹細胞は、造血幹／前駆細胞（HSC）である。また、細胞は、循環血球、動員血球、骨髄細胞、骨髄系前駆細胞、リンパ球系前駆細胞、リンパ球、複能性前駆細胞、系列特異的前駆細胞、内皮細胞、Tリンパ球、または間葉系間質細胞からなる群から選択してもよい。

【0021】

gRNA分子は、修飾gRNA分子であってよい。

【0022】

gRNA分子は、ヒト白血球抗原（HLA）遺伝子中の標的ドメインと相補的である標的化ドメインを含んでもよい。HLA遺伝子は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、HLA-DQ、およびHLA-DPからなる群から選択され得る。

【0023】

本方法は、細胞、または細胞の集団を、第2のgRNA分子と接触させるステップをさらに含み、ここで、前記第2のgRNA分子は、表16に記載される遺伝子を標的化する。

【0024】

第2のgRNA分子は、修飾gRNA分子であってよい。

【0025】

本方法は、第2のCas9分子と細胞を接触させるステップをさらに含む。

【0026】

Cas9分子は、酵素的に活性なCas9（eCas9）分子であってよい。eCas9分子は、内在性免疫原性遺伝子内に一本鎖切断を生成し得る。eCas9分子は、内在性免疫原性遺伝子内に二本鎖切断を生成し得る。

【0027】

Cas9分子は、野生型Cas9、Cas9ニッカーゼ、不活性型Cas9（dCas9）、分割型Cas9、および誘導性Cas9からなる群から選択してもよい。

【0028】

Cas9分子は、N末端RuvC様ドメイン切断活性を含むが、HNH様ドメイン切断活性はなくてもよい。Cas9分子は、ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）Cas9のアミノ酸位置N863に対応するアミノ酸位置にアミノ酸突然変異を含み得る。

【0029】

Cas9分子は、HNH様ドメイン切断活性を含むが、N末端RuvC様ドメイン切断活性はなくてもよい。Cas9分子は、ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）Cas9のアミノ酸位置D10に対応するアミノ酸

10

20

30

40

50

位置にアミノ酸突然変異を含み得る。

【0030】

Cas9分子は、Cas9ポリペプチドであってもよい。Cas9ポリペプチドは、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) Cas9ポリペプチドであってもよい。Cas9ポリペプチドは、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) Cas9ポリペプチドであってもよい。gRNA分子とCas9ポリペプチドは、事前に形成されたりボヌクレオチド複合体中で結合されていてもよい。

【0031】

Cas9分子は、Cas9ポリペプチドをコードする核酸であってもよい。

10

【0032】

修飾gRNA分子は、5'末端キャップ構造を含んでもよい。5'末端キャップ構造は、3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G抗リバースキャップアナログ(ARCA)である。修飾gRNA分子は、3'末端ポリ-Aテールを含んでもよい。

【0033】

本明細書に記載される方法は、細胞、または細胞の集団をテンプレート核酸と接触させるステップをさらに含んでもよい。テンプレート核酸は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド(ssODN)であってもよい。ssODNは、5'ホスホロチオエート修飾を含んでもよい。ssODNは、3'ホスホロチオエート修飾を含む。ssODNは、5'ホスホロチオエート修飾と3'ホスホロチオエート修飾を含んでもよい。

20

【0034】

テンプレート核酸は、アデノ関連ウイルス(AAV)または組込み欠陥レンチウイルス(ILDV)を用いて、細胞、または細胞の集団に送達してもよい。

【0035】

本明細書に記載される方法は、細胞、または細胞の集団をトランスジーンと接触させるステップをさらに含んでもよく、ここで、接触ステップは、トランスジーンが、細胞のゲノム、または細胞の集団の細胞に組み込まれることを可能にする条件下で行う。トランスジーンは、細胞のゲノム内のセーフ・ハーバー部位に組み込まれ得る。

【0036】

トランスジーンは、免疫同一ヒト白血球抗原(HLA)をコードする遺伝子、化学療法選択マーカー、細胞表面抗原、または自殺遺伝子である遺伝子であってもよい。トランスジーンは、HLA遺伝子またはその断片であってもよい。HLA遺伝子は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、HLA-DQ、およびHLA-DPからなる群から選択され得る。

30

【0037】

本明細書に記載される方法は、細胞、または細胞の集団をeCas9分子と接触させるステップをさらに含んでもよい。eCas9を転写レPRESSerまたは転写アクチベーターと融合させてもよい。

【0038】

細胞は、細胞の集団を含んでもよい。

40

【0039】

本明細書に記載される方法は、対立遺伝子特異的抗体を用いて、細胞の集団を選別することにより、1遺伝子の特定の対立遺伝子を発現する細胞を選択するステップをさらに含んでもよい。細胞の集団は、蛍光活性化細胞選別(FACS)または免疫原性マイクロビーズ媒介性細胞選別によって選別してもよい。

【0040】

遺伝子は、免疫原性遺伝子であってもよい。

【0041】

本明細書に記載される方法は、内在性免疫原性遺伝子に第1ハプロタイプを有する第1の対象から血球を単離するステップをさらに含んでもよい。

50

【0042】

本明細書に記載される方法は、接触ステップ後に、内在性免疫原性遺伝子に第2ハプロタイプを有する第2の対象に血球を移入するステップをさらに含んでもよい。

【0043】

本明細書に記載される方法は、接触ステップ後に、生体外で細胞または細胞の集団を拡大するステップをさらに含んでもよい。

【0044】

本明細書に記載される方法は、T細胞補充療法 (a d d - b a c k) をさらに含んでもよい。

【0045】

同定可能な遺伝子産物は、細胞表面マーカーであってもよい。同定可能な遺伝子産物は、ヒト白血球抗原 (H L A) であってもよい。同定可能な遺伝子産物は、主要組織適合性抗原複合体タンパク質またはマイナー組織適合性抗原 (M i H A) (例えば、ケモカイン受容体) であってもよい。

【0046】

遺伝子の第1対立遺伝子は、同定可能な遺伝子産物の非機能性変異体をコードし得る。

【0047】

本明細書に記載される方法は、C a s 9分子およびg R N A分子を用いて、追加遺伝子座を改変 (例えば、ロックダウンもしくはロックアウトにより、例えば、不活性化) するステップをさらに含んでもよい。追加遺伝子座は、ケモカイン受容体の遺伝子座、例えば、C C R 1、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C C R 6、C C R 10、C X C R 1、C X C R 2、C X C R 3、またはC X C R 6であってもよい。

【0048】

一実施形態では、本方法は、修飾を確認するために細胞の配列を取得するステップをさらに含んでもよい。

【0049】

細胞または細胞の集団は、一次血球または一次血球の集団であってもよい。細胞または細胞の集団は、C D 3 4⁺骨髄細胞、C D 3 4⁺末梢血球、人工多能性幹 (i P S) 細胞から産生されたC D 3 4⁺細胞、胚性幹 (E S) 細胞、内皮細胞、リンパ球系前駆細胞、骨髄系前駆細胞、Tリンパ球細胞、またはこれらの集団のいずれかであってもよい。細胞の集団は、異質の細胞集団または同種の細胞集団であってもよい。

【0050】

本明細書に記載される方法を使用して、1つまたは複数の対立遺伝子特異的g R N A分子およびC a s 9分子を用い、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、またはそれ以上の対立遺伝子を改変することができる。本明細書に記載される方法を使用して改変される対立遺伝子は、改変された対立遺伝子 (例えば、インデルの挿入による) の不活性化をもたらし得る。

【0051】

本明細書に記載される方法のいずれかによって作製される組成物も提供される。組成物は、薬剤としての使用を目的とし得る。組成物は、移植での使用を目的とし得る。

【0052】

本明細書に記載される方法によって改変された細胞または細胞の集団も提供される。

【0053】

本明細書に記載される細胞または細胞の集団を含む医薬組成物も提供される。

【0054】

細胞は、表1から選択されるH L A - A対立遺伝子、表2から選択されるH L A - B対立遺伝子、表3から選択されるH L A - C対立遺伝子、表4から選されるH L A - D R B 1対立遺伝子、または表5から選択されるH L A - D Q B 1対立遺伝子を含んでもよい。

【0055】

第2の対象は、表6～15から選択されるハプロタイプを含んでもよい。第2の対象は

10

20

30

40

50

、遺伝性血液障害、例えば、貧血、免疫不全、または異常ヘモグロビン症、血液疾患、酵素蓄積欠損またはその他の疾患（例えば、遺伝性もしくは後天性血液疾患）を有し得る。第2の対象は、後天性障害、または望ましくない細胞増殖を特徴とする障害を有し得る。第2の対象は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、骨髄異形成症候群、または骨髄増殖性疾患を有し得る。第2の対象は、HIVに感染しているか、または後天性免疫不全症候群（AIDS）を有し得る。

【0056】

第1および第2の対象は、異性であってもよく、例えば、第1の対象は男性で、第2の対象は女性であるか、または第1の対象は女性で、第2の対象は男性である。

【0057】

第1の対象は、第1の対象とは異なる民族的背景または民族であってもよい。第1の対象と第2の対象は、同じ民族的背景または民族であってもよい。民族的背景または民族は、アジア系（例えば、アジア系アメリカ人、例えば、アジア系パシフィックアイランダー）、アフリカ系（例えば、アフリカ系移民、例えば、アフリカ系アメリカ人）、白色人種（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人）、ヒスパニック系（例えば、ラテンアメリカ人、例えば、ヒスパニック系アメリカ人）、ユダヤ人、またはインド亜大陸（亜大陸住民）であってもよい。第1の対象は、第1の対象とは異なる民族系統であってもよい。第1の対象と第2の対象は、同じ民族系統であってもよい。

【0058】

修飾細胞または本明細書に記載される方法のいずれかによって改変された細胞を対象に投与するステップを含む、対象の疾患を治療または予防する方法も提供される。疾患は、表16に列記される疾患であってもよい。

【0059】

疾患を治療または予防する方法は、修飾細胞または本明細書に記載される方法のいずれかによって改変された細胞の対象への2回目の投与を含み得る。修飾細胞の2回目の投与は、最初の投与から3、6、9、12、1、または24カ月以内に行ってもよい。

【0060】

対象は、前処置または免疫抑制と相反する病状を有し得る。対象は、複数の併存疾患、重症併存疾患、GVHDもしくは移植片拒絶の高いリスク、または発症中、慢性もしくは急性感染症を有し得る。対象の年齢は、50、55、60、65、70、または75歳超であってもよい。対象の年齢は、5、4、3、2、または1歳未満であってもよい。

【0061】

本方法は、修飾細胞（例えば、修飾HSPC、HPC、CB-HSPC、CD34⁺細胞、リンパ球系前駆細胞、骨髄系前駆細胞、またはTリンパ球）の投与前に、対象を前処置する（例えば、内在性HSPCをアブレートするか、または造血空間を形成する）ステップをさらに含んでもよい。

【0062】

前処置は、修飾細胞において修飾された1つまたは複数の対立遺伝子でマッチしない同種異系細胞の移植の際に用いられる前処置レジメンよりも低毒性となり得る。

【0063】

本方法は、対象に免疫抑制処置を投与するステップを（例えば、修飾細胞の投与前または後に）含んでもよい。免疫抑制剤は、修飾細胞において修飾された1つまたは複数の遺伝子座で不一致の同種異系細胞の移植の際に用いられる免疫抑制処置よりも低毒性となり得る。

【0064】

対象は、治療前に妊娠していてもよい。対象は、治療前に輸血が為されていてもよい。

【0065】

修飾細胞は、治療しようとする障害の発症後に投与してもよい。修飾細胞は、治療しようとする障害の発症前に投与してもよい。

【0066】

10

20

30

40

50

内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子に修飾を含む血球であって、第1対立遺伝子特異的修飾 gRNA 分子および Cas9 分子と接触させた血球も提供される。血球は、1つまたは複数の対立遺伝子特異的 gRNA 分子および Cas9 分子を用いて、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第2、第8、第9、第10、またはそれ以上の対立遺伝子で、修飾され得る。

【0067】

内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子に修飾を含む血球の集団であって、第1対立遺伝子特異的修飾 gRNA 分子および Cas9 分子と接触させた血球の集団も提供される。血球の集団は、1つまたは複数の対立遺伝子特異的 gRNA 分子および Cas9 分子を用いて、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第2、第8、第9、第10、またはそれ以上の対立遺伝子で、修飾され得る。

10

【0068】

免疫原性遺伝子は、ヒト白血球抗原（HLA）遺伝子であってもよい。

【0069】

本明細書に記載される方法は、データベーススキーマを用いて、第1対立遺伝子特異的 gRNA 分子を選択するステップをさらに含んでもよい。

【0070】

データベーススキーマを用いて、第1対立遺伝子特異的 gRNA 分子を選択するステップは、以下：コンピューターシステムのインターフェースを介して、第1の対象の内在性免疫原性遺伝子の第1の複数の対立遺伝子の一覧を受けるステップ；コンピューターシステムのインターフェースを介して、第2の対象の内在性免疫原性遺伝子の第2の複数の対立遺伝子の一覧を受けるステップ；第1および第2の複数の対立遺伝子の一覧を処理して、第1の複数の対立遺伝子と第2の複数の対立遺伝子間の1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を同定するステップ；1つまたは複数の gRNA 分子が、第2の複数の対立遺伝子の1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するために好適であるか否かを決定するためにデータベースに問い合わせ（クエリー）するステップ；データベースからの1つまたは複数の gRNA 分子が、1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるという決定に応じて、好適であることが判明した1つまたは複数の gRNA 分子を同定する gRNA 分子のリストを作成するステップ；gRNA 分子のリストをランク付けするステップ；ならびに gRNA 分子のランク付けリストを表示するステップを含み得る。

20

30

【0071】

さらに、データベーススキーマをインプリメントするための処理装置による実行のための命令を保存する非一時的コンピューター可読記憶媒体も提供され、データベーススキーマは、以下を含む：主要 HLA 対立遺伝子に関するデータを保存する対立遺伝子テーブル；gRNA に関するデータを保存する gRNA テーブル；対立遺伝子テーブルの記録と gRNA テーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子－gRNA リレーションテーブル（ここで、対立遺伝子テーブルは、対立遺伝子－gRNA リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、gRNA テーブルは、対立遺伝子－gRNA リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する）；ハプロタイプに関するデータを保存するハプロタイプテーブル（ここで、対立遺伝子テーブルは、ハプロタイプテーブルと1対多のリレーションシップを有する）；複数の系統内に発生するハプロタイプの頻度に関するデータを保存するハプロタイプ－頻度テーブル（ここで、ハプロタイプテーブルは、ハプロタイプ－頻度テーブルと1対1のリレーションシップを有する）；系統に関するデータを保存する系統テーブル；ハプロタイプ－頻度テーブルの記録と系統テーブルの記録とのリレーションシップを保存する系統－ハプロタイプ－リレーションテーブル（ここで、ハプロタイプ－頻度テーブルは、系統－ハプロタイプ－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、系統テーブルは、系統－ハプロタイプ－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する）；複数の系統内に発生する対立遺伝子の頻度に関するデータを保存する対立遺伝子頻度テーブル（ここで、対立遺伝子

40

50

テーブルは、対立遺伝子頻度テーブルと1対1のリレーションシップを有する) ; ならびに対立遺伝子頻度テーブルの記録と系統テーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子-系統-リレーションテーブル(ここで、対立遺伝子頻度テーブルは、対立遺伝子-系統-リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、系統テーブルは、対立遺伝子-系統-リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する)。

【0072】

データベーススキーマは、マイナー組織適合性抗原に関するデータを保存するマイナー抗原テーブル; およびマイナー組織適合性抗原に対するHLA制限に関するデータを保存する主要-マイナー-制限テーブルをさらに含んでもよく、ここで、マイナー抗原テーブルは、主要-マイナー-制限テーブルと1対多のリレーションシップを有し、対立遺伝子テーブルは、主要-マイナー-制限テーブルと1対多のリレーションシップを有する。

10

【0073】

対立遺伝子テーブルは、対立遺伝子idキー、対立遺伝子属性、遺伝子名属性、および対立遺伝子配列属性を含んでもよい。

【0074】

gRNAテーブルは、gRNAidキー、Cas変異体属性、gRNA配列(PAMを含む)属性、gRNA配列(PAMを含まない)属性、鎖属性、直交性スコア属性、およびオフターゲットリスト情報属性を含んでもよい。

【0075】

対立遺伝子-ガイド-リレーションテーブルは、リレーションidキー、対立遺伝子テーブルの対立遺伝子idキーに対応する対立遺伝子id属性、gRNAテーブルのgRNAidキーに対応するgRNAid属性を含んでもよい。

20

【0076】

ハプロタイプテーブルは、ハプロタイプidキー、HLA-A-対立遺伝子属性、HLA-B対立遺伝子属性、HLA-C対立遺伝子属性、HLA-DRB1遺伝子座属性、HLA-DRB3/DRB4/DRB5遺伝子座属性、HLA-DQB1対立遺伝子遺伝子座属性を含んでもよい。

【0077】

ハプロタイプ-頻度テーブルは、ハプロタイプ頻度idキー、ハプロタイプテーブルのハプロタイプidキーに対応するハプロタイプid属性、ヨーロッパ系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、ヨーロッパ系統群におけるハプロタイプの発生のランクの属性、アフリカ系アメリカ人系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、アフリカ系アメリカ人系統群におけるハプロタイプの発生のランクの属性、アジア系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、アジア系統群におけるハプロタイプの発生のランクの属性、ヒスパニック系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、ヒスパニック系統群におけるハプロタイプの発生のランクの属性、ユダヤ人系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、およびユダヤ人系統群におけるハプロタイプの発生のランクの属性を含んでもよい。

30

【0078】

対立遺伝子-頻度テーブルは、対立遺伝子頻度idキー、対立遺伝子テーブルの対立遺伝子idキーに対応する対立遺伝子id属性、ヨーロッパ系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、ヨーロッパ系統群における対立遺伝子の発生のランクの属性、アフリカ系アメリカ人系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、アフリカ系アメリカ人系統群における対立遺伝子の発生のランクの属性、アジア系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、アジア系統群における対立遺伝子の発生のランクの属性、ヒスパニック系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、ヒスパニック系統群における対立遺伝子の発生のランクの属性、ユダヤ人系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、ユダヤ人系統群における対立遺伝子の発生のランクの属性を含んでもよい。

40

【0079】

50

対立遺伝子－頻度テーブルは、対立遺伝子テーブルと依存リレーションシップを有し得るため、対立遺伝子テーブルに完全に依存的である。

【0080】

ハプロタイプ－頻度テーブルは、ハプロタイプテーブルと依存リレーションシップを有し得るため、ハプロタイプテーブルに完全に依存的である。

【0081】

gRNAは、免疫原性遺伝子を編集するために設計してもよい。gRNAは、HLA対立遺伝子を編集するために設計してもよい。

【0082】

ハプロタイプは、異なるHLA遺伝子の対立遺伝子群であってもよい。

10

【0083】

さらに、1つまたは複数の対立遺伝子を編集するためのgRNA分子を同定するために、コンピューターシステムで実施される方法も提供され、これは、以下：コンピューターシステムのインターフェースを介して、標的化移植片レシピエントの第1の複数の対立遺伝子の一覧を受信するステップ；コンピューターシステムのインターフェースを介して、標的化移植片ドナーの第2の複数の対立遺伝子の一覧を受信するステップ；第1および第2の複数の対立遺伝子の一覧を処理して、第1の複数の対立遺伝子と第2の複数の対立遺伝子との間で1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を同定するステップ；データベースに問い合わせ、1つまたは複数のgRNAが、第2の複数の対立遺伝子の1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるか否かを決定するステップ；データベースからの1つまたは複数のgRNAが、1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるという決定に応じて、好適であることが判明した1つまたは複数のgRNAを同定するgRNAのリストを作成するステップ；gRNAのリストをランク付けするステップ；ならびにgRNAのランク付けリストを表示するステップを含む。

20

【0084】

gRNAのリストからのgRNAは、標的化移植片ドナーの第2の複数の対立遺伝子からのミスマッチ対立遺伝子を編集して、第1の複数の対立遺伝子と第2の複数の対立遺伝子との間でマッチする対立遺伝子の数を増加することができると考えられる。

【0085】

gRNAのリストからのgRNAは、1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集して、標的化移植片レシピエントに移植片対宿主病（GVHD）が発生する可能性を低減することができると考えられる。

30

【0086】

本明細書に記載される方法は、第1の複数の対立遺伝子の各々についてDNA配列を表示するステップをさらに含んでもよい。

【0087】

データベースは、ある人種群に発生する対立遺伝子の尤度を示す数を評点してもよい。データベースは、ある民族群に発生する対立遺伝子の尤度を示す数を評点してもよい。

【0088】

本明細書に記載される方法は、ある系統内に第1の複数の対立遺伝子の各々の発生頻度を表示するステップをさらに含んでもよい。

40

【0089】

本明細書に記載される方法は、第1の複数の対立遺伝子の各々とマイナー組織適合性抗原との間の制限リレーションシップを表示するステップをさらに含んでもよい。

【0090】

第1の複数の対立遺伝子は、標的化移植片レシピエントの母系遺伝性主要HLAハプロタイプであり、第2の複数の対立遺伝子は、標的化移植片ドナーの母系遺伝性主要HLAハプロタイプである。

【0091】

第1の複数の対立遺伝子の一覧は、1つの対立遺伝子、2つの対立遺伝子、3つの対立

50

遺伝子、4つの対立遺伝子、5つの対立遺伝子、6つの対立遺伝子、7つの対立遺伝子、8つの対立遺伝子、9つの対立遺伝子または10の対立遺伝子を含み得る。血球は、1つまたは複数の対立遺伝子特異的 gRNA 分子および Cas9 分子を用いて、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第2、第8、第9、第10、または第11以上の対立遺伝子で、修飾され得る。

【0092】

第2の複数の対立遺伝子の一覧は、1つの対立遺伝子、2つの対立遺伝子、3つの対立遺伝子、4つの対立遺伝子、5つの対立遺伝子、6つの対立遺伝子、7つの対立遺伝子、または8つの対立遺伝子を含み得る。

【0093】

gRNA のリストは、1つのミスマッチ対立遺伝子を編集するための1つの gRNA を同定し得る。gRNA のリストは、2つ以上のミスマッチ対立遺伝子を編集するための2つ以上の gRNA を同定し得る。

【0094】

gRNA のリストは、2つ以上のミスマッチ対立遺伝子を編集するための1つの gRNA を同定し得る。

【0095】

データベースは、本明細書に記載されるデータベーススキーマを用いてインプリメントされ得る。

【0096】

さらに、データベーススキーマをインプリメントするためのシステムも提供され、このシステムは、プロセッサ；およびデータベーススキーマを保存するメモリを含み、ここで、データベーススキーマは、以下を含む：HLA 対立遺伝子に関するデータを保存する対立遺伝子テーブル；gRNA に関するデータを保存する gRNA テーブル；対立遺伝子テーブルの記録と gRNA テーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子 gRNA リレーションテーブル（ここで、対立遺伝子テーブルは、対立遺伝子 gRNA リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、gRNA テーブルは、対立遺伝子 gRNA リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する）；ハプロタイプに関するデータを保存するハプロタイプテーブル（ここで、対立遺伝子テーブルは、ハプロタイプテーブルと1対多のリレーションシップを有する）；系統情報に関するデータを保存する系統テーブル；ハプロタイプテーブルの記録と系統テーブルの記録とのリレーションシップを保存する系統ハプロタイプリレーションテーブル（ここで、ハプロタイプテーブルは、系統ハプロタイプリレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、系統テーブルは、系統ハプロタイプリレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する）；複数の系統内に発生する対立遺伝子の頻度に関するデータを保存する対立遺伝子頻度テーブル（ここで、対立遺伝子テーブルは、対立遺伝子頻度テーブルと1対多のリレーションシップを有する）；ならびに対立遺伝子頻度テーブルの記録と系統テーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子系統リレーションテーブル（ここで、対立遺伝子頻度テーブルは、対立遺伝子系統リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、系統テーブルは、対立遺伝子系統リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する）。

【0097】

さらに、1つまたは複数の対立遺伝子を編集するための gRNA を同定するシステムも提供され、このシステムは、プロセッサ；ならびに、実行されると以下のことをプロセッサに行わせる命令を保存するメモリを含む：標的化移植片レシピエントの第1の複数の対立遺伝子の一覧を受信する；標的化移植片ドナーの第2の複数の対立遺伝子の一覧を受信する；第1および第2の複数の対立遺伝子の一覧を処理して、第1の複数の対立遺伝子と第2の複数の対立遺伝子との間で1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を同定する；データベースに問い合わせ、1つまたは複数の gRNA が、第2の複数の対立遺伝子の1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるか否かを決定する

10

20

30

40

50

；データベースからの1つまたは複数のgRNAが、1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるという決定に応じて、好適であることが判明した1つまたは複数のgRNAを同定するgRNAのリストを作成する；gRNAのリストをランク付けする；ならびにgRNAのランク付けリストを表示する。

【0098】

さらに、処理装置による実行の命令を保存する非一時的コンピューター可読記憶媒体も提供され、命令の実行によって、処理装置はスキーマに従いデータベースを作成し、スキーマは、以下を規定する：HLA対立遺伝子に関するデータを保存する対立遺伝子テーブル；gRNAに関するデータを保存するgRNAテーブル；対立遺伝子テーブルの記録とgRNAテーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子gRNAリレーションテーブル（ここで、対立遺伝子テーブルは、対立遺伝子gRNAリレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、gRNAテーブルは、対立遺伝子gRNAリレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する）；ハプロタイプに関するデータを保存するハプロタイプテーブル（ここで、対立遺伝子テーブルは、ハプロタイプテーブルと1対多のリレーションシップを有する）；系統情報に関するデータを保存する系統テーブル；ハプロタイプテーブルの記録と系統テーブルの記録とのリレーションシップを保存する系統ハプロタイプリレーションテーブル（ここで、ハプロタイプテーブルは、系統ハプロタイプリレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、系統テーブルは、系統ハプロタイプリレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する）；複数の系統内に発生する対立遺伝子の頻度に関するデータを保存する対立遺伝子頻度テーブル（ここで、対立遺伝子テーブルは、対立遺伝子頻度テーブルと1対多のリレーションシップを有する）；ならびに対立遺伝子頻度テーブルの記録と系統テーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子系統リレーションテーブル（ここで、対立遺伝子頻度テーブルは、対立遺伝子系統リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、系統テーブルは、対立遺伝子系統リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する）。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

（項目1）

免疫適合性血球を生成する方法であって、以下：

第1の対立遺伝子特異的修飾gRNA分子およびCas9分子と血球を接触させて、前記第1対立遺伝子特異的修飾gRNA分子および前記Cas9分子を、内在性免疫原性遺伝子の第1の対立遺伝子と結合させ、

これにより、前記内在性免疫原性遺伝子の第1の対立遺伝子を修飾して、前記免疫適合性血球を生成するステップ

を含む方法。

（項目2）

血球中の内在性免疫原性遺伝子を修飾する方法であって、以下：

データベーススキーマを用いて、第1の対立遺伝子特異的gRNA分子を選択するステップ、ならびに

前記第1の対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子と前記血球を接触させて、前記対立遺伝子特異的gRNA分子および前記Cas9分子を、内在性免疫原性遺伝子の第1の対立遺伝子と結合させ、これにより、前記内在性免疫原性遺伝子の第1の対立遺伝子を修飾するステップ

を含む方法。

（項目3）

血球中の内在性免疫原性遺伝子の第1の対立遺伝子の前記細胞表面発現を低減する方法であって、以下：

第1の対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子と前記血球を接触させて、前記対立遺伝子特異的gRNA分子および前記Cas9分子を、前記内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子と結合させ、

これにより、前記内在性免疫原性遺伝子の第1の対立遺伝子の前記細胞表面発現を低減するステップを含む方法。

(項目4)

ハプロタイプ修飾血球を対象に移植する方法であって、以下：

内在性免疫原性遺伝子に第1ハプロタイプを有する第1の対象から血球を単離するステップ、

第1対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子と前記血球を接触させて、前記第1対立遺伝子特異的gRNA分子を、内在性免疫原性遺伝子の第1対立遺伝子と結合させ、これにより、前記内在性免疫原性遺伝子の第1の対立遺伝子を修飾するステップ、ならびに

内在性免疫原性遺伝子に第2ハプロタイプを有する第2の対象に前記血球を移入するステップ

を含む方法。

(項目5)

対立遺伝子特異的遺伝子修飾を有する細胞の集団を含む組成物を製造する生体外の方法であって、以下：

対立遺伝子特異的gRNA分子およびCas9分子と細胞の集団を接触させて、前記対立遺伝子特異的gRNA分子および前記Cas9分子を、同定可能な遺伝子産物をコードする遺伝子の単一对立遺伝子と結合させるステップ；ならびに

前記同定可能な遺伝子産物を発現するが、前記第1対立遺伝子は発現しない細胞を富化するステップ

を含む方法。

(項目6)

前記細胞の集団が、血球の集団である、項目5に記載の方法。

(項目7)

前記血球が、造血幹／前駆細胞(HSC)である、項目6に記載の方法。

(項目8)

前記細胞の集団が、循環血球の集団、動員血球の集団、骨髓細胞の集団、骨髓系前駆細胞の集団、リンパ球系前駆細胞の集団、リンパ球の集団、複能性前駆細胞の集団、系列特異的前駆細胞の集団、内皮細胞の集団、もしくは間葉系間質細胞の集団、またはこれらの組合せからなる群から選択される、項目5～7のいずれか1項に記載の方法。

(項目9)

前記血球が、幹細胞である、項目1～4のいずれか1項に記載の方法。

(項目10)

前記幹細胞が、造血幹／前駆細胞(HSC)である、項目4に記載の方法。

(項目11)

前記細胞が、循環血球、動員血球、骨髓細胞、骨髓系前駆細胞、リンパ球系前駆細胞、リンパ球、複能性前駆細胞、系列特異的前駆細胞、内皮細胞、または間葉系間質細胞からなる群から選択される、項目1～4、9および10のいずれか1項に記載の方法。

(項目12)

前記gRNA分子が、修飾gRNA分子である、項目2～11のいずれか1項に記載の方法。

(項目13)

前記gRNA分子が、ヒト白血球抗原(HLA)遺伝子中の標的ドメインと相補的である標的化ドメインを含む、項目1～12のいずれか1項に記載の方法。

(項目14)

前記HLA遺伝子が、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、HLA-DQ、およびHLA-DPからなる群から選択される、項目13に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 5)

前記細胞、または細胞の集団を、第 2 の g R N A 分子と接触させるステップをさらに含み、ここで、前記第 2 の g R N A 分子は、表 1 6 に記載される遺伝子を標的化する、項目 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6)

前記第 2 の g R N A 分子が、修飾 g R N A 分子である、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記細胞を第 2 の C a s 9 分子と接触させるステップをさらに含む、項目 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 8)

前記 C a s 9 分子が、酵素的に活性な C a s 9 (e a C a s 9) 分子である、項目 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 9)

前記 e a C a s 9 分子が、前記内在性免疫原性遺伝子内に一本鎖切断を生成する、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記 e a C a s 9 分子が、前記内在性免疫原性遺伝子内に二本鎖切断を生成する、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記 C a s 9 分子が、野生型 C a s 9 、 C a s 9 ニッカーゼ、不活性型 C a s 9 (d C a s 9) 、分割型 C a s 9 、および誘導性 C a s 9 からなる群から選択される、項目 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記 C a s 9 分子が、N 末端 R u v C 様ドメイン切断活性を含むが、H N H 様ドメイン切断活性は含まない、項目 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 3)

前記 C a s 9 分子が、ストレプトコッカス・ピオゲネス (S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s) C a s 9 のアミノ酸位置 N 8 6 3 に対応するアミノ酸位置にアミノ酸突然変異を含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記 C a s 9 分子が、H N H 様ドメイン切断活性を含むが、N 末端 R u v C 様ドメイン切断活性は含まない、項目 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 5)

前記 C a s 9 分子が、ストレプトコッカス・ピオゲネス (S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s) C a s 9 のアミノ酸位置 D 1 0 に対応するアミノ酸位置にアミノ酸突然変異を含む、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

前記 C a s 9 分子が、C a s 9 ポリペプチドである、項目 1 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 7)

前記 C a s 9 ポリペプチドが、スタフィロコッカス・アウレウス (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s) C a s 9 ポリペプチドである、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記 C a s 9 ポリペプチドが、ストレプトコッカス・ピオゲネス (S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s) C a s 9 ポリペプチドである、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記 g R N A 分子と前記 C a s 9 ポリペプチドが、事前に形成されたりボヌクレオチド複合体中で結合されている、項目 2 6 ～ 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 0)

前記 C a s 9 分子が、C a s 9 ポリペプチドをコードする核酸である、項目 1 ～ 2 5 の

10

20

30

40

50

いずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 1)

前記修飾 gRNA 分子が、5' 末端キャップ構造を含む、項目 1 または 1 2 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 2)

前記 5' 末端キャップ構造が、3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G 抗リバースキャップアナログ (ARCA) である、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記修飾 gRNA 分子が、3' 末端ポリ-A テールを含む、項目 1 または 1 2 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 4)

前記細胞、または前記細胞の集団をテンプレート核酸と接触させるステップをさらに含む、項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 5)

前記テンプレート核酸が、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) である、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記テンプレート核酸が、アデノ関連ウイルス (AAV) または組込み欠陥レンチウイルス (ILDV) を用いて、細胞、または細胞の集団に送達される、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記 ssODN が、5' ホスホロチオエート修飾を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記 ssODN が、3' ホスホロチオエート修飾を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記 ssODN が、5' ホスホロチオエート修飾と 3' ホスホロチオエート修飾を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記細胞、または前記細胞の集団をトランスジーンと接触させるステップをさらに含み、ここで、前記接触ステップは、前記トランスジーンが、前記細胞の前記ゲノム、または前記細胞の集団の細胞に組み込まれることを可能にする条件下で行う、項目 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 1)

前記トランスジーンが、免疫同一ヒト白血球抗原 (HLA) をコードする遺伝子、化学療法選択マーカー、細胞表面抗原、または自殺遺伝子である遺伝子である、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記トランスジーンが、HLA 遺伝子またはその断片である、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記 HLA 遺伝子が、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-A-DRB3/4/5、HLA-DQ、および HLA-DP からなる群から選択される、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記細胞、または前記細胞の集団を eiCas9 分子と接触させるステップをさらに含む、項目 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記 eiCas9 を転写レプレッサーまたは転写アクチベーターと融合させる、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記細胞が、細胞の集団を含む、項目 1 ~ 4、および 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方

10

20

30

40

50

法。

(項目 4 7)

前記対立遺伝子特異的抗体を用いて、前記細胞の集団を選別することにより、1 遺伝子の特定の対立遺伝子を発現する細胞を選択するステップをさらに含む、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記遺伝子が、免疫原性遺伝子である、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記細胞の集団が、蛍光活性化細胞選別 (FACS) または免疫原性マイクロビーズ媒介性細胞選別によって選別される、項目 4 7 または項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記内在性免疫原性遺伝子に第 1 ハプロタイプを有する第 1 の対象から前記血球を単離するステップをさらに含む、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 1)

前記接触ステップ後に、前記内在性免疫原性遺伝子に第 2 ハプロタイプを有する第 2 の対象に前記血球を移入するステップをさらに含む、項目 1 ~ 4 または 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記接触ステップ後に、生体外で前記細胞または細胞の集団を拡大するステップをさらに含む、項目 1 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 3)

T 細胞補充療法をさらに含む、項目 1 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 4)

前記ハプロタイプ修飾血球が、ドナーとレシピエントの細胞間のマッチングの増大に基づく第 2 の対象による拒絶の低い尤度、ならびに混合リンパ球または白血球反応アッセイにより決定される低い免疫原性を有する、項目 4 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記ハプロタイプ修飾血球が、前記第 2 の対象により拒絶されない、項目 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記遺伝子を発現するが、前記第 1 対立遺伝子は発現しない細胞を富化する前記ステップが、フローサイトメトリーによって前記細胞を選別するステップを含む、項目 5 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記遺伝子を発現するが、前記第 1 対立遺伝子は発現しない細胞を富化する前記ステップが、前記遺伝子の第 1 対立遺伝子によりコードされる前記同定可能な遺伝子産物の第 1 変異体と特異的に結合する第 1 抗体および前記同定可能な産物の第 2 変異体と結合する第 2 抗体と、前記複数の細胞の各々を接触させるステップを含む、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記同定可能な遺伝子産物が、細胞表面マーカーである、項目 5、5 6、または 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 9)

前記同定可能な遺伝子産物が、ヒト白血球抗原 (HLA) である、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記遺伝子の第 1 対立遺伝子が、前記同定可能な遺伝子産物の非機能性変異体をコードする、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記遺伝子を発現するが、前記第 1 対立遺伝子は発現しない細胞を富化する前記ステップが、前記複数の細胞の各細胞において、前記同定可能な遺伝子産物の機能性変異体と結

10

20

30

40

50

合した物質またはシグナルを検出するステップを含む、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記細胞または細胞の集団が、一次血球または一次血球の集団である、項目 1 ～ 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 3)

項目 1 ～ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法により製造される組成物。

(項目 6 4)

薬剤として使用するための項目 6 3 に記載の組成物。

(項目 6 5)

移植に使用するための項目 6 3 に記載の組成物。

(項目 6 6)

項目 1 ～ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法により改変される細胞または細胞の集団。

(項目 6 7)

項目 6 6 に記載の細胞または細胞の集団を含む医薬組成物。

(項目 6 8)

対象の疾患を治療または予防する方法であって、修飾細胞または項目 1 ～ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法により改変された細胞を前記対象に投与するステップを含む方法。

(項目 6 9)

内在性免疫原性遺伝子の第 1 対立遺伝子に修飾を含む血球であって、前記血球が、第 1 対立遺伝子特異的修飾 gRNA 分子および Cas9 分子と接触している血球。

(項目 7 0)

内在性免疫原性遺伝子の第 1 対立遺伝子に修飾を含む血球の集団であって、前記血球の集団が、第 1 対立遺伝子特異的修飾 gRNA 分子および Cas9 分子と接触している血球の集団。

(項目 7 1)

前記免疫原性遺伝子が、ヒト白血球抗原 (HLA) 遺伝子である、項目 6 9 に記載の血球、または項目 7 0 に記載の血球の集団。

(項目 7 2)

データベーススキームを用いて、第 1 対立遺伝子特異的 gRNA 分子を選択するステップをさらに含む、項目 1 または 3 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7 3)

データベーススキームを用いて、前記第 1 対立遺伝子特異的 gRNA 分子を選択するステップが、以下：

コンピューターシステムのインターフェースを介して、第 1 の対象の前記内在性免疫原性遺伝子の第 1 の複数の対立遺伝子の一覧を受信するステップ；

前記コンピューターシステムのインターフェースを介して、第 2 の対象の前記内在性免疫原性遺伝子の第 2 の複数の対立遺伝子の一覧を受信するステップ；

前記第 1 および第 2 の複数の対立遺伝子の一覧を処理して、前記第 1 の複数の対立遺伝子と第 2 の複数の対立遺伝子との間で 1 つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を同定するステップ；

1 つまたは複数の gRNA 分子が、前記第 2 の複数の対立遺伝子の前記 1 つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるか否かを決定するためにデータベースに問い合わせるステップ；

前記データベースからの 1 つまたは複数の gRNA 分子が、前記 1 つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるという決定に応じて、好適であることが判明した前記 1 つまたは複数の gRNA 分子を同定する gRNA 分子のリストを作成するステップ；

gRNA 分子のリストをランク付けするステップ；ならびに

前記 gRNA 分子のランク付けリストを表示するステップ

を含む、項目 2 または項目 7 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 7 4)

データベーススキーマをインプリメントするための処理装置による実行の命令を保存する非一時的コンピューター可読記憶媒体であって、前記データスキーマが、以下：

主要HLA対立遺伝子に関するデータを保存する対立遺伝子テーブル；

gRNAに関するデータを保存するgRNAテーブル；

前記対立遺伝子テーブルの記録と前記gRNAテーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子－gRNA－リレーションテーブルであって、ここで、前記対立遺伝子テーブルは、前記対立遺伝子－gRNA－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、前記gRNAテーブルは、前記対立遺伝子－gRNA－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する、テーブル；

ハプロタイプに関するデータを保存するハプロタイプテーブルであって、ここで、前記対立遺伝子テーブルは、前記ハプロタイプテーブルと1対多のリレーションシップを有する、テーブル；

複数の系統内で発生するハプロタイプの頻度に関するデータを保存するハプロタイプ－頻度テーブルであって、ここで、前記ハプロタイプテーブルは、前記ハプロタイプ－頻度テーブルと1対1のリレーションシップを有する、テーブル；

系統に関するデータを保存する系統テーブル；

前記ハプロタイプ－頻度テーブルの記録と前記系統テーブルの記録とのリレーションシップを保存する系統－ハプロタイプ－リレーションテーブルであって、ここで、前記ハプロタイプ－頻度テーブルは、前記系統－ハプロタイプ－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、前記系統テーブルは、前記系統－ハプロタイプ－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する、テーブル；

複数の系統内で発生する対立遺伝子の頻度に関するデータを保存する対立遺伝子頻度テーブルであって、ここで、前記対立遺伝子テーブルは、前記対立遺伝子頻度テーブルと1対1のリレーションシップを有する、テーブル；ならびに

前記対立遺伝子頻度テーブルの記録と前記系統テーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子系統リレーションテーブルであって、ここで、前記対立遺伝子頻度テーブルは、前記対立遺伝子－系統－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、前記系統テーブルは、前記対立遺伝子－系統－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有するテーブル

を含む、非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目 7 5)

前記データスキーマが、以下：

マイナー組織適合性抗原に関するデータを保存するマイナー－抗原テーブル；および

マイナー組織適合性抗原に対するHLA制限に関するデータを保存する主要－マイナー－制限テーブルをさらに含み、前記マイナー－抗原テーブルは、前記主要－マイナー－制限テーブルと1対多のリレーションシップを有し、前記対立遺伝子テーブルは、前記主要－マイナー－制限テーブルと1対多のリレーションシップを有する、項目 7 4に記載の非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目 7 6)

前記対立遺伝子テーブルが、対立遺伝子idキー、対立遺伝子属性、遺伝子名属性、および対立遺伝子配列属性を含む、項目 7 4に記載の非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目 7 7)

前記gRNAテーブルが、gRNAidキー、Cas変異体属性、gRNA配列(PAMを含む)属性、gRNA配列(PAMを含まない)属性、鎖属性、直交性スコア属性、およびオフターゲットリスト情報属性を含む、項目 7 4に記載の非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目 7 8)

前記対立遺伝子－ガイド－リレーションテーブルが、リレーションidキー、前記対立遺伝子テーブルの対立遺伝子idキーに対応する対立遺伝子id属性、および前記gRNA

10

20

30

40

50

AテーブルのgRNA i dキーに対応するgRNA i d属性を含む、項目74に記載の非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目79)

前記ハプロタイプテーブルが、ハプロタイプ i dキー、HLA-A対立遺伝子属性、HLA-B対立遺伝子属性、HLA-C対立遺伝子属性、HLA-DRB1遺伝子座属性、HLA-DRB3/DRB4/DRB5遺伝子座属性、HLA-DQB1対立遺伝子遺伝子座属性を含む、項目74に記載の非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目80)

前記ハプロタイプ-頻度テーブルが、ハプロタイプ頻度 i dキー、前記ハプロタイプテーブルのハプロタイプ i dキーに対応するハプロタイプ i d属性、ヨーロッパ系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、ヨーロッパ系統群におけるハプロタイプ発生のランクの属性、アフリカ系アメリカ人系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、アフリカ系アメリカ人系統群におけるハプロタイプ発生のランクの属性、アジア系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、アジア系統群におけるハプロタイプ発生のランクの属性、ヒスパニック系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、ヒスパニック系統群におけるハプロタイプ発生のランクの属性、ユダヤ人系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、およびユダヤ人系統群におけるハプロタイプ発生のランクの属性を含む、項目74に記載の非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目81)

前記対立遺伝子-頻度テーブルが、対立遺伝子頻度 i dキー、前記対立遺伝子テーブルの対立遺伝子 i dキーに対応する対立遺伝子 i d属性、ヨーロッパ系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、ヨーロッパ系統群における対立遺伝子発生のランクの属性、アフリカ系アメリカ人系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、アフリカ系アメリカ人系統群における対立遺伝子発生のランクの属性、アジア系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、アジア系統群における対立遺伝子発生のランクの属性、ヒスパニック系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、ヒスパニック系統群における対立遺伝子発生のランクの属性、ユダヤ人系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、およびユダヤ人系統群における対立遺伝子発生のランクの属性を含む、項目74に記載の非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目82)

前記対立遺伝子-頻度テーブルが、前記対立遺伝子テーブルと依存リレーションシップを有し、前記対立遺伝子テーブルに完全に依存的である、項目74に記載の非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目83)

前記ハプロタイプ-頻度テーブルが、ハプロタイプテーブルと依存リレーションシップを有し、前記ハプロタイプテーブルに完全に依存的である、項目74に記載の非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目84)

前記gRNAが、HLA対立遺伝子を編集するために設計される、項目74に記載の非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目85)

前記ハプロタイプが、異なるHLA遺伝子の対立遺伝子群である、項目74に記載の非一時的コンピューター可読記憶媒体。

(項目86)

1つまたは複数の対立遺伝子を編集するためのgRNAを同定するコンピューターシステムを用いて実施される方法であって、以下：

前記コンピューターシステムのインターフェースを介して、標的化移植片レシピエントの第1の複数の対立遺伝子の一覧を受信するステップ；

前記コンピューターシステムのインターフェースを介して、標的化移植片ドナーの第2の複数の対立遺伝子の一覧を受信するステップ；

10

20

30

40

50

前記第1および第2の複数の対立遺伝子の一覧を処理して、前記第1の複数の対立遺伝子と前記第2の複数の対立遺伝子との間で1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を同定するステップ；

1つまたは複数のgRNA分子が、前記第2の複数の対立遺伝子の前記1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるか否かを決定するためにデータベースに問い合わせるステップ；

前記データベースからの1つまたは複数のgRNAが、前記1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるという決定に応じて、好適であることが判明した前記1つまたは複数のgRNAを同定するgRNAのリストを作成するステップ；

前記gRNAのリストをランク付けするステップ；ならびに

前記gRNAのランク付けリストを表示するステップを含む方法。

(項目87)

前記gRNAのリストからのgRNAが、前記標的化移植片ドナーの前記第2の複数の対立遺伝子からのミスマッチ対立遺伝子を編集して、前記第1の複数の対立遺伝子と前記第2の複数の対立遺伝子間でマッチする対立遺伝子の数を増加させることができる、項目86に記載の方法。

(項目88)

前記gRNAのリストからのgRNAが、1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集して、標的化移植片レシピエントに移植片対宿主病(GVHD)が発生する尤度を低減することができる、項目86に記載の方法。

(項目89)

前記第1の複数の対立遺伝子の各々について前記DNA配列を表示するステップをさらに含む、項目86に記載の方法。

(項目90)

前記データベースが、1つの人種群に発生する対立遺伝子の尤度を示す数を保存する、項目86に記載の方法。

(項目91)

1系統内の前記第1の複数の対立遺伝子の各々の発生頻度を表示するステップをさらに含む、項目86に記載の方法。

(項目92)

前記第1の複数の対立遺伝子の各々とマイナー組織適合性抗原との制限リレーションシップを表示するステップをさらに含む、項目86に記載の方法。

(項目93)

前記第1の複数の対立遺伝子が、前記標的化移植片レシピエントの母系遺伝性主要HLAハプロタイプであり、前記第2の複数の対立遺伝子が、前記標的化移植片ドナーの母系遺伝性主要HLAハプロタイプである、項目86に記載の方法。

(項目94)

前記第1の複数の対立遺伝子の一覧が、1つの対立遺伝子、2つの対立遺伝子、3つの対立遺伝子、4つの対立遺伝子、5つの対立遺伝子、6つの対立遺伝子、7つの対立遺伝子、または8つの対立遺伝子を含む、項目86に記載の方法。

(項目95)

前記第2の複数の対立遺伝子の一覧が、1つの対立遺伝子、2つの対立遺伝子、3つの対立遺伝子、4つの対立遺伝子、5つの対立遺伝子、6つの対立遺伝子、7つの対立遺伝子、または8つの対立遺伝子を含む、項目86に記載の方法。

(項目96)

前記gRNAのリストが、1つのミスマッチ対立遺伝子を編集するための1つのgRNAを同定する、項目86に記載の方法。

(項目97)

前記gRNAのリストが、2つ以上のミスマッチ対立遺伝子を編集するための2つ以上

10

20

30

40

50

の gRNA を同定する、項目 86 に記載の方法。

(項目 98)

前記 gRNA のリストが、2 つ以上のミスマッチ対立遺伝子を編集するための 1 つの gRNA を同定する、項目 86 に記載の方法。

(項目 99)

前記データベースが、項目 74 に記載のデータベーススキーマを用いてインプリメントされる、項目 86 に記載の方法。

(項目 100)

データベーススキーマをインプリメントするためのシステムであって、前記システムが、以下：

プロセッサ；および

データベーススキーマを保存するメモリを含み、このデータスキーマは、以下：

HLA 対立遺伝子に関するデータを保存する対立遺伝子テーブル；

gRNA に関するデータを保存する gRNA テーブル；

前記対立遺伝子テーブルの記録と前記 gRNA テーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子 gRNA リレーションテーブルであって、ここで、前記対立遺伝子テーブルは、前記対立遺伝子 gRNA リレーションテーブルと 1 対多のリレーションシップを有し、前記 gRNA テーブルは、対立遺伝子 gRNA リレーションテーブルと 1 対多のリレーションシップを有するテーブル；

ハプロタイプに関するデータを保存するハプロタイプテーブルであって、ここで、前記対立遺伝子テーブルは、前記ハプロタイプテーブルと 1 対多のリレーションシップを有する、テーブル；

系統情報に関するデータを保存する系統テーブル；

前記ハプロタイプテーブルの記録と前記系統テーブルの記録とのリレーションシップを保存する系統ハプロタイプリレーションテーブルであって、ここで、前記ハプロタイプテーブルは、前記系統ハプロタイプリレーションテーブルと 1 対多のリレーションシップを有し、前記系統テーブルは、前記系統ハプロタイプリレーションテーブルと 1 対多のリレーションシップを有する、テーブル；

複数の系統内に発生する対立遺伝子の頻度に関するデータを保存する対立遺伝子頻度テーブルであって、ここで、前記対立遺伝子テーブルは、前記対立遺伝子頻度テーブルと 1 対多のリレーションシップを有する、テーブル；ならびに

前記対立遺伝子頻度テーブルの記録と前記系統テーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子系統リレーションテーブルであって、ここで、前記対立遺伝子頻度テーブルは、前記対立遺伝子系統リレーションテーブルと 1 対多のリレーションシップを有し、前記系統テーブルは、前記対立遺伝子系統リレーションテーブルと 1 対多のリレーションシップを有する、テーブル

を含むシステム。

(項目 101)

1 つまたは複数の対立遺伝子を編集するための gRNA を同定するシステムであって、前記システムが、以下：

プロセッサ；および

命令を保存するメモリを含み、これらの命令は、実行されると以下：

標的化移植片レシピエントの第 1 の複数の対立遺伝子の一覧を受信すること；

標的化移植片ドナーの第 2 の複数の対立遺伝子の一覧を受信すること；

前記第 1 および第 2 の複数の対立遺伝子の一覧を処理して、前記第 1 の複数の対立遺伝子と前記第 2 の複数の対立遺伝子との間で 1 つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を同定すること；

データベースに問い合わせ、1 つまたは複数の gRNA 分子が、前記第 2 の複数の対立遺伝子の 1 つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるか否かを決定すること；

10

20

30

40

50

前記データベースからの1つまたは複数のgRNAが、1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるという決定に応じて、好適であることが判明した1つまたは複数のgRNAを同定するgRNAのリストを作成すること；

gRNAのリストをランク付けすること；ならびに

gRNAの前記ランク付けリストを表示すること

を前記プロセッサに行わせるシステム。

(項目102)

処理装置による実行の命令を保存する非一時的コンピューター可読記憶媒体であって、前記命令の実行によって、前記処理装置は、

前記スキーマに従いデータベースを作成し、前記スキーマは、以下：

HLA対立遺伝子に関するデータを保存する対立遺伝子テーブル；

gRNAに関するデータを保存するgRNAテーブル；

前記対立遺伝子テーブルの記録と前記gRNAテーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子gRNAリレーションテーブルであって、ここで、前記対立遺伝子テーブルは、前記対立遺伝子gRNAリレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、前記gRNAテーブルは、前記対立遺伝子gRNAリレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する、テーブル；

ハプロタイプに関するデータを保存するハプロタイプテーブルであって、ここで、前記対立遺伝子テーブルは、前記ハプロタイプテーブルと1対多のリレーションシップを有する、テーブル；

系統情報に関するデータを保存する系統テーブル；

前記ハプロタイプテーブルの記録と前記系統テーブルの記録とのリレーションシップの記録を保存する系統ハプロタイプリレーションテーブルであって、ここで、前記ハプロタイプテーブルは、前記系統ハプロタイプリレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、前記系統テーブルは、前記系統ハプロタイプリレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する、テーブル；

複数の系統内に発生する対立遺伝子の頻度に関するデータを保存する対立遺伝子頻度テーブルであって、ここで、前記対立遺伝子テーブルは、前記対立遺伝子頻度テーブルと1対多のリレーションシップを有する、テーブル；ならびに

前記対立遺伝子頻度テーブルの記録と前記系統テーブルの記録とのリレーションシップを保存する対立遺伝子系統リレーションテーブルであって、ここで、前記対立遺伝子頻度テーブルは、前記対立遺伝子系統リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、前記系統テーブルは、前記対立遺伝子系統リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する、テーブル

を規定する、非一時的コンピューター可読記憶媒体。

【図面の簡単な説明】

【0099】

【図1A】図1A-1Iは、いくつかの例示的なgRNAの描写である。図1Aは、部分的にストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) (S. ピオゲネス (*S. pyogenes*)) に由来する (または部分的に配列をモデルにしている)、モジュラーgRNA分子を二重鎖構造として描写する (それぞれ出現順に配列番号39および40)。

【図1B】図1A-1Iは、いくつかの例示的なgRNAの描写である。図1Bは、S. ピオゲネス (*S. pyogenes*) に部分的に由来する単分子gRNA分子を二重鎖構造として描写する (配列番号41)。

【図1C】図1A-1Iは、いくつかの例示的なgRNAの描写である。図1Cは、S. ピオゲネス (*S. pyogenes*) に部分的に由来する単分子gRNA分子を二重鎖構造として描写する (配列番号42)。

【図1D】図1A-1Iは、いくつかの例示的なgRNAの描写である。図1Dは、S. ピオゲネス (*S. pyogenes*) に部分的に由来する単分子gRNA分子を二重鎖構

10

20

30

40

50

造として描写する（配列番号43）。

【図1E】図1A-1Iは、いくつかの例示的なgRNAの描写である。図1Eは、*S. pyogenes*（*S. pyogenes*）に部分的に由来する単分子gRNA分子を二重鎖構造として描写する（配列番号44）。

【図1F】図1A-1Iは、いくつかの例示的なgRNAの描写である。図1Fは、*Streptococcus thermophilus*（*S. thermophilus*）（*S. thermophilus*）に部分的に由来するモジュラーgRNA分子を二重鎖構造として描写する（それぞれ出現順に配列番号45および46）。

【図1G】図1A-1Iは、いくつかの例示的なgRNAの描写である。図1Gは、*S. pyogenes*（*S. pyogenes*）および*S. thermophilus*（*S. thermophilus*）のモジュラーgRNA分子のアライメントを描写する（それぞれ出現順に配列番号39、45、47、および46）。

【図1H】図1A-1Iは、いくつかの例示的なgRNAの描写である。図1H-1Iは、単分子gRNA分子のさらに別の例示的な構造を描写する。図1Hは、*S. pyogenes*（*S. pyogenes*）に部分的に由来する単分子gRNA分子の例示的な構造を二重鎖構造として示す（配列番号42）。

【図1I】図1A-1Iは、いくつかの例示的なgRNAの描写である。図1H-1Iは、単分子gRNA分子のさらに別の例示的な構造を描写する。図1Iは、*S. aureus*（*S. aureus*）に部分的に由来する単分子gRNA分子の例示的な構造を二重鎖構造として示す（配列番号38）。

【図2A】図2A-Gは、Cas9配列（Chylinski 2013）のアライメントを描写する。N末端RuvC様ドメインは、枠内に「Y」で示される。他の2つのRuvC様ドメインは、枠内に「B」で示される。HNH様ドメインは、枠内に「G」で示される。Sm：*S. mutans*（*S. mutans*）（配列番号1）；Sp：*S. pyogenes*（*S. pyogenes*）（配列番号2）；St：*S. thermophilus*（*S. thermophilus*）（配列番号4）；Li：*L. innocua*（*L. innocua*）（配列番号5）。「モチーフ」（配列番号14）は、4つの配列に基づくコンセンサス配列である。4つ全ての配列に保存される残基は、一文字アミノ酸略号によって示され；「*」は、4つの配列のいずれかの対応する位置に見られる任意のアミノ酸を示し；「-」は、非存在を示す。

【図2B】図2A-Gは、Cas9配列（Chylinski 2013）のアライメントを描写する。N末端RuvC様ドメインは、枠内に「Y」で示される。他の2つのRuvC様ドメインは、枠内に「B」で示される。HNH様ドメインは、枠内に「G」で示される。Sm：*S. mutans*（*S. mutans*）（配列番号1）；Sp：*S. pyogenes*（*S. pyogenes*）（配列番号2）；St：*S. thermophilus*（*S. thermophilus*）（配列番号4）；Li：*L. innocua*（*L. innocua*）（配列番号5）。「モチーフ」（配列番号14）は、4つの配列に基づくコンセンサス配列である。4つ全ての配列に保存される残基は、一文字アミノ酸略号によって示され；「*」は、4つの配列のいずれかの対応する位置に見られる任意のアミノ酸を示し；「-」は、非存在を示す。

【図2C】図2A-Gは、Cas9配列（Chylinski 2013）のアライメントを描写する。N末端RuvC様ドメインは、枠内に「Y」で示される。他の2つのRuvC様ドメインは、枠内に「B」で示される。HNH様ドメインは、枠内に「G」で示される。Sm：*S. mutans*（*S. mutans*）（配列番号1）；Sp：*S. pyogenes*（*S. pyogenes*）（配列番号2）；St：*S. thermophilus*（*S. thermophilus*）（配列番号4）；Li：*L. innocua*（*L. innocua*）（配列番号5）。「モチーフ」（配列番号14）は、4つの配列に基づくコンセンサス配列である。4つ全ての配列に保存される残基は、一文字アミノ酸略号によって示され；「*」は、4つの配列のいずれかの対応する位置に見られる任意のアミノ酸を示し；「-」は

10

20

30

40

50

、非存在を示す。

【図2D】図2A-Gは、Cas9配列 (Chylinski 2013) のアライメントを描写する。N末端RuvC様ドメインは、枠内に「Y」で示される。他の2つのRuvC様ドメインは、枠内に「B」で示される。HNH様ドメインは、枠内に「G」で示される。Sm: S. ミュータンス (S. mutans) (配列番号1); Sp: S. ピオゲネス (S. pyogenes) (配列番号2); St: S. サーモフィルス (S. thermophilus) (配列番号4); Li: L. イノキュア (L. innocua) (配列番号5)。「モチーフ」(配列番号14)は、4つの配列に基づくコンセンサス配列である。4つ全ての配列に保存される残基は、一文字アミノ酸略号によって示され;「*」は、4つの配列のいずれかの対応する位置に見られる任意のアミノ酸を示し;「-」は、非存在を示す。

10

【図2E】図2A-Gは、Cas9配列 (Chylinski 2013) のアライメントを描写する。N末端RuvC様ドメインは、枠内に「Y」で示される。他の2つのRuvC様ドメインは、枠内に「B」で示される。HNH様ドメインは、枠内に「G」で示される。Sm: S. ミュータンス (S. mutans) (配列番号1); Sp: S. ピオゲネス (S. pyogenes) (配列番号2); St: S. サーモフィルス (S. thermophilus) (配列番号4); Li: L. イノキュア (L. innocua) (配列番号5)。「モチーフ」(配列番号14)は、4つの配列に基づくコンセンサス配列である。4つ全ての配列に保存される残基は、一文字アミノ酸略号によって示され;「*」は、4つの配列のいずれかの対応する位置に見られる任意のアミノ酸を示し;「-」は、非存在を示す。

20

【図2F】図2A-Gは、Cas9配列 (Chylinski 2013) のアライメントを描写する。N末端RuvC様ドメインは、枠内に「Y」で示される。他の2つのRuvC様ドメインは、枠内に「B」で示される。HNH様ドメインは、枠内に「G」で示される。Sm: S. ミュータンス (S. mutans) (配列番号1); Sp: S. ピオゲネス (S. pyogenes) (配列番号2); St: S. サーモフィルス (S. thermophilus) (配列番号4); Li: L. イノキュア (L. innocua) (配列番号5)。「モチーフ」(配列番号14)は、4つの配列に基づくコンセンサス配列である。4つ全ての配列に保存される残基は、一文字アミノ酸略号によって示され;「*」は、4つの配列のいずれかの対応する位置に見られる任意のアミノ酸を示し;「-」は、非存在を示す。

30

【図2G】図2A-Gは、Cas9配列 (Chylinski 2013) のアライメントを描写する。N末端RuvC様ドメインは、枠内に「Y」で示される。他の2つのRuvC様ドメインは、枠内に「B」で示される。HNH様ドメインは、枠内に「G」で示される。Sm: S. ミュータンス (S. mutans) (配列番号1); Sp: S. ピオゲネス (S. pyogenes) (配列番号2); St: S. サーモフィルス (S. thermophilus) (配列番号4); Li: L. イノキュア (L. innocua) (配列番号5)。「モチーフ」(配列番号14)は、4つの配列に基づくコンセンサス配列である。4つ全ての配列に保存される残基は、一文字アミノ酸略号によって示され;「*」は、4つの配列のいずれかの対応する位置に見られる任意のアミノ酸を示し;「-」は、非存在を示す。

40

【図3A】図3A-Bは、Chylinski 2013に開示されるCas9分子からのN末端RuvC様ドメインのアライメントを示す(配列番号52~95、120~123)。図3Bの最後の行は、4つの高度に保存された残基を特定する。

【図3B】図3A-Bは、Chylinski 2013に開示されるCas9分子からのN末端RuvC様ドメインのアライメントを示す(配列番号52~95、120~123)。図3Bの最後の行は、4つの高度に保存された残基を特定する。

【図4A】図4A-Bは、配列外れ値を除外して、Chylinski 2013に開示されるCas9分子からのN末端RuvC様ドメインのアライメントを示す(配列番号52~123)。図4Bの最後の行は、3つの高度に保存された残基を特定する。

50

【図4B】図4A～Bは、配列外れ値を除外して、Chylinski 2013に開示されるCas9分子からのN末端RuvC様ドメインのアライメントを示す（配列番号52～123）。図4Bの最後の行は、3つの高度に保存された残基を特定する。

【図5A】図5A～Cは、Chylinski 2013に開示されるCas9分子からのHNH様ドメインのアライメントを示す（配列番号124～198）。図5Cの最後行は、保存残基を特定する。

【図5B】図5A～Cは、Chylinski 2013に開示されるCas9分子からのHNH様ドメインのアライメントを示す（配列番号124～198）。図5Cの最後行は、保存残基を特定する。

【図5C】図5A～Cは、Chylinski 2013に開示されるCas9分子からのHNH様ドメインのアライメントを示す（配列番号124～198）。図5Cの最後行は、保存残基を特定する。

10

【図6A】図6A～Bは、配列外れ値を除外して、Chylinski 2013に開示されるCas9分子からのHNH様ドメインのアライメントを示す（配列番号124～141、148、149、151～153、162、163、166～174、177～187、194～198）。図6Bの最後の行は、3つの高度に保存された残基を特定する。

【図6B】図6A～Bは、配列外れ値を除外して、Chylinski 2013に開示されるCas9分子からのHNH様ドメインのアライメントを示す（配列番号124～141、148、149、151～153、162、163、166～174、177～187、194～198）。図6Bの最後の行は、3つの高度に保存された残基を特定する。

20

【図7】例示的なgRNA配列（配列番号42）を用いたgRNAドメイン用語を説明する。

【図8】S. アウレウス (S. aureus) gRNAおよびS. アウレウス (S. aureus) Cas9の送達後のCCR5遺伝子座でのインデルの検出を描写する。

【図9】組み合わせたCas9mRNA (S. ピオゲネス (S. pyogenes) (Sp) またはS. アウレウス (S. aureus) Sa Cas9のいずれか) を伴う表示のキャップ／テールなしgRNAまたはキャップ／テール付加gRNAによる電気穿孔後のCD34⁺細胞数増加の動力学を描写する。

【図10】組み合わせたCas9mRNA (S. ピオゲネス (S. pyogenes) (Sp) またはS. アウレウス (S. aureus) Sa Cas9のいずれか) を伴う表示のキャップ／テールなしgRNAまたはキャップ／テール付加gRNAによる電気穿孔から72時間後の総生存CD34⁺細胞の倍率変化を描写する。

30

【図11】キャップおよびテール付加AAVS1gRNAおよびCas9mRNAによる電気穿孔後の生存（ヨウ化プロピジウム陰性）ヒトCD34⁺細胞の維持を示す代表的なフローサイトメトリーデータを描写する。

【図12】キャップおよびテールなしAAVS1gRNAと比較して、キャップおよびテール付加AAVS1gRNAとCas9mRNAの送達後のCD34⁺細胞中に検出された挿入／欠失（インデル）のパーセンテージならびに標的化AAVS1遺伝子座でのそれらの造血コロニー形成細胞（CFC）子孫を描写する。

【図13】キャップ／テール付加AAVS1gRNAによる編集後のCD34⁺細胞における造血コロニー形成能（CFC）の維持を描写する。キャップ／テールなしAAVS1gRNAで電気穿孔された細胞のCFC能力の喪失に留意されたい。

40

【図14A】K562赤白血病細胞株中の効率的な標的化遺伝子座編集（%インデル）を描写し、ヒト赤白血病細胞株は、S. ピオゲネス (S. pyogenes) Cas9mRNAまたはリボ核タンパク質（RNP）と共にキャップおよびテール付加HBBgRNAの送達後に、HSPCと同様の特性を有する。

【図14B】ヒト臍帯血CD34⁺細胞における表示標的化遺伝子座（AAVS1、HBB、CXCR4）でのCas9媒介性／キャップおよびテール付加gRNA媒介性編集（%インデル）を描写する。右：Cas9mRNAおよびキャップおよびテール付加HBB（配列番号217）による電気穿孔後の臍帯血CD34⁺細胞のCFC能力（非電気穿孔

50

対照または2もしくは10 μ g HBB gRNAで電気穿孔された細胞)。細胞は、Cas9 mRNAまたは2もしくは10 μ gのgRNAで電気穿孔された。

【図14C】2 μ gまたは10 μ gのキャップ／テール付加HBB gRNAで電気穿孔された細胞についてのCFCアッセイを描写する。CFC：コロニー形成細胞、GEMM：混合造血コロニー顆粒球－赤血球－マクロファージ単球、E：赤血球コロニー、GM：顆粒球－マクロファージコロニー、G：顆粒球コロニー。

【図15A】キャップおよびテール付加AAVS1、HBB、またはCXCR4 gRNAおよびS.ピオゲネス (S. pyogenes) Cas9 mRNAの送達から72時間後の臍帯血CD34⁺細胞における表示の遺伝子座での切断を示す代表的なゲル画像 (T7E1分析) を描写する。この例示ゲルは、図14Bに示す要約データと対応する。

【図15B】7-AADおよびアネキシンVでの共染色およびフローサイトメトリー分析により決定される、Cas9 mRNAおよび表示のgRNAの送達から48時間後のCB CD34⁺細胞における細胞生存能力を示す。

【図16A】図16A～16Bは、ドナー細胞における単一HLA-A対立遺伝子を破壊するためのCas9および単一gRNAの標的化と、レシピエント対立遺伝子によるHLA-A対立遺伝子の置換を描写する。図16Aは、A、B、およびDRB1遺伝子座でのドナーおよびレシピエントHLA対立遺伝子を示す。この実施例では、造血幹細胞移植片を必要とするアフリカ系アメリカ人レシピエント対象には、完全にマッチするドナーがない。6対立遺伝子のうち5つがマッチするヨーロッパ系アメリカ人ドナーが同定されている。このミスマッチ対立遺伝子の発現を排除するために、HLA-A対立遺伝子A*02:01:01:01に特異的なCas9およびgRNAがドナーHSPCに送達される。次に、レシピエントと6のうちの6 (全マッチ) を達成するために、レシピエントHLA-A対立遺伝子A*01:01:01:01のcDNAがドナーHSPCに導入される。ミスマッチ対立遺伝子は、陰影の付いた枠内に示される。ドナーにおいてCas9/gRNAによる破壊のために標的化される対立遺伝子は、黒い枠内に示され、レシピエントcDNA置換は、グレーの枠内の対立遺伝子により示される。

【図16B】図16A～16Bは、ドナー細胞における単一HLA-A対立遺伝子を破壊するためのCas9および単一gRNAの標的化と、レシピエント対立遺伝子によるHLA-A対立遺伝子の置換を描写する。図16Bは、トランスジーン発現カセット内でコードされ、ミスマッチドナーHLA-A対立遺伝子を同一のレシピエントHLA-A対立遺伝子で置換するために、HLA-A*02:01:01:01破壊細胞に送達される、HLA-A*01:01:01:01のcDNA配列 (配列番号362) を示す。

【図17A】図17A～17Bは、ドナー細胞におけるHLA-A遺伝子座の両アレル破壊のためのCas9/gRNAの標的化と、レシピエント対立遺伝子によるHLA-Aの置換を描写する。図17Aは、A、B、およびDRB1遺伝子座でのドナーおよびレシピエントHLA対立遺伝子を示す。この実施例では、造血幹細胞移植片を必要とするヒスパニック系レシピエント対象には、完全にマッチするドナーがない。ドナー候補とレシピエントの間で6対立遺伝子のうち4つがマッチするヨーロッパ系アメリカ人HSPCドナーが同定されている。これらのミスマッチHLA-A対立遺伝子の両方の発現を排除するために、A*02:01:01:01およびA*29:02:01:01対立遺伝子の両方を同時に標的化するCas9および単一gRNAがドナーHSPCに送達される。次に、ドナーとレシピエントの間で6のうちの6 (全マッチ) を達成するために、レシピエントHLA-A対立遺伝子A*01:01:01:01およびA*23:01:01:01のcDNAがドナーHSPCに送達される。ミスマッチ対立遺伝子は、陰影の付いた枠内に示される。ドナーにおいてCas9/gRNAによる破壊のために標的化される対立遺伝子は、黒い枠内に示され、破壊された対立遺伝子を置換するレシピエントcDNAは、グレーのボックスにより示される。

【図17B】図17A～17Bは、ドナー細胞におけるHLA-A遺伝子座の両アレル破壊のためのCas9/gRNAの標的化と、レシピエント対立遺伝子によるHLA-Aの置換を描写する。図17Bは、トランスジーン発現カセット内でコードされ、ミスマッチ

10

20

30

40

50

ドナーHLA-A対立遺伝子を同一のレシピエントHLA-A対立遺伝子で置換するために、HLA-A^{-/-}破壊細胞に送達される、HLA-A*23:01:01:01のcDNA配列（配列番号363）を示す。HLA-A*01:01:01:01配列（前の実施例で示す、パネルB）もHLA-A^{-/-}ドナー細胞に送達される。

【図18A】図18A-18Bは、ドナー細胞におけるハプロタイプ（HLA-A、-B、-DRB1）の多重編集および標的化破壊のためのCas9/gRNAの標的化と、レシピエント対立遺伝子による置換を描写する。図18Aは、A、B、およびDRB1遺伝子座でのドナーおよびレシピエントHLA対立遺伝子を示す。この実施例では、造血幹細胞移植片を必要とするヒスパニック系レシピエント対象には、完全にマッチするドナーがない。ハプロが同一のヨーロッパ系アメリカ人HSPCドナーが同定されている。非マッチハプロタイプの発現を排除するために、3つのMHC遺伝子座（A*02:01:01:01、B*08:01:01、およびDRB1*03:01:01:0101）の対立遺伝子を標的化するCas9および3つのgRNAがドナーHSPCに送達される。次に、ドナーとレシピエントの間で6のうちの6（全マッチ）を達成するために、レシピエントハプロタイプA*03:01:01:01、B*07:02:01、DRB1*15:01:01:01のcDNAがドナーHSPCに送達される。ミスマッチ対立遺伝子は、陰影の付いた枠内に示される。ドナーにおいてCas9/gRNAによる破壊のために標的化される対立遺伝子は、黒い枠内に示され、破壊された対立遺伝子を置換するレシピエントcDNAは、グレーの枠内に示される。

【図18B】図18A-18Bは、ドナー細胞におけるハプロタイプ（HLA-A、-B、-DRB1）の多重編集および標的化破壊のためのCas9/gRNAの標的化と、レシピエント対立遺伝子による置換を描写する。図18Bは、同一レシピエントハプロタイプ（A*03:01:01:01 1098bp（配列番号364）；B*07:02:01 1089bp（配列番号365）；DRB1*15:01:01:01 801bp（配列番号366））によるミスマッチドナーハプロタイプの置換のためのcDNA配列を示す。

【図19A】5'-ARCAキャップおよび3'ポリA[20A]テールを含む異なるHLA-A*26:01対立遺伝子特異的修飾gRNA分子と複合体化したS.ピオゲネス（S. pyogenes）Cas9タンパク質の電気穿孔後にHLAタイピングされたヒト臍帯血HSCドナー由来の一次CD4⁺Tリンパ球における総遺伝子編集頻度（T7E1エンドヌクレアーゼ分析により検出される）を示す。HLA-A遺伝子座の標的化対立遺伝子は、チャート上部に太字で示される。

【図19B】5'-ARCAキャップおよび3'ポリA[20A]テールを含む異なるHLA-A*26:01対立遺伝子特異的修飾gRNA分子と複合体化したS.ピオゲネス（S. pyogenes）Cas9タンパク質の電気穿孔後にHLAタイピングされたヒト臍帯血HSCドナー由来の一次CD8⁺Tリンパ球における総遺伝子編集頻度（T7E1エンドヌクレアーゼ分析により検出される）を示す。

【図20A】5'-ARCAキャップおよび3'ポリA[20A]テールを含む異なるHLA-A*07:02:01対立遺伝子特異的修飾gRNA分子と複合体化したS.ピオゲネス（S. pyogenes）Cas9タンパク質の電気穿孔後の一次CD4⁺Tリンパ球における総遺伝子編集頻度（T7E1エンドヌクレアーゼ分析により検出される）を示す。HLA-B遺伝子座の標的化対立遺伝子は、チャート上部に太字で示される。

【図20B】5'-ARCAキャップおよび3'ポリA[20A]テールを含む異なるHLA-A*07:02対立遺伝子特異的修飾gRNA分子と複合体化したS.ピオゲネス（S. pyogenes）Cas9タンパク質の電気穿孔後にフローサイトメトリー分析により決定される、一次CD4⁺Tリンパ球におけるHLA-Bタンパク質発現の総ノックダウンを示す。HLA-B遺伝子座の標的化対立遺伝子は、チャート上部に太字で示される。HLA-B発現のノックダウンパーセントは、次の式：（負の対照中の%HLA-B⁺-実験サンプル中の%HLA-B）／負の対照中の%HLA-B⁺により計算した。例えば、HLA-B_5101:（（98.9%HLA-B⁺-32.8%HLA-B⁺）／

98.9%HLA-B⁺)=HLA-Bの66.8%ノックダウン。

【図20C】HLA-B07:02対立遺伝子特異的抗体を用いて、5'-ARCAキャップおよび3'ポリA[20A]テールを含む異なるHLA-B07:02対立遺伝子特異的修飾gRNA分子と複合体化したS.ピオゲネス(S. pyogenes) Cas9タンパク質の電気穿孔後の一次CD4⁺Tリンパ球におけるHLA-Bタンパク質発現を検出するフローサイトメトリー分析を示す。HLA-Bの細胞表面発現と比較するために、細胞の100%近くがHLA-Bを発現することが予想される同じドナー(負の対照)由来の非処理対照(非編集)細胞と、蛍光標識HLA-B抗体で染色されていない同じドナー由来の細胞(従って、0%HLA-B⁺(抗体なし))を使用して、HLA-B⁺細胞のためのゲートを設定した(上の2パネル)。表示したgRNAと共にCas9RNPで処理した細胞を各フローサイトメトリードットプロットの上部に示す。

10

【図21】5'-ARCAキャップおよび3'ポリA[20A]テールを含む異なるHLA-DRB1 04:02対立遺伝子特異的修飾gRNA分子と複合体化したS.ピオゲネス(S. pyogenes) Cas9タンパク質の電気穿孔後の一次CD4⁺Tリンパ球における総遺伝子編集頻度(T7E1エンドヌクレアーゼ分析により検出される)を示す。HLA-A遺伝子座の標的化対立遺伝子は、チャート上部に太字で示される。

【図22A】5'-ARCAキャップおよび3'ポリA[20A]テールを含む異なるHLA-A26:01対立遺伝子特異的修飾gRNA分子と複合体化したS.ピオゲネス(S. pyogenes) Cas9タンパク質の電気穿孔後の一次CD4⁺Tリンパ球における総遺伝子編集頻度(DNA配列解析により検出される)を示す。HLA-A遺伝子座の標的化対立遺伝子(HLA-A2)は、チャート上部に太字で示される。HLA-A2発現のノックダウンパーセントは、次の式:(負の対照中の%HLA-A201⁺-実験サンプル中の%HLA-A2)/負の対照中の%HLA-A2⁺により計算した。例えば、HLA-A201__1:(96.1%HLA-A2⁺-6.85%HLA-A2⁺)/96.1%HLA-A2⁺)=HLA-A2の92.9%ノックダウン。

20

【図22B】5'-ARCAキャップおよび3'ポリA[20A]テールを含む異なるHLA-A2対立遺伝子特異的修飾gRNA分子と複合体化したS.ピオゲネス(S. pyogenes) Cas9タンパク質の電気穿孔後の一次CD4⁺Tリンパ球におけるHLA-A2対立遺伝子タンパク質発現のフローサイトメトリー分析を示す。HLA-A0201の細胞表面発現と比較するために、細胞の100%近くがHLA-A2を発現することが予想される同じドナー由来の非処理対照(非編集)細胞(負の対照)と、蛍光標識HLA-A2抗体で染色されていない同じドナー由来の細胞(従って、0%HLA-A2⁺(抗体なし))を使用して、HLA-A2⁺細胞のためのゲートを設定した(上の2パネル)。

30

【図23】5'-ARCAキャップおよび3'ポリA[20A]テールを含む異なるHLA-A2対立遺伝子特異的修飾gRNA分子と複合体化したS.ピオゲネス(S. pyogenes) Cas9タンパク質の電気穿孔後の一次CD4⁺Tリンパ球におけるHLA-A2対立遺伝子および総MHCクラスI(対立遺伝子特異的ではなく、HLA-A、-B、-Cの共通エピトープを検出する)タンパク質発現のフローサイトメトリー分析を示す。MHCクラスIとHLA-A2について二重陽性であった細胞(フローサイトメトリープロットの象限[Q]2、すなわちQ2に入るもの(例えば、HLA-A__0201__1RNRで処理された細胞の7.14%)は、クラスIおよびHLA-A2対立遺伝子特異的遺伝子発現の両方を維持した。MHCクラスIについて単一陽性であり、HLA-A2については陰性の細胞(フローサイトメトリープロットのQ1に入るもの(例えば、HLA-A__0201__1RNRで処理された細胞の91.4%)は、HLA-A2対立遺伝子を除くMHCクラスI抗原を維持した(例えば、その対立遺伝子を標的化する遺伝子編集後のHLA-A2のタンパク質発現を喪失した)。

40

【図24】例示的な実施形態に従う、モジュールにインプリメントされたgRNA同定システムを示すブロック図である。

【図25】例示的な実施形態に従う、対立遺伝子を編集するためのgRNAを同定する例

50

示的な方法を示すフローチャートである。

【図 2 6】例示的な実施形態に従う、gRNA をランク付けする例示的な方法を示すフローチャートである。

【図 2 7 A】例示的な実施形態に従う、gRNA 同定システムのための例示的なデータベーススキーマを高レベルで示す。

【図 2 7 B】例示的な実施形態に従う、gRNA 同定システムのための例示的なデータベーススキーマを詳細に示す。

【図 2 7 C】例示的な実施形態に従う、gRNA 同定システムのための例示的なデータベーススキーマを詳細に示す。

【図 2 8 A】例示的な実施形態に従う、gRNA 同定システムへの例示的な対立遺伝子入力を示す。

10

【図 2 8 B】例示的な実施形態に従う、gRNA 同定システムへの例示的な対立遺伝子入力を示す。

【図 2 8 C】例示的な実施形態に従う、gRNA 同定システムへの例示的な対立遺伝子入力を示す。

【図 2 9】例示的な実施形態に従う、gRNA 同定システムの出力としての例示的なクエリ／入力および例示的な gRNA リストを示す。

【図 3 0】例示的な実施形態に従う、gRNA 同定システムの出力としての例示的な対立遺伝子配列を示す。

【図 3 1 A】例示的な実施形態に従う、gRNA 同定システムの出力としての、米国民における様々な系統群の例示的なハプロタイプおよび対立遺伝子頻度を示す。

20

【図 3 1 B】例示的な実施形態に従う、gRNA 同定システムの出力としての、米国民における様々な系統群の例示的なハプロタイプおよび対立遺伝子頻度を示す。

【図 3 2】主要組織適合性複合体 (MHC) を考慮した例示的なマイナー組織適合性抗原 (miHAg) 制限を示す。

【図 3 3】例示的な実施形態に従う、gRNA 同定システムをインプリメントするためのシステムを描写するネットワーク図を示す。

【図 3 4】本明細書に記載される gRNA 同定システムの例示的な実施形態をインプリメントするために使用することができる例示的なコンピューター装置のブロック図である。

【発明を実施するための形態】

30

【0100】

定義

「標的ノックアウト位置」は、本明細書の用法では、例えば NHEJ 媒介性改変によって、改変されると、遺伝子または遺伝子座の不活性化、例えば、切断を引き起こす、遺伝子または遺伝子座、例えば、本明細書に記載される遺伝子または遺伝子座、例えば、ヒト白血球抗原 (HLA) 遺伝子または遺伝子座内の位置を指す。

【0101】

「標的ノックダウン位置」は、本明細書の用法では、例えば本明細書に記載される eiCas9 分子または eiCas9 融合物によって、標的化されると、遺伝子または遺伝子座からの機能性遺伝子産物の発現の低減または排除を引き起こす、遺伝子または遺伝子座、例えば、本明細書に記載される遺伝子または遺伝子座、例えば、ヒト白血球抗原 (HLA) 遺伝子または遺伝子座内の位置を指す。

40

【0102】

「標的ノックイン位置」は、本明細書の用法では、遺伝子または遺伝子座、例えば、本明細書に記載される遺伝子または遺伝子座、例えば、ヒト白血球抗原 (HLA) 遺伝子または遺伝子座の配列の挿入によって修飾されると、遺伝子または遺伝子座からの機能性遺伝子産物の発現をもたらす配列を指す。

【0103】

「標的位置」は、本明細書の用法では、本明細書に記載される通り、標的ノックアウト位置、標的ノックダウン位置、または標的ノックイン位置のいずれかを指す。

50

【0104】

「標準HDR」、または標準相同組換え修復は、本明細書の用法では、相同性核酸（例えば、内在性相同配列、例えば、姉妹染色分体、または外性核酸、例えば、テンプレート核酸）を用いてDNA損傷を修復するプロセスを指す。標準HDRは、典型的に、二本鎖切断に有意な切除が存在した場合に作用し、DNAの少なくとも一本鎖部分を形成する。正常細胞では、HDRは、典型的に、切断の認識、切断の安定化、切除、一本鎖DNAの安定化、DNAクロスオーバー中間体の形成、クロスオーバー中間体の分割、および結合などの一連のステップを含む。このプロセスには、RAD51およびBRCA2が必要であり、相同性核酸は、典型的には二本鎖である。

【0105】

「Alt-HDR」もしくは「代替HDR」、または代替相同組換え修復は、本明細書の用法では、相同性核酸（例えば、内在性相同配列、例えば、姉妹染色分体、または外性核酸、例えば、テンプレート核酸）を用いてDNA損傷を修復するプロセスを指す。Alt-HDRは、このプロセスが、標準HDRとは異なる経路を使用し、標準HDR媒介物質であるRAD51およびBRCA2により阻害することができる点で、標準HDRとは異なる。また、alt-HDRは、切断の修復に一本鎖またはニック相同性核酸を使用する。

【0106】

特に断りのない限り、用語「HDR」は、本明細書の用法では、標準HDRおよびalt-HDRを包含する。

【0107】

「非相同末端結合」または「NHEJ」は、本明細書の用法では、結合媒介性修復および／または非テンプレート媒介性修復を指し、このようなものとして、標準NHEJ（cNHEJ）、代替NHEJ（altNHEJ）、マイクロホモロジー媒介性末端結合（MMJ）、一本鎖アニーリング（SSA）、および合成依存的マイクロホモロジー媒介性末端結合（SD-MMJ）が挙げられる。

【0108】

「対立遺伝子」は、本明細書の用法では、染色体上の同じ位置を占めるDNAの遺伝子または非コード領域のいくつかの代替形態の1つを指す。

【0109】

「対立遺伝子特異的遺伝子修飾」は、本明細書の用法では、本明細書に記載されるヌクレアーゼ（例えば、Cas9分子）を用いて核酸を編集するプロセスを指し、ここで、ある特定の対立遺伝子が、特定の対立遺伝子を標的化するgRNA分子（すなわち、対立遺伝子特異的gRNA分子）によって、修飾のために標的化される。いくつかの実施形態では、gRNA分子は、優先的に特定の対立遺伝子を標的化する。

【0110】

「対立遺伝子特異的gRNA分子」は、本明細書の用法では、ヌクレアーゼ（例えば、Cas9分子）を特定の対立遺伝子に優先的に標的化させるgRNA分子を指す。

【0111】

「細胞表面発現」は、本明細書の用法では、細胞の細胞膜中でのポリペプチドの利用可能性を指す。いくつかの実施形態では、細胞膜発現は、遺伝子発現により調節される。いくつかの実施形態では、細胞表面発現は、翻訳後機構により調節される。

【0112】

「ドメイン」は、本明細書の用法では、タンパク質または核酸のセグメントを記述するために使用される。特に断りのない限り、ドメインは、いずれか特定の機能的特性を有する必要はない。

【0113】

「ドナー細胞」は、本明細書の用法では、対象に投与される非自己細胞（例えば、血球）を指す。

【0114】

「レシピエント細胞」は、本明細書の用法では、ドナー細胞が投与される対象からの細胞（例えば、血球）を指す。

【0115】

2つの配列間の相同性または配列同一性（用語は本明細書で同義的に使用される）の計算は、次のようにして実施される。これらの配列は、最適な比較を目的として整列され（例えば、最適アライメントのために、第1および第2のアミノ酸または核酸配列の片方または双方にギャップを挿入することができ、非相同配列は、比較のために無視することができる）。最適アライメントは、ギャップペナルティ12、ギャップ延長ペナルティ4、およびフレームシフトギャップペナルティ5のBlossum62スコアマトリックスを備えたGCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを使用して、最高スコアとして決定される。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置にある、アミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占有される場合、分子は、その位置において同一である。2つの配列間の同一性百分率は、これらの配列によって共有される同一の位置数の関数である。

【0116】

「支配gRNA分子」は、本明細書の用法では、細胞または対象に導入されたCRISPR/Casシステムの構成要素をコードする配列を含んでなる核酸上の標的ドメインと、相補的な標的化ドメインを含んでなる、gRNA分子を指す。支配gRNAは、内在性細胞または対象配列を標的化しない。一実施形態では、支配gRNA分子は、以下：（a）Cas9分子をコードする核酸上；（b）遺伝子（標的遺伝子gRNA）を標的化する標的化ドメインを含むgRNAをコードする核酸上；または、例えば（a）および（b）の双方などの、CRISPR/Cas構成要素をコードする2つ以上の核酸上の標的配列と相補的な標的化ドメインを含んでなる。一実施形態では、例えば、Cas9分子または標的遺伝子gRNAをコードするなどのCRISPR/Cas構成要素をコードする核酸分子は、支配gRNA標的化ドメインと相補的な2つ以上の標的ドメインを含んでなる。支配gRNA分子は、Cas9分子と複合体化し、例えば、切断によってまたは核酸との結合によって、標的化核酸のCas9媒介性不活性化がもたらされ、そのため、CRISPR/Casシステム構成要素の生成中断または低下が起こればと考えられる。一実施形態では、Cas9分子は、2つの複合体：Cas9分子と標的遺伝子gRNAとを含む複合体で、遺伝子を改変する複合体；およびCas9分子と支配gRNAとを含む複合体で、例えば、Cas9分子または標的遺伝子gRNA分子などのCRISPR/Casシステム構成要素のさらなる生成を妨げるように作用する複合体を形成する。一実施形態では、支配gRNA分子/Cas9分子複合体は、例えば、Cas9分子の転写領域、エクソン、またはイントロンをコードする配列である、Cas9分子をコードする配列と作動可能に連結するプロモーターなどの制御領域配列と結合するか、またはその切断を促進する。一実施形態では、支配gRNA分子/Cas9分子複合体は、例えば、gRNA分子と作動可能に連結するプロモーターの制御領域配列、またはgRNA分子をコードする配列などと結合するか、またはその切断を促進する。一実施形態では、例えば、Cas9標的化支配gRNA分子、または標的遺伝子gRNA標的化支配gRNA分子などの支配gRNAは、Cas9分子/標的遺伝子gRNA分子複合体媒介遺伝子標的化の効果を制限する。一実施形態では、支配gRNAは、Cas9分子/標的遺伝子gRNA分子複合体の活性に、時間的制限、発現レベル制限、またはその他の制限を課す。一実施形態では、支配gRNAは、オフターゲットまたはその他の望まれない活性を低下させる。一実施形態では、支配gRNA分子は、Cas9システムの構成要素の生成を阻害する、例えば、全体的にもしくは実質的に全体的に阻害することによってその活性を制限するか、またはそれを支配する。

【0117】

「ハプロタイプ」は、本明細書の用法では、ハプロイド遺伝子型、すなわち、1染色体上の異なる位置もしくは遺伝子座で見出される対立遺伝子またはDNA配列の組合せもし

10

20

30

40

50

くはセットを指し、これらは、典型的には1単位として受け継がれ、結合される。ハプロタイプは、個体の特徴的な遺伝子パターンを提供し得る。ハプロタイプは、1つの遺伝子座、いくつかの遺伝子座、または染色体全体について決定することができる。

【0118】

「ハプロタイプ修飾血球」は、本明細書の用法では、1つまたは複数の免疫原性遺伝子で遺伝子修飾されて、細胞のハプロタイプを改変する血球を指す。

【0119】

本明細書の用法では、用語「同定可能な遺伝子産物」は、当技術分野で周知の方法（例えば、FACS、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）など）を用いて検出することができるポリペプチドまたはペプチドを指す。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはペプチドは、1つまたは複数の翻訳後修飾を含む。いくつかの実施形態では、同定可能な遺伝子産物は、インタクトな細胞上または細胞中（例えば、細胞の表面上または細胞内部）で検出される。

【0120】

本明細書の用法では、「免疫原性」は、物質が対象（例えば、ヒト対象）に導入されると、その物質に、検出可能な免疫応答（体液または細胞）を誘導させる特性を指す。

【0121】

本明細書の用法では、用語「免疫原性遺伝子」は、主要組織適合性抗原複合体タンパク質またはマイナー組織適合性抗原（MiHA）をコードする遺伝子を指す。いくつかの実施形態では、免疫原性遺伝子は、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、HLA-DQB1、HLA-DP、およびHLA-DQからなる群から選択されるプロテインをコードする遺伝子である。

【0122】

本明細書の用法では、用語「免疫適合性血球」は、主要組織適合性抗原複合体タンパク質および／またはマイナー組織適合性抗原（MiHA）をコードする遺伝子の1つまたは複数の対立遺伝子を共有する血球を指す。いくつかの実施形態では、免疫適合性血球は、細胞が投与されるレシピエント対象と4つ以上のHLA対立遺伝子を共有する。いくつかの実施形態では、レシピエント対象への免疫適合性血球の投与は、レシピエント対象において免疫応答を誘導しない。

【0123】

本明細書の用法では、用語「混合リンパ球または白血球反応アッセイ」は、2つの同種異系リンパ球集団間で行われる細胞免疫アッセイ、または当業者には周知のいずれか他の類似アッセイを指す。アッセイは、末梢血、胸腺、リンパ節、または脾臓からの細胞を精製するステップ、および刺激細胞集団と共培養するステップを含む。T細胞も含む刺激細胞集団は、2方向混合リンパ球反応物と呼ばれる。刺激細胞集団は、応答細胞の存在下で複製する。1方向混合リンパ球反応物の場合、刺激細胞は、照射、または細胞複製を妨げるDNA架橋剤であるミトマイシンCでの処理によって複製が妨げられる。最大の測定可能な細胞増殖は、5～7日前後で起こる。混合リンパ球または白血球反応アッセイは、T細胞機能のインビトロでの相関をもたらす。こうしたアッセイは、当業者にはよく知られている。例えば、Lindemann, 2014, Tissue Antigens, 84:439; Olerup and Zetterquist, 1992, Tissue Antigens, 39:225を参照されたい。

【0124】

「修飾gRNA分子」または「修飾gRNA」は、本明細書の用法では、細胞に導入された後の非修飾gRNA分子と比較して、細胞に導入された後に向上した半減期を有するgRNA分子を指す。一実施形態では、修飾gRNA分子は、細胞がgRNA分子に曝露された（例えば、電気穿孔された）とき、その細胞における自然免疫応答を活性化しない。一実施形態では、修飾gRNA分子は、同型の細胞が非修飾gRNA分子に曝露された際の細胞の自然免疫応答と比較して、細胞がgRNA分子に曝露されたとき、低い自然免疫応答をその細胞で活性化する。別の実施形態では、修飾gRNA分子は、細胞がgRNA

10

20

30

40

50

A分子に曝露されたとき、その細胞において、プログラム細胞死経路（例えば、アポトーシス細胞死経路、壊死細胞死経路（例えば、壊死細胞死経路）、オートファジー細胞死経路、アポネクロシス細胞死経路、フェロトーシス細胞死経路、エリプトトーシス細胞死経路、アポネクロシス細胞死経路、またはアノイキス細胞死経路）を活性化しない。いくつかの実施形態では、修飾 gRNA 分子は、カスパーゼ依存的細胞死経路を活性化しない。別の実施形態では、修飾 gRNA 分子は、カスパーゼ非依存的細胞死経路を活性化しない。

【0125】

一実施形態では、修飾 gRNA 分子は、5'末端修飾を含む。一実施形態では、5'末端修飾は、以下：G(5')ppp(5')G キャップアナログ、m7G(5')ppp(5')G キャップアナログ、または 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G 抗リバースキャップアナログ (ARCA) からなる群から選択される。一実施形態では、5'末端修飾は、ホスホロチオエート修飾である。一実施形態では、gRNA 分子は、3'末端修飾を含む。一実施形態では、3'末端修飾は、ポリアデニンテールである。一実施形態では、3'末端修飾は、ホスホロチオエート修飾である。

【0126】

「テンプレート核酸」は、本明細書の用法では、標的位置の構造を改変するために、Cas9 分子および gRNA 分子と一緒に使用することができる核酸配列を指す。一実施形態では、標的核酸は、典型的には切断部位もしくはその付近で、テンプレート核酸の配列の一部または全部を有するように修飾されている。一実施形態では、テンプレート核酸は、一本鎖である。別の実施形態では、テンプレート核酸は、二本鎖である。一実施形態では、テンプレート核酸は、DNA、例えば、二本鎖 DNA である。別の実施形態では、テンプレート核酸は、一本鎖 DNA である。一実施形態では、テンプレート核酸は、RNA、例えば、二本鎖 RNA または一本鎖 RNA である。一実施形態では、テンプレート核酸は、Cas9 および gRNA と同じベクター骨格、例えば、AAV ゲノム、プラスミド DNA にコードされる。一実施形態では、テンプレート核酸は、ベクター骨格から生体内で切除され、例えば、これは、gRNA 認識配列によってランキングされる。一実施形態では、テンプレート DNA は、ILDV 中にある。一実施形態では、テンプレート核酸は、外性核酸配列である。別の実施形態では、テンプレート核酸配列は、内在性核酸配列、例えば、内在性相同性領域である。一実施形態では、テンプレート核酸は、核酸配列のプラス鎖に対応する一本鎖オリゴヌクレオチドである。別の実施形態では、テンプレート核酸は、核酸配列のマイナス鎖に対応する一本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0127】

「モジュレーター」は、本明細書の用法では、対象分子または遺伝子配列の活性（例えば、酵素活性、転写活性、もしくは翻訳活性）、量、分布、または構造を改変し得る実体、例えば、薬物を指す。一実施形態では、モジュレーション（調節）は、共有もしくは非共有結合の切断、例えば破断、または対象分子との共有もしくは非共有結合、例えば 1 部分の結合の形成を含む。一実施形態では、モジュレーターは、対象分子の 3 次元、二次、三次、または四次構造を改変する。モジュレーターは、対象活性を増大、低減、開始、または排除する。

【0128】

「大分子」は、本明細書の用法では、少なくとも 2、3、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または 100 kDa の分子量を有する分子を指す。大分子としては、タンパク質、ポリペプチド、核酸、生物製剤、および炭水化物が挙げられる。

【0129】

「ポリペプチド」は、本明細書の用法では、100 個未満のアミノ酸残基を有するアミノ酸のポリマーを指す。一実施形態では、それは、50、20、または 10 個未満のアミノ酸残基を有する。

【0130】

10

20

30

40

50

「多型」は、本明細書の用法では、対立遺伝子変異体を指す。多型は、1つまたは複数の一塩基多型、ならびに配列長さ多型を含んでもよい。多型は、別の対立遺伝子と比較して、1対立遺伝子での1つまたは複数のヌクレオチド置換に起因するか、または核酸における挿入もしくは欠失、重複、逆位およびその他の改変に起因し得る。

【0131】

例えば、参照Cas9分子または参照gRNAなどの「参照分子」は、本明細書の用法では、例えば、修飾または候補Cas9分子などである、対象gRNA分子の対象Cas9分子などの対象分子が、それに対して比較される分子を指す。例えば、Cas9分子は、参照Cas9分子の10%以下のヌクレアーゼ活性を有するものとして特徴付けられ得る。参照Cas9分子の例としては、例えば、S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. アウレウス (S. aureus) またはS. サーモフィルス (S. thermophilus) のCas9分子などである、天然起源Cas9分子などの天然起源未修飾Cas9分子が挙げられる。一実施形態では、参照Cas9分子は、それが比較されるCas9分子と、最も近い配列同一性または相同性を有する天然起源Cas9分子である。一実施形態では、参照Cas9分子は、例えば、変異などの変化がその上で起こった親形態である、天然起源または既知の配列などの配列である。

【0132】

「置換」または「交換された」は、分子修飾に関連する本明細書の用法では、プロセスの制限は必要でなく、置換実体が存在することを示すに過ぎない。

【0133】

「小分子」は、本明細書の用法では、例えば、約2kD未満、約1.5kD未満、約1kD未満、または約0.75kD未満などの約2kD未満の分子量を有する化合物を指す。

【0134】

「対象」は、本明細書の用法では、ヒトまたは非ヒト動物のどちらかを意味してもよい。この用語は、哺乳類（例えば、ヒト、その他の霊長類、ブタ、齧歯類（例えば、マウスおよびラットまたはハムスター）、ウサギ、モルモット、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ヒツジ、およびヤギ）を含むが、これに限定されるものではない。一実施形態では、対象はヒトである。別の実施形態では、対象は家禽である。本明細書の用法では、対象は、対象が当該民族の者として自己同定する（もしくは、系統を同定する）場合、または第三者支払人、例えば、保険会社、政府機関、または医療供給者、例えば、治療医師もしくは遺伝子カウンセラーが、対象を、選択された民族（もしくは、その系統）の者であると同定する場合、選択された民族の者である。一実施形態では、対象は、混合系統であり、第1の民族由来のハプロタイプおよび第2の民族由来のハプロタイプを有する。

【0135】

「治療する (treat)」、「治療する (こと) (treating)」、および「治療 (treatment)」は、本明細書の用法では、哺乳動物、例えば、ヒトにおける疾患の治療を意味し、(a) 疾患を阻害し、すなわち、その発生を停止または予防し；(b) 疾患を緩和し、すなわち、病態の退縮を引き起こし；および(c) 疾患を治療させることを含む。

【0136】

「遺伝子変換」は、本明細書の用法では、テンプレート核酸として内在性核酸、例えば、姉妹染色分体またはプラスミドを用いて、相同組換え (HDR) によりDNA損傷を修復するプロセスを指す。BRCA1、BRCA2および/またはRAD51が、遺伝子変換に関与している。いくつかの実施形態では、内在性核酸は、DNA損傷または突然変異の部位に近いDNAの断片と相同性、例えば、有意な相同性を有する核酸配列である。いくつかの実施形態では、テンプレートは、外性核酸ではない。

【0137】

「遺伝子修正」は、本明細書の用法では、外性核酸、例えば、供与体テンプレート核酸を用いた相同組換えによりDNA損傷を修復するプロセスを指す。いくつかの実施形態では、外性核酸は、一本鎖である。いくつかの実施形態では、外性核酸は、二本鎖である。

【0138】

「遺伝子修飾」は、本明細書の用法では、本明細書に記載されるCRISPR/Cas9システムを用いて、核酸を編集するプロセスを指す。特定の実施形態では、遺伝子修飾は、遺伝子修正を含む。特定の実施形態では、遺伝子修飾は、遺伝子変換を含む。

【0139】

「予防する」、「予防する（こと）」および「予防」は、本明細書の用法では、哺乳動物、例えば、ヒトにおける疾患の予防を意味し、（a）疾患を回避または排除すること；（2）疾患に対する素因に影響を与えること、例えば、疾患の少なくとも1つの症状を予防するか、または疾患の少なくとも1つの症状の発症を遅らせることを含む。

【0140】

「X」は、アミノ酸配列に関して本明細書で使用される場合、特に断りのない限り、任意のアミノ酸（例えば、20の天然アミノ酸のいずれか）を指す。

【0141】

HLA発現プロフィールを改変するための細胞の操作

移植片対宿主病（GVHD）に関連するリスクおよび潜在的に生命を脅かす合併症のために、後天性、悪性、および遺伝性血液疾患の治療のための移植（例えば、アローHSC T）の有用性が制限されている。アフリカ系統の人は、骨髄および臍帯血HSPCバンクの両方で少数しか存在せず、しかも、独特のハプロタイプとMHC遺伝子座での特異なヘテロ接合型を有するために、その民族共同体（例えば、SCD）に高い頻度で発生する疾患の治療のために、ライフ・キュアリング（life-curing）アローHSC Tを利用することが制限され得る。本明細書に記載される通り、CRISPR/Cas9関連の方法および組成物の使用によって、ドナー細胞が、対象（レシピエント）HLA遺伝子座と好適にまたは十分にマッチし、これにより、そうでなければHLAがマッチするドナーがいない対象の疾患の治療を目的とする移植（例えば、アローHSC T）のための好適なドナーを生み出すように、免疫原性遺伝子適合（例えば、HLA適合）を増大するためのドナー細胞（例えば、HSPC）における1つまたは複数の免疫原性遺伝子遺伝子座（例えば、HLA遺伝子座）の改変が可能になる。

【0142】

同種異系T細胞活性化は、宿主およびドナー抗原提示細胞（APC）上に提示されるレシピエント抗原の提示によって誘導される。外来抗原としてT細胞に提示されるミスマッチHLAタンパク質は、このアロー免疫応答を活性化する。HLAは、ヒト染色体6上に位置する主要組織適合性複合体（MHC）の一部としてコードされる。MHC適合は、GVHDの発生、強度、および重症度を決定する重要な因子である。ヒトHLAは、主要組織適合性複合体（MHC）抗原とマイナー組織適合性抗原（MiHA）にさらに分類することができる。例えば、MHC HLA-A、HLA-B、HLA-C、およびHLA-DRB1遺伝子座でのミスマッチ対立遺伝子の程度が、GVHDの発生および重症度に直接関係する。また、ドナーとレシピエントの性別の違い、輸血歴（例えば、不一致HLAへの曝露の繰り返しによる同種抗体の産生）、ならびにMiHAミスマッチなど、その他の因子もGVHD病因に寄与し得る。

【0143】

MHC遺伝子は、クラスIとクラスIIにさらに分類することができる。HLA-A、-B、および-Cを含むMHCクラスIは、全ての体細胞の表面上に発現される。MHCクラスI受容体は、可変 α 鎖と対合する定常 β 鎖（染色体11上にコードされる β_2m ）から構成される。クラスI抗原は、細胞内ペプチド（非移植条件では、ウイルスタンパク質であるが、アローHSC Tの場合には、これらは、外来物として認識される宿主細胞タンパク質を提示する）をCD8 T細胞に提示して、細胞傷害性リンパ球活性化および宿主細胞の殺傷（急性GVHDを引き起こす）を誘導する。対照的に、クラスII抗原（例えば、HLA-DR、-DQ、-DP）は、細胞外由来の抗原をCD4 T細胞に提示し、一般的にプロフェッショナル抗原提示細胞（APC、例えば、樹状細胞、マクロファージ）上に発現されて、宿主抗原に対するB細胞媒介性応答を駆動するためにCD4 T細胞ヘル

10

20

30

40

50

プを活性化する。他のクラスIIとレシピエントHLA(DQ、DP)間のミスマッチも、GVHDに役割を果たし得るが、クラスIHLA-A、-B、-C、およびクラスIIHLA-DRB1と比較すれば低い程度である。

【0144】

MHC遺伝子座の対立遺伝子多様性は、極めて多種の抗原の提示を可能にし、これにより、様々な潜在的病原体に対する包括的な免疫を提供する。MHC遺伝子は、メンデルの法則に従いハプロタイプとして遺伝され、各遺伝子の両対立遺伝子は、共優性的に発現される。子供は各々、その親からの同じHLAハプロタイプを遺伝する25%の可能性を有する。アロ-HSCT対象をGVHDの発生から防御するために、移植片センターは、クラスI(HLA-A、HLA-B、HLA-C)およびクラスIIHLA-DRB1遺伝子座での適合を要求する。成体型骨髄が細胞起源であるアロ-HSCTの適合基準は、HLA-DQB1が含まれる場合、7/8、または9/10のいずれかである(Dehn J, et al. Biol. Blood Marrow Transplant. 2015; 21(1): 137-141)。臍帯血HSCTでは、要求されるドナーとレシピエント間の適合度はより低く、最低限の適合要求は4/6遺伝子座(HLA-A、-B、-DRB1)である。

【0145】

臨床結果に対するミスマッチの影響

マッチする非血縁ドナー(MUD)からの移植(例えば、HSCT)は、ドナーとレシピエントのマイナー組織適合性抗原(MiHA)間の反応性のために、依然としてGVHDを招き得る。ドナーとレシピエントが、6つのHLA抗原(HLA-A、-B、-DR遺伝子座の両対立遺伝子によりコードされる)のうちの1つでミスマッチであれば、急性GVHDの発生は65%であり、こうした対象における死亡率は、50%である。さらに、MHC遺伝子座での1つのミスマッチが、GVHDのリスクを大幅に増加し得る。白血病対象におけるアロ-HSCTの研究では、1抗原ミスマッチ血縁ドナー細胞(MMRD)の移植後のアロ-HSCT後の臨床結果(無病生存期間および全生存期間)は、マッチ非血縁ドナー(MUD)アロ-HSCTからの結果と同等であるとみなされた(Valcarcel D, et al. Biol. Blood Marrow Transplant. 2011; 17(5): 640-648)。MUD HSPCを移植した対象は、より高い慢性(c)GVHDの発生率を有し、これは、クオリティオブライフに全体的にマイナスの影響をもたらす。別の研究では、ミスマッチ非血縁ドナーHSPC(クラスI対立遺伝子でミスマッチ)のレシピエントは、より高いGVHD発生率および移植片関連死亡率を有した(Hauzenberger D, et al. Tissue Antigens. 2008; 72(6): 549-558)。

【0146】

より高度に発現されるMHC遺伝子座(HEL)に加えて、HLA-DRB3/4/5、DQ(例えば、DQB1)、およびDPを含む低発現遺伝子座(LEL)でのミスマッチも、GVHDの発生率および重症度に影響を与える。HELでマッチする対象の場合、LELミスマッチは、有害な結果に寄与しなかった(Fernandez-Vina MA, et al. Blood. 2013; 121(22): 4603-4610)。しかし、7/8HELを有する対象の場合には、HLA-DRB1でのミスマッチは、LELでの複数のミスマッチを伴った。しかし、7/8HELを有する対象の場合、HLA-DRB1でのミスマッチは、LELで複数のミスマッチを伴った。7/8HELでマッチしたが、3つ以上のLELも検出されたドナーHSPCを移植された対象の場合、これらの対象でLELがミスマッチし、こうした対象におけるGVHDは、1つのLELミスマッチが検出された7/8HELマッチドナーHSPCを移植された対象と比較して、高い死亡率を伴った。総合すると、これらの知見は、HELおよびLELの双方で完全にマッチする血縁ドナーが、移植(例えば、アロ-HSCT)関連GVHDのリスクおよび重症度を低減し得ることを示している。

【0147】

マッチするドナーを見出す統計学

マッチする同胞ドナーを有する対象の確率は、3%前後であり、マッチする非同胞マッチ家族メンバーを有する対象の確率は、10%近い (Ottinger H, et al. Bone Marrow Transplant. 1994; 14 Suppl 4: S34-38)。骨髄および臍帯血バンクにおけるMUDの同定は70%近く、MUDを用いたときGVHDを発生するリスクは80%であり、こうした対象の50%近くがグレードIII~IVのGVHDを発生するが、それは致命的であり得る。非白色人種対象の場合、7/8~8/8マッチドナーを見出す確率は、ヨーロッパ系アメリカ人 (例えば、白色人種) 系統の人と比較して低い。全米骨髄バンク (National Marrow Donor Program) は、MUDが、白色人種の90%について同定され得るが、アジアまたはアフリカ系統の対象の場合には、7/8~8/8 MUDを見出す確率は、それぞれ70%~60%に減少する (Pidala J, et al. Blood. 2013; 122 (22): 3651-3658) と推定する。アフリカ系アメリカ人 (例えば、アフリカ系アメリカ人) の対象に関しては、血液学的健全性、疾患およびアンメットメディカルニーズは、骨髄および臍帯血バンク登録簿においてマッチするドナーを同定する確率が低いためであり、この集団における鎌状赤血球症 (SCD) の比較的高い発生率がさらに悪化させている。SCDは、米国において500人に1人または計1000人のアフリカ系アメリカ人誕生に発生し、この疾患には、100,000人のアメリカ人が罹患している (www.cdc.gov)。中央および西部アフリカにおいて、SCDの発生率がより高い。例えば、ナイジェリアでは、毎年45,000~90,000人の誕生にSCDが発生した (www.SickleCellDisease.org)。SCDは、鎌状赤血球突然変異が存在しないマッチドナー (血縁もしくは非血縁) からの骨髄HSC TまたはUCTを用いて治療させることができる。従って、生命を脅かす異常ヘモグロビン症障害の比較的高い発生率と、この疾患および他の血液系疾患を治療するために用いることができる好適なドナー細胞 (例えば、HSPC) を同定する課題の組合せが、アフリカ系統の対象におけるアンメットメディカルニーズを増大している (Dew A, et al. Biol. Blood Marrow Transplant. 2008; 14 (8): 938-941)。

【0148】

ヨーロッパ系アメリカ人とアフリカ系アメリカ人の間のMHC対立遺伝子の違い

MHC遺伝子がハプロタイプとして遺伝されること、ならびにMHC遺伝子座での高い多型度を考慮すると、共通するハプロタイプも、全く異なる系統のヒトの間で変動すると考えられる。全米骨髄バンク (National Marrow Donor Program) (NMDP) 登録簿に記録されたドナー (Dehn J, et al. Biol. Blood Marrow Transplant. 2015; 21 (1): 137-141) によれば、歴史的に、ヨーロッパ系アメリカ人は、8/8マッチ移植片の最も高い割合を有するのに対し、アフリカ系アメリカ人は、最も低い割合を有する。NMDPに登録した8百万人のうち、わずか7%がアフリカ系統である。さらに、混合遺伝子バックグラウンドを有する人は、さらにマッチするのが難しい。例えば、混合系統の対象は、アフリカ系アメリカ人に共通する父系ハプロタイプと、ヨーロッパ系アメリカ人に共通する母系ハプロタイプを保有し得る。双方の系統関連ハプロタイプを有するマッチ非血縁ドナーを見出すことはさらに困難である。NMDPによれば、より多様なバックグラウンドからのドナー候補の登録を奨励する目的で、供与方法に関して共同体に知らせるためのさらなる教育が必要とされる。今日まで、HLA多型に関するほとんどの研究は、限定的な遺伝子混合を有する集団に向けられていた。しかし、HLA多様性は、他の大陸からの継続的な移入により、北アメリカの方が顕著である。ある研究では、白人種 (例えば、ヨーロッパ系アメリカ人)、アジア系、ネイティブアメリカン、アフリカ系アメリカ人、およびラテンアメリカ人 (例えば、ヒスパニック系) をはじめとする、米国に住んでいる様々な非近交系群に関連する主要ハプロタイプを特性決定することが試みられた (Cao K, et al. Hum. Immunol. 2001; 62 (9): 1009-1030)。試験され

た群の間で、アフリカ系アメリカ人は、他の集団試験と比較して、全クラスⅠ遺伝子座で最大の異型接合性を示し、しかも、HLA-AおよびHLA-B対立遺伝子間の関連が弱い、または存在しなかった。さらに、アフリカ系統に関連する最も一般的なハプロタイプは、白人種系統に関連する最も一般的なハプロタイプとは異なった。これらの知見から、異なる民族間でのHLAマッチは、対象が非白人種の場合、好適なマッチまたはハプロが同一のドナーを同定する上で課題を呈することがわかる。近年、NMDPは、米国における様々な系統群に検出された最も頻度の高い対立遺伝子およびハプロタイプの最新記録を提供した(bioinformatics.bethematchclinical.org) Maier et al., Hum. Immunol. 2007; 68(9): 779-788からの論文の延長。これらの群には以下: ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系パシフィックアイランダー、およびヒスパニック系が含まれた。さらにユダヤ系統の人の共通対立遺伝子およびハプロタイプならびに以前の刊行物(Klitz et al., 2001, Tissue Antigens, 76(6): 442-58)からの最新版も入手可能である(bioinformatics.bethematchclinical.org)。

【0149】

表1は、米国民およびユダヤ系集団において検出された最も頻度の高い高解像度HLA-A対立遺伝子を記載する。表に示される各系統(例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系[パシフィックアイランダーを含む]、ヒスパニック系[ラテンアメリカ人]、およびユダヤ系統の人)について、最も頻度の高い対立遺伝子が、各列に示す系統群におけるその発生頻度(以前の刊行物(Maier et al., 2007, Human Immunology, 68: 779-788)からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髄バンクウェブサイト(The National Marrow Donor Program Website)(US): bioinformatics.bethematchclinical.orgから編集)に基づいてランク付けされる。ユダヤ系の高解像度HLA-A頻度は、以下: 全米骨髄バンクウェブサイト(National Marrow Donor Program Website)(US) URL: <https://bioinformatics.bethematchclinical.org>から得たものである。ユダヤ系集団についてのHLA-Aデータが、Hadassah Registry-Jerusalem, Israel(Klitz et al., 201, Tissue Antigens, 76(6): 442-58からのドナーサンプルから得られたものであることに留意されたい。使用されるアノテーション(例えば、HLA-Aについて0201gが示すのは、HLA-A*02:01と同じであり、これは、2010年のWHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、(HLA接頭辞)-遺伝子*対立遺伝子群/ファミリー: 具体的なHLAタンパク質を示す)ことに留意されたい。例えば、A*0201gは、A*02:01となる。この表に示す名称に関して、コード領域において同義DNA置換を示すのに用いられる分野(fields)、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない(さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい: hla.alleles.org)。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Maier, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子を指す。

【0150】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

ランク	表示集団中に検出された最も高頻度のHLA-A対立遺伝子				
	ヨーロッパ系 アメリカ人	アフリカ系 アメリカ人	アジア系 パシフィック アイランダー	ヒスパニック系	ユダヤ系
1	0201g	0201g	2402g	0201g	0101
2	0101g	2301g	1101g	2402g	0201
3	0301g	0301g	0201g	0301g	2402
4	2402g	3001	3303	0101g	2601
5	1101g	6802	0101g	3101	0301
6	2902	3002	0206	6801g	1101
7	3201	7401g	0207g	1101g	0205
8	2601g	0101g	2601g	2902	2301
9	6801g	3303	3101	0206	3201
10	3101	0202	0203	2301g	3001
11	2501	6801g	0301g	2601g	0302
12	2301g	2902	3001	3002	2901
13	3001	3402	6801g	3201	6802
14	3301	3601	2407	6802	3301
15	3002	2402g	3401	3001	6801
16	6802	3301	1102	3301	3002
17	0205	0205	2901g	0205	6901
18	0302	1101g	3201	6803	6601
19	6601	6601	0211g	3303	2403
20	2901g	2601g	2602	2501	2902
21	0206	3201	2403g	7401g	3101
22	3303	3101	0302	0202	3303
23	2403g	6602	2417	6901	2501
24	0202	8001	0205	6601	0202
25	6901	0102	3004	2901g	3004
26	3004	2501	2410	6805	0103
27	0217	6603	2301g	0217	7401
28	3402	3004	2420	3402	0206
29	2608	2901g	6901	0211g	3402
30	3305	2407	2902	0102	2407
31	1104	0302	2603	0204	0217
32	7403	7409	3405	3601	7403
33	0224	0260	0216	3004	8001

【 0 1 5 1 】

10

20

30

40

50

【表 2】

34	0230	7411	7401g	8001	0106
35	0103	2608	3301	2425	0222
36	0220	2417	0210	2403g	0211
37	0213	2403g	2408	0222	2612
38	1105	3401	0220	0302	0214
39	2426	2612	2501	3102	2910
40	2609	6901	3002	0220	3601
41	6825	6805	0202	3010	3010
42	0219	6815	1103	2422	0230
43	0116N	0222	0253N	6602	2449
44	3601	0214	3402	2608	0220
45	6803	2603	3112	0213	0203
46	2458	0220	6802	2426	6824
47	2407	0103	1119	2405	3401
48	7401g	0203	6601	2407	2608
49	1102	3603	0242	6807	0102
50	0305	3403	6803	3206	
51	0307	7403		0212	
52	0102	4301		0260	
53	3102	0274		2607	
54	2502	3104		2305	
55		0211g		3109	
56		0206		2414	
57		0213		1104	
58		0204		1105	
59		2305		0203	
60				3401	
61				0230	
62				2602	

【0152】

表 2 は、米国民およびユダヤ系集団において検出された最も頻度の高い高解像度 HLA-B 対立遺伝子を記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系 [パシフィックアイランダーを含む]、ヒスパニック系 [ラテンアメリカ人]、およびユダヤ系統の人）について、最も頻度の高い対立遺伝子が示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物（Maier et al., 2007, Human Immunology, 68:779-788）からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髄バンクウェブサイト（The National Marrow Donor Program Website）（US）：<https://bioinformatics.bethematchclinical.org> から編集）に基づいてランク付けされる。ユダヤ系の高解像度 HLA-A 頻度は、以下：全米骨髄バンクウェブサイト（National Marrow Donor Program Website）（US）URL：bioinformatics.bethematchclinical.org から得たものである。ユダヤ系集団についての HLA-B データが、Hadassah Registry-Jerusalem, Israel (Klitz et al., 201, Tissue Antigens, 76(6):442-58) からのドナーサンプルから得られたものであることに留意されたい。使用されるアノテーション（例えば、HLA-B について 0702g が示すのは、HLA-B*07:

02と同じであり、これは、2010年のWHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、(HLA接頭辞)－遺伝子＊対立遺伝子群／ファミリー：具体的なHLAタンパク質を示す)ことに留意されたい。例えば、B＊0702gは、B＊07：02となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義DNA置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない(さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい：hla.alleles.org)。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Mairers, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子群を指す。

【0153】

【表3】

表2

ランク	表示集団中に検出された最も高頻度のHLA-B対立遺伝子				
	ヨーロッパ系 アメリカ人	アフリカ系 アメリカ人	アジア系 パシフィック アイランダー	ヒスパニック系	ユダヤ系
1	0702g	5301	4001g	3501g	3801
2	0801g	0702g	5101g	4403	1801
3	4402g	3501g	4601	5101g	5201
4	1501g	1503g	5801g	0702g	3501
5	3501g	4201	3501g	4002g	3502
6	4001g	4403	4403	0801g	1402
7	4403	4501g	4006	1402	5101
8	1801g	5802	5201g	1801g	4101
9	5101g	0801g	3802	4402g	4402
10	5701	1801g	1502	1501g	4901
11	2705g	5801g	1501g	5201g	0801
12	1402	5703	5401	4901	5001
13	1302	1510	1301	3905	1302
14	3801	4901	4002g	4801g	4403
15	5501	1402	0702g	3906	0702
16	3503	5101g	3503	3801	3503
17	3701	4402g	1302	3512	0705
18	4901	8101g	5701	2705g	3508
19	3502	1516	4801g	3517	5501
20	4002g	5201g	0705g	1503g	5801
21	5201g	4001g	0801g	5301	1517
22	3901g	7801	5502	4501g	5701
23	1401	1501g	3701	5801g	5301
24	5001	1302	3901g	5001	4102
25	3906	5001	1801g	3503	1501
26	5601	1401	1518	4001g	3701
27	5801g	0705g	3505	4101	1503
28	4501g	4202	2705g	1302	4001

【0154】

【表 4】

29	3508	3910	5901	5701	2702
30	4101	4102	5601	3502	5108
31	4102	2705g	1535	5501	4002
32	5301	1517	4402g	3901g	4405
33	2702	3701	5001	3508	4501
34	1517	4101	2704	1401	5002
35	4405	5701	1511	3543g	5702
36	4701	5702	5102	1515	3901
37	0705g	3901g	1525	5703	2705
38	1518	5501	5501	1517	4006
39	1503g	4002g	1527	4201	5601
40	1507	3503	1517	3701	2707
41	4404	5704	3801	4102	5703
42	1803	1403	1521	4008	5107
43	5108	5601	1512g	4005	4801
44	4801g	2703	1401	5102	7301
45	5109	3906	1507	0705g	1401
46	0704	8201	1505	1510	4701
47	2707	3801	2706	1516	3906
48	3924	4701	5106	5802	1510
49	5702	4410	6701	3902	3910
50	1516	4012	4003	5601	1516
51	5703	1537	3502	4701	4201
52	3903	4103	4501g	1518	1518
53	5107	1518	3508	3514	3702
54	0710	3505	1513	4006	3924
55	7301	1502	1802	2702	2703
56	2714	5109	4803	8101g	1524
57	3512	3502	1508	3908	4804
58	1804	1531	4101	4011	1529
59	3905	0812	5604	4004	2712
60	5002	8202	5603	4202	1301
61	5105	1547	2707	1539	1508
62	4202	3508	1529	4405	1509
63	1510	1554	4901	1530	3555
64	0721	2706	3905	1504	1805
65	1514	1405	1402	3520	1531
66	0805	4703	5301	5108	4202
67	5802	1301	5107	7301	3704
68	3505	4405	5108	3505	1803
69	5119	4016	4804	3911	4702
70	5102	3543g	3909	7801	2709
71	1524	5102	8101g	3530	3802
72	1545	2702	1510	5002	1502
73	2709	4801g	4010	5107	3505

10

20

30

40

【 0 1 5 5 】

【表 5】

74	4702	1513	3915	4027	0747
75	3517	4802	2702	3522	4460
76	4409	3909	4040	2703	5137
77	1515	4418	5512	3516	5004
78	3809	6702	5602	3510	0707
79	0715	1561	4050	4803	3809
80	4006	7802	7301	1301	0704
81	3527	4415	1506	1540	1525
82	2710	4404	3906	3528	2708
83	1808	5002	4701	3913	5109
84	6701	4006	4023	1547	4406
85	2703	1507	5137	3909	7801
86		3528	1534	1509	1403
87		0709	2720	1512g	1513
88		1525	1503g	1403	8202
89		1552		4020	
90				3504	
91				3521	
92				1507	
93				5114	
94				3523	
95				4016	
96				1806	
97				1802	
98				4404	
99				1502	
100				4703	
101				4410	
102				5702	
103				3910	
104				1803	
105				3903	
106				3506	
107				2712	
108				3912	
109				4802	
110				3924	
111				3914	
112				2704	
113				5106	
114				3511	
115				1406	
116				5401	
117				1535	
118				1508	

10

20

30

40

【0156】

表 3 は、米国民において最も頻度の高い高解像度 HLA-C 対立遺伝子を記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系 [パシフィックアイランダーを含む]、およびヒスパニック系 [ラテンアメリカ人]）について、最も頻度の高い対立遺伝子が示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物（Maier et al., 2007, Human Immunology, 68: 779-788）からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髄バンクウェブサイト（The National Marrow Donor Program Website）（US）: bioinformatics.bethematchclin

50

ical.orgから編集)に基づいてランク付けされる。使用されるアノテーション(例えば、HLA-Cの場合の0701gは、HLA-C*07:01と同じであり、これは、2010年のWHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、(HLA接頭辞)－遺伝子*対立遺伝子群/ファミリー:具体的なHLAタンパク質を示す)ことに留意されたい。例えば、C*0701gは、C*07:01となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義DNA置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない(さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい: hla.alleles.org)。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Majers, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子群を指す。接尾辞「N」は、発現の変化を示すのに用いられる(前述の命名法リンクを参照)。

【0157】

【表6】

表3

ランク	表示集団中に検出された 最も高頻度のHLA-C対立遺伝子			
	ヨーロッパ系 アメリカ人	アフリカ系 アメリカ人	アジア系 パシフィック アイランダー	ヒスパニック系
1	0701g	0401g	702	0401g
2	0702	0701g	102	702
3	0401g	1601	304	0701g
4	0602	0602	0401g	304
5	0501g	0202	801	602
6	0304	1701g	602	1601
7	0303g	0702	302	102
8	1203	0304	0303g	802
9	0802	0802	1502g	0501g
10	0202	0501g	1402	202
11	1601	1801g	1202	1203
12	0102	1203	0701g	0303g
13	1502g	1505	1203	1502g
14	1402	0302	403	801
15	0704g	1402	1505	1701g
16	1202	0303g	1403	1402

【0158】

10

20

30

40

50

【表 7】

17	1701g	0804	0704g	1202
18	1602	0704g	0501g	305
19	1505	0102	1602	0704g
20	0302	1502g	803	1505
21	1604	1403	202	306
22	1504	0407	802	302
23	0803	1202	1204	1602
24	0505	0801	103	1509
25	1403	0735	1601	1801g
26	1801g	0413	1701g	803
27	1506	0705	406	804
28	1205	0403	727	1604
29	0107	0305	1504	307
30	0707	1602	410	110
31	0710	0408	404	509
32	0309	0608	105	717
33	1511	0404	337	1504
34	0712	0609	336	1403
35	1204	1608	1508	727
36	0610	0116	118	338
37	0319	1704	615	1519
38	0603	0214	1205	812
39	1212	0813	726	404
40	0507N	1803	1511	403
41	0307	0427	743	308
42	1503	0803		811
43	0404	1604		1406
44	0709			705
45	0405			1520
46	1404			408
47	0801			218

【0159】

表 4 は、米国民およびユダヤ系集団において検出された最も頻度の高い高解像度 HLA-DRB1 対立遺伝子を記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系 [パシフィックアイランダーを含む]、ヒスパニック系 [ラテンアメリカ人]、およびユダヤ系統の人）について、最も頻度の高い対立遺伝子が示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物 [M a i e r s e t a l . , 2007, Human Immunology, 68:779-788 からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髓バンクウェブサイト (The National Marrow Donor Program Website) (US): bioinformatics.bethematchclinical.org から編集) に基づいてランク付けされる。ユダヤ系の高解像度 HLA-DRB1 頻度は、以下: 全米骨髓バンクウェブサイト (National Marrow Donor Program Website) (US) URL: bioinformatics.bethematchclinical.org から得たものである。ユダヤ系集団についての HLA-DRB1 データが、Hadassah Registry-Jerusalem, Israel (K l i t z e t a l . , 201, Tissue Antigens, 76 (6): 442-

58からのドナーサンプルから得られたものであることに留意されたい。使用されるアノテーション（例えば、HLA-DRB1の場合の1501は、HLA-DRB1*15:01と同じであり、これは、2010年のWHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、（HLA接頭辞）-遺伝子*対立遺伝子群/ファミリー：具体的なHLAタンパク質を示す）ことに留意されたい。例えば、DRB1*1501は、DRB1*15:01となる。この表に示す名称に関して、コード領域において同義DNA置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない（さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい：hla.alleles.org）。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Maier, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子を指す。
【0160】
【表8】

表4

ランク	表示集団中に検出された最も高頻度のHLA-DRB1対立遺伝子				
	ヨーロッパ系 アメリカ人	アフリカ系 アメリカ人	アジア系 パシフィック アイランダー	ヒスパニック系	ユダヤ系
1	1501	1503	0901	0701	1104
2	0701	0701	0701	0301	0701
3	0301	1101	1502	0802	0402
4	0101	0301	1501	1501	0301
5	0401	0302	1202	0407	1101
6	1301	1302	0405	0404	0102
7	1101	1301	0301	1301	1302
8	1302	0804	0803	1101	0403
9	0404	0102	1101	0101	1301
10	1104	1201g	1302	1302	1401
11	1401g	1102	0403	0102	1502
12	0801	1303	1001	1406	1001
13	0102	0901	1201g	1104	1501
14	1201g	1501	0101	1402	1303
15	1601	0101	1401g	0411	1201
16	1303	0401	1301	1602	1601
17	0402	1401g	0406	0402	1305
18	0407	1001	1404	0405	0405
19	0103	1602	1602	0403	0404
20	1001	1304	1405	1303	0101
21	0901	0405	0802	1001	0804
22	1502	0404	0401	0401	0401
23	0403	1104	0404	1401g	0801
24	1103	0806	1104	1502	1503

【表 9】

25	0405	0801	0801	1102	1103
26	0408	0407	1312	1201g	0406
27	1305	1202	1506	0804	0901
28	1102	0403	0410	1503	1404
29	0803	0103	0402	0901	1602
30	1602	1502	1403	0801	0408
31	0804	1110	1106	0302	0103
32	1404	0811	1406	1601	1102
33	0406	1601	1407	0103	1202
34	0802	0802	0809	1304	0407
35	1503	0411	1418	1103	0803
36	1304	1331	0407	0410	1406
37	0302	0410	0408	0408	0808
38	1407	1103	1111	1305	1407
39	1139	1402	1504	0406	0302
40	0806	0408	1419	0803	1111
41	0811	0406	1503	1407	0802
42	1406	0402	1601	0806	1112
43	1109	1404	1507	1202	1203
44	1311	1316	0703	0417	1607
45		0803	0103	1404	1412
46		1305	1422	1311	0806
47		0305	0805	0414	0315
48		0409	1350	1309	1315
49		1320	1408	1504	1318
50		1117	0102	0810	1116
51		1311	1208	0418	1304
52		0306	1303	1115	
53		1336	1108	1110	
54			1402	1306	
55			1514	1340	
56			1425	1405	
57			1412	0305	

【0162】

表5は、米国民において検出された最も頻度の高い高解像度HLA-DQB1対立遺伝子を記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系［パシフィックアイランダーを含む］、およびヒスパニック系［ラテンアメリカ人］）について、最も頻度の高い対立遺伝子が示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物（Maier et al., 2007, Human Immunology, 68: 779-788）からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髓バンクウェブサイト（The National Marrow Donor Program Website）（US）: bioinformatics.bethematchclinical.orgから編集）に基づいてランク付けされる。使用されるアノテーション（例えば、HLA-DQB1の場合の0201gは、HLA-DQB1*02:01と同じであり、これは、2010年のWHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、（HLA接頭辞）-遺伝子*対立遺伝子群／ファミリー：具体

的なHLAタンパク質を示す)ことに留意されたい。例えば、DQB1*0201gは、DQB1*02:01となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義DNA置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない(さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい: hla.alleles.org)。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Maier, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子群を指す。
【0163】
【表10】

10

表5

ランク	表示集団中に検出された 最も高頻度のHLA-DQB1対立遺伝子			
	ヨーロッパ系 アメリカ人	アフリカ系 アメリカ人	アジア系 パシフィック アイランダー	ヒスパニック系
1	0201g	0201g	0301g	0301g
2	0301g	0602	0303	0302
3	0602	0301g	0601	0201g
4	0501	0501	0201g	0501
5	0302	0402	0302	0402
6	0603	0302	0501	0602
7	0303	0609	0502	0603
8	0604	0502	0503	0604
9	0402	0603	0401	0303
10	0503	0604	0602	0502
11	0502	0303	0402	0601
12	0609	0503	0603	0503
13	0601	0608	0609	0609
14	0304	0203	0604	0304
15	0504	0611	0610	0608
16	0305	0601	0305	0305
17		0605	0605	0611
18				0504

20

30

【0164】

表6は、米国民およびユダヤ系集団において検出された最も頻度の高い高解像度HLA-A-Bハプロタイプを記載する。表に示される各系統(例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系[パシフィックアイランダーを含む]、ヒスパニック系[ラテンアメリカ人]、およびユダヤ系統の人)について、上位50の最も頻度の高いHLA-A-Bハプロタイプが示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度(以前の刊行物[Maier et al., 2007, Human Immunology, 68:779-788からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髄バンクウェブサイト(The National Marrow Donor Program Website)(US): bioinformatics.bethematchclinical.orgから編集)に基づいてランク付けされる。ユダヤ系の高解像度HLA-A-Bハプロタイプ頻度は、以下: 全米骨髄バンクウェブサイト(National Marrow Donor Program Website)(US) URL: bioinforma

40

50

mat ics . b e t h e m a t c h c l i n i c a l . o r g から得たものである。ユダヤ系集団についてのHLA-A-Bハプロタイプ頻度データが、Hadassah Registry-Jerusalem, Israel (Klitz et al., 201, Tissue Antigens, 76 (6) : 442-58)からのドナーサンプルから得られたものであることに留意されたい。使用されるアノテーション（例えば、HLA-Aの場合の0201gは、HLA-A*02:01と同じであり、これは、2010年のWHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、(HLA接頭辞)-遺伝子*対立遺伝子群/ファミリー：具体的なHLAタンパク質を示す）ことに留意されたい。例えば、A*0201gは、A*02:01となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義DNA置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない（さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい：hla.alleles.org）。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Maier, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子群を指す。

【0165】

【表11】

表6

表示集団中の最も高頻度のHLA-A-B ハプロタイプ										
ランク	ヨーロッパ系 アメリカ人		アフリカ系 アメリカ人		アジア系パシフィック アイランダー		ヒスパニック系		ユダヤ系	
	HLA-A	HLA-B	HLA-A	HLA-B	HLA-A	HLA-B	HLA-A	HLA-B	HLA-A	HLA-B
1	0101g	0801g	3001	4201	3303	5801g	2902	4403	2601	3801
2	0301g	0702g	0301g	0702g	0207g	4601	0101g	0801g	2402	3502
3	0201g	4402g	0201g	4501g	3303	4403	0201g	5101g	3301	1402
4	0201g	0702g	7401g	1503g	1101g	4001g	0201g	4402g	0205	5001
5	0201g	1501g	3601	5301	2402g	4001g	0301g	0702g	2901	0705
6	0201g	4001g	0101g	0801g	1101g	1502	3301	1402	1101	5201
7	2902	4403	2301g	1503g	3001	1302	2402g	4002g	0101	0801
8	0101g	5701	6802	5301	0101g	5701	2402g	3906	0101	5201
9	0201g	5101g	0201g	4402g	2402g	5101g	0201g	1801g	0201	1801
10	0301g	3501g	3303	5301	0201g	4001g	0201g	3501g	0101	5701
11	1101g	3501g	2301g	5301	1101g	1301	0201g	0702g	0101	3502
12	0201g	2705g	6802	1510	2402g	4006	0201g	3512	2402	1801
13	2402g	0702g	6801g	5802	2402g	5401	0301g	3501g	0201	3503
14	0201g	1801g	0301g	3501g	0203	3802	3002	1801g	3001	1302
15	0201g	5701	2902	4403	2402g	4002g	2301g	4403	0201	5101
16	2601g	3801	0202	5301	2901g	0705g	0201g	1501g	2402	3801
17	3001	1302	2301g	0702g	1101g	5101g	2601g	3801	0301	0702
18	2501	1801g	2301g	4501g	2402g	5201g	0206	4002g	6802	1402

【0166】

【表 1 2】

19	0201g	0801g	0201g	3501g	1101g	3501g	2402g	3501g	0201	4402
20	0101g	0702g	0201g	0702g	2402g	4601	6801g	4002g	0301	3801
21	2402g	1501g	2301g	4403	1101g	3802	0201g	5201g	0201	5201
22	3301	1402	3402	4403	1101g	1501g	0101g	5701	2301	4403
23	3101	4001g	0201g	5301	0206	5101g	1101g	3501g	2301	4901
24	2301g	4403	6802	0702g	2402g	4801g	0201g	3517	1101	3501
25	0201g	1302	0301g	5802	0201g	5101g	6803	3905	0101	3801
26	0101g	3701	0201g	5101g	0101g	3701	0201g	0801g	0101	1517
27	0201g	3501g	3001	5301	2402g	0702g	0206	3905	0302	4402
28	0301g	1402	3001	4202	2402g	3501g	2402g	3502	2601	3501
29	0201g	4403	0201g	1801g	1101g	5201g	3101	3501g	6901	5501
30	0301g	1501g	3002	0702g	0201g	5401	0201g	4002g	0301	3501
31	0301g	4402g	3402	3501g	2402g	1301	2402g	5101g	0101	4101
32	3002	1801g	3303	1516	1101g	5401	1101g	2705g	0101	4901
33	1101g	5501	3002	5703	1101g	4601	6801g	4801g	0205	4101
34	6802	1402	7401g	5301	3101	5101g	6802	1402	0201	0801
35	6801g	4402g	3002	4403	2402g	1501g	2402g	1501g	0101	1302
36	1101g	0702g	7401g	5703	0201g	1301	3101	4002g	0101	3501
37	0301g	1801g	2301g	4201	1101g	3901g	0201g	4403	0301	1402
38	2402g	4402g	0201g	4001g	2407	3505	3001	1302	2402	3508
39	0301g	5101g	3301	7801	0201g	1501g	0201g	4001g	0301	1302
40	3201	4402g	0201g	4901	2402g	3802	0206	4801g	0201	3801
41	2402g	3502	0201g	1501g	2601g	0801g	2402g	4801g	2501	1801
42	2402g	1801g	2301g	3501g	0201g	3501g	6802	5301	0101	5801
43	2402g	0801g	2301g	5801g	0301g	3501g	0201g	1515	0101	4402
44	0101g	4402g	3002	1402	0211g	4006	2501	1801g	6601	4102
45	0301g	0801g	2301g	0801g	2402g	3503	0301g	1402	2402	4402
46	0301g	4001g	0201g	1503g	0101g	0801g	2402g	0801g	0101	3508
47	0201g	3901g	3303	3501g	6801g	5201g	0301g	5101g	0301	3503
48	1101g	5101g	6601	5802	2417	1502	3101	5101g	0301	1801
49	0201g	3503	0202	0702g	0101g	1517	2402g	3905	3002	1801
50	2402g	5101g	3002	5301	2402g	5801g	3001	4201	0101	3701

10

20

30

【0 1 6 7】

表 7 は、米国民およびユダヤ系集団において検出された最も頻度の高い高解像度 HLA-A-B-DRB1 ハプロタイプを記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系 [パシフィックアイランダーを含む]、ヒスパニック系 [ラテンアメリカ人]、およびユダヤ系系統の人）について、上位 50 の最も頻度の高い HLA-A-B-DRB1 ハプロタイプが示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物 [Maier et al., 2007, Human Immunology, 68: 779-788 からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髓バンクウェブサイト (The National Marrow Donor Program Website) (US): bioinformatics.bethematchclinical.org から編集) に基づいてランク付けされる。ユダヤ系の高解像度 HLA-A-B-DRB1 ハプロタイプ頻度は、以下：全米骨髓バンクウェブサイト (National Marrow Donor Program Website) (US) URL: bioinformatics.bethematchclinical.org から得たものである。ユダヤ系集団についての HLA-A-B-DRB1 ハプロ

40

50

タイプ頻度データが、Hadassah Registry-Jerusalem, Israel (Klitz et al., 201, Tissue Antigens, 76 (6) : 442-58からのドナーサンプルから得られたものであることに留意されたい。使用されるアノテーション（例えば、HLA-DRB1の場合の1501は、HLA-DRB1*15:01と同じであり、これは、2010年のWHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、(HLA接頭辞) - 遺伝子*対立遺伝子群/ファミリー: 具体的なHLAタンパク質を示す) に留意されたい。例えば、DRB1*1501は、DRB1*15:01となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義DNA置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない（さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい: hla.alleles.org）。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Majers, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子群を指す。

【0168】

【表13】

表7

表示集団中の最も高頻度のHLA-A-B-DRB1ハプロタイプ															
ランク	ヨーロッパ系 アメリカ人			アフリカ系 アメリカ人			アジア系パシフィック アイランダー			ヒスパニック系			ユダヤ系		
	HL A-A	HL A-B	HL A-DRB1	HL A-A	HL A-B	HLA - DRB1	HL A-A	HL A-B	HLA - DRB1	HL A-A	HL A-B	HLA - DRB1	HL A-A	HL A-B	HLA - DRB1
1	01 01 g	08 01 g	03 01	30 01	42 01	0302	33 03	58 01 g	0301	290 2	44 03	701	26 01	38 01	0402
2	03 01 g	07 02 g	15 01	01 01 g	08 01 g	0301	02 07 g	46 01	0901	010 1g	08 01 g	301	24 02	35 02	1104
3	02 01 g	44 02 g	04 01	68 01 g	58 02	1201 g	33 03	44 03	0701	030 1g	07 02 g	1501	02 05	50 01	0701
4	02 01 g	07 02 g	15 01	68 02	15 10	0301	30 01	13 02	0701	300 2	18 01 g	301	01 01	35 02	1104
5	29 02	44 03	07 01	33 03	53 01	0804	33 03	58 01 g	1302	330 1	14 02	102	33 01	14 02	0102
6	02 01 g	15 01 g	04 01	36 01	53 01	1101	11 01 g	15 02	1202	680 3	39 05	407	01 01	08 01	0301
7	01 01 g	57 01	07 01	03 01 g	07 02 g	1501	24 02 g	52 01 g	1502	230 1g	44 03	701	24 02	18 01	1104
8	03 01 g	35 01 g	01 01	34 02	44 03	1503	01 01 g	57 01	0701	240 2g	39 06	1406	11 01	52 01	1502

【0169】

【表 1 4】

9	02 01 g	40 01 g	13 02	29 02	44 03	0701	33 03	44 03	1302	020 1g	07 02 g	1501	02 01	35 03	1201
10	30 01	13 02	07 01	02 01 g	44 02 g	0401	01 01 g	37 01	1001	206	39 05	407	30 01	13 02	0701
11	02 01 g	08 01 g	03 01	23 01 g	15 03 g	0701	29 01 g	07 05 g	1001	020 1g	35 17	802	29 01	07 05	1001
12	02 01 g	57 01	07 01	74 01 g	15 03 g	1302	24 02 g	40 01 g	0901	240 2g	35 02	1104	68 02	14 02	0102
13	24 02 g	07 02 g	15 01	68 02 g	07 02 g	1503	11 01 g	46 01	0901	020 1g	35 12	802	01 01	52 01	1502
14	11 01 g	35 01 g	01 01	30 01	42 01	0804	24 02 g	54 01	0405	020 1g	15 15	802	26 01	38 01	1401
15	33 01	14 02	01 02	30 02	14 02	1503	24 02 g	07 02 g	0101	020 1g	44 02 g	1301	03 02	44 02	0402
16	23 01 g	44 03	07 01	68 02	53 01	1503	11 01 g	40 01 g	0803	300 1	13 02	701	01 01	15 17	1302
17	01 01 g	07 02 g	15 01	74 01 g	57 03	1303	26 01 g	08 01 g	0301	680 2	14 02	102	02 01	18 01	1104
18	02 01 g	15 01 g	13 01	29 02	49 01	1503	11 01 g	38 02	1502	020 1g	08 01 g	301	02 01	52 01	1502
19	02 01 g	13 02	07 01	23 01 g	44 03	1503	02 07 g	46 01	0803	020 1g	44 03	701	03 01	38 01	1301
20	31 01	40 01 g	04 04	02 01 g	08 01 g	0301	11 01 g	13 01	1501	110 1g	27 05 g	101	01 01	57 01	1305
21	25 01	18 01 g	15 01	02 01 g	15 01 g	0401	11 01 g	54 01	0405	680 1g	48 01 g	404	26 01	35 01	0402
22	02 01 g	44 03	07 01	66 02	58 01 g	1503	02 01 g	13 01	1202	010 1g	57 01	701	24 02	38 01	1401
23	02 01 g	44 02 g	13 01	02 01 g	45 01 g	1302	11 01 g	15 01 g	0406	030 1g	35 01 g	101	02 01	08 01	0301
24	02 01 g	44 02 g	01 01	66 01	58 02	1301	24 02 g	40 01 g	1501	030 1g	51 01 g	701	23 01	44 03	0701
25	01 01 g	08 01 g	15 01	23 01 g	15 03 g	1503	24 07	35 05	1202	206	40 02 g	802	03 01	13 02	0701
26	03 01 g	07 02 g	01 01	02 01 g	07 02 g	1101	24 02 g	46 01	0901	020 1g	35 01 g	407	69 01	55 01	1101

【 0 1 7 0 】

10

20

30

40

50

【表 15】

27	02 01 g	44 02 g	15 01	23 01 g	53 01 g	1101	24 02 g	51 01 g	0901	020 1g	51 01 g	1101	01 01	13 02	0701
28	02 01 g	51 01 g	11 01	02 01 g	45 01 g	1503	11 01 g	40 01 g	0901	010 1g	07 02 g	1501	02 05	41 01	1305
29	26 01 g	38 01 g	04 02	68 02 g	53 01 g	1303	02 01 g	40 01 g	1101	240 2g	40 02 g	802	01 01	41 01	0701
30	02 01 g	27 05 g	01 01	74 01 g	15 03 g	1503	02 03	38 02	1602	020 1g	14 02	102	26 01	38 01	1302
31	03 01 g	08 01 g	03 01	23 01 g	53 01 g	0701	24 02 g	40 01 g	0403	020 1g	35 12	407	24 02	14 02	0102
32	30 02	18 01 g	03 01	23 01 g	07 02 g	0901	11 01 g	35 01 g	1501	310 1	35 01 g	802	03 01	35 02	1104
33	02 01 g	18 01 g	11 04	02 01 g	51 01 g	1303	24 17	15 02	1202	240 2g	40 02 g	404	32 01	52 01	1502
34	24 02 g	08 01 g	03 01	23 01 g	42 01 g	0302	11 01 g	40 01 g	1501	250 1	18 01 g	1501	03 01	07 02	1501
35	24 02 g	35 02	11 04	68 02 g	53 01 g	1302	24 02 g	13 01	1501	680 1g	40 02 g	407	03 01	14 02	0102
36	02 01 g	15 01 g	01 01	03 01 g	58 02 g	0701	11 01 g	39 01 g	0803	240 2g	39 05	407	23 01	41 01	0701
37	11 01 g	07 02 g	15 01	23 01 g	44 03 g	0701	24 02 g	59 01	0405	110 1g	52 01 g	1502	01 01	18 01	1104
38	68 02	14 02	13 03	25 01 g	18 01 g	1501	11 01 g	52 01 g	1502	260 1g	38 01	402	30 02	18 01	0301
39	02 01 g	51 01 g	13 01	26 01 g	08 01 g	1304	02 01 g	51 01 g	0901	020 1g	15 01 g	401	23 01	49 01	1104
40	02 01 g	15 01 g	15 01	68 02 g	42 01 g	0302	01 01 g	08 01 g	0301	020 1g	18 01 g	301	26 01	38 01	1101
41	32 01	14 01	07 01	02 01 g	07 02 g	1501	24 02 g	35 01 g	0901	240 2g	35 43 g	407	01 01	58 01	0701
42	02 01 g	35 01 g	01 01	23 01 g	15 03 g	1101	11 01 g	15 02	1501	240 2g	08 01 g	301	01 01	38 01	1301
43	03 01 g	07 02 g	04 01	02 01 g	53 01 g	1303	24 02 g	38 02	1502	240 2g	40 02 g	407	03 01	41 01	0404
44	02 01 g	44 02 g	11 01	30 02 g	57 03 g	1301	24 02 g	46 01	0803	030 1g	35 01 g	1301	01 01	52 01	1303

【0171】

10

20

30

40

50

【表 16】

45	01 01 g	08 01 g	01 01	02 01 g	35 01 g	1503	11 01 g	44 03	0701	240 2g	14 02	102	01 01	44 02	1301
46	03 01 g	07 02 g	13 01	02 01 g	45 01 g	0701	24 02 g	13 01	1202	020 1g	44 02 g	401	29 02	14 02	0701
47	03 01 g	07 02 g	07 01	03 01 g	35 01 g	1101	02 06	59 01	0405	020 1g	51 01 g	301	01 01	57 01	0701
48	02 05	50 01	07 01	30 02	44 03	1503	34 01	40 02 g	1502	010 1g	52 01 g	1502	23 01	49 01	1101
49	02 01 g	40 01 g	04 04	30 01	53 01	0804	11 01 g	40 01 g	1201 g	690 1	55 01	1101	01 01	15 01	0403
50	02 01 g	40 01 g	15 01	02 02	07 02 g	1503	11 01 g	13 01	1202	300 1	42 01	302	03 02	08 01	0301

10

【0172】

表8は、米国民において検出された最も頻度の高い高解像度HLA-A-C-Bハプロタイプを記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系〔パシフィックアイランダーを含む〕、およびヒスパニック系〔ラテンアメリカ人〕）について、上位50の最も頻度の高いHLA-A-C-Bハプロタイプが示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物（Maier et al., 2007, Human Immunology, 68: 779-788）からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髄バンクウェブサイト（The National Marrow Donor Program Website）（US）: bioinformatics.bethematchclinical.orgから編集）に基づいてランク付けされる。使用されるアノテーション（例えば、HLA-Aの場合の0201gは、HLA-A*02:01と同じであり、これは、2010年のWHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、（HLA接頭辞）-遺伝子*対立遺伝子群／ファミリー：具体的なHLAタンパク質を示す）ことに留意されたい。例えば、A*0201gは、A*02:01となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義DNA置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない（さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい: hla.alleles.org）。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Maier, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子群を指す。

20

30

40

【0173】

50

【表 1 7】

表 8

表示集団中の最も高頻度のHLA-A-C-B ハプロタイプ												
ランク	ヨーロッパ系アメリカ人			アフリカ系アメリカ人			アジア系パシフィックアイランダー			ヒスパニック系		
	HLA-A	HLA-C	HLA-B	HLA-A	HLA-C	HLA-B	HLA-A	HLA-C	HLA-B	HLA-A	HLA-C	HLA-B
1	0101g	0701g	0801g	3001	1701g	4201	3303	0302	5801g	2902	1601	4403

10

【 0 1 7 4】

20

30

40

50

【表 18】

2	0301g	0702	0702g	0201g	1601	4501g	0207g	0102	4601	0101g	0701g	0801g
3	0201g	0501g	4402g	7401g	0202	1503g	1101g	0801	1502	0301g	0702	0702g
4	0201g	0702	0702g	3601	0401g	5301	3001	0602	1302	0201g	0501g	4402g
5	0201g	0304	4001g	0101g	0701g	0801g	3303	0701g	4403	3301	0802	1402
6	2902	1601	4403	0301g	0702	0702g	1101g	0702	4001g	2402g	0702	3906
7	0101g	0602	5701	2301g	0202	1503g	0101g	0602	5701	0201g	0401g	3501g
8	0301g	0401g	3501g	0201g	0501g	4402g	2901g	1505	0705g	0201g	0702	0702g
9	0201g	0304	1501g	6802	0401g	5301	2402g	1402	5101g	3002	0501g	1801g
10	1101g	0401g	3501g	6801g	0602	5802	0203	0702	3802	0201g	0401g	3512
11	0201g	0303g	1501g	3303	0401g	5301	2402g	1202	5201g	0301g	0401g	3501g
12	2402g	0702	0702g	6802	0304	1510	3303	1403	4403	2301g	0401g	4403
13	0201g	0602	5701	0301g	0401g	3501g	2402g	0102	5401	2601g	1203	3801
14	2601g	1203	3801	0202	0401g	5301	2402g	0102	4601	1101g	0401g	3501g
15	3001	0602	1302	2301g	0702	0702g	2402g	0702	0702g	6803	0702	3905
16	0201g	0701g	0801g	2301g	0401g	5301	1101g	0304	1301	2402g	0304	4002g
17	2501	1203	1801g	2902	1601	4403	2402g	0702	4001g	0201g	0401g	3517
18	0101g	0702	0702g	3402	0401g	4403	0201g	0102	5401	0206	0702	3905
19	3301	0802	1402	2301g	0401g	4403	0101g	0602	3701	2402g	0401g	3502
20	3101	0304	4001g	0201g	0401g	5301	1101g	0702	3802	0201g	1502g	5101g
21	2301g	0401g	4403	0201g	0702	0702g	1101g	1402	5101g	3101	0401g	3501g
22	0201g	0701g	1801g	2301g	0602	4501g	0206	1402	5101g	6801g	0801	4801g
23	0201g	0602	1302	0201g	0701g	4901	1101g	0401g	1501g	6801g	0304	4002g
24	0101g	0602	3701	6802	0702	0702g	1101g	1202	5201g	6802	0802	1402
25	2402g	0303g	1501g	0301g	0602	5802	2402g	0304	1301	0201g	0303g	5201g
26	0201g	0102	2705g	3001	1701g	4202	0201g	0304	1301	6802	0401g	5301
27	0301g	0802	1402	0201g	1601	3501g	1101g	0102	5401	0201g	0102	1515
28	0201g	0202	2705g	7401g	0701g	5703	1101g	0401g	3501g	0206	0801	4801g
29	0201g	1402	5101g	2301g	1701g	4201	2402g	0801	4801g	3001	0602	1302
30	0201g	0401g	3501g	3303	1402	1516	2407	0401g	3505	0101g	0602	5701
31	6802	0802	1402	0201g	0304	4001g	1101g	0304	4001g	0201g	0701g	0801g
32	3002	0501g	1801g	3301	1601	7801	1101g	0702	3901g	2402g	0401g	3501g
33	1101g	0303g	5501	0201g	0401g	3501g	1101g	0102	4601	2501	1203	1801g
34	1101g	0702	0702g	6601	0602	5802	3101	1402	5101g	0201g	0304	4001g
35	0201g	1502g	5101g	3002	0802	1402	2402g	1502g	4006	0206	0304	4002g
36	3201	0501g	4402g	3303	0401g	3501g	2601g	0702	0801g	1101g	0102	2705g
37	2402g	0401g	3502	6802	1701g	4201	2402g	0304	4002g	0301g	0802	1402
38	2402g	0701g	0801g	3001	0401g	5301	2402g	0304	4001g	0201g	0501g	1801g
39	0301g	0304	4001g	6602	0701g	5801g	0201g	1502g	4001g	2402g	0801	4801g
40	0201g	1601	4403	0201g	0202	1503g	2402g	0702	3802	0201g	0304	4002g
41	2402g	0501g	4402g	2301g	0602	5301	0301g	0401g	3501g	3001	1701g	4201
42	6801g	0704g	4402g	2902	0401g	5301	0211g	1502g	4006	2301g	0701g	4901
43	0301g	0701g	0801g	0101g	0702	0702g	2417	0801	1502	2402g	0102	3543g
44	3201	0802	1401	0205	0401g	5301	0101g	0701g	1517	2402g	0702	0702g
45	0301g	0501g	4402g	0205	0701g	5801g	0206	0102	5901	0201g	0303g	1501g
46	2301g	0701g	4901	7401g	0401g	5301	2402g	0401g	3501g	2402g	0306	4002g

【0175】

【表 19】

47	2402g	0304	4001g	0102	0701g	4901	2402g	0303g	3501g	1101g	1202	5201g
48	0205	0602	5001	0202	0202	1503g	1101g	0102	5502	0201g	0701g	1801g
49	6801g	0304	4001g	2902	0701g	4901	2402g	0401g	4001g	2402g	0501g	4402g
50	0101g	0501g	4402g	2301g	0304	0801g	2402g	1203	3503	0201g	0702	3906

【0176】

10

20

30

40

50

表9は、米国民において検出された最も頻度の高い高解像度HLA-A-B-DRB1-DQB1ハプロタイプを記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系〔パシフィックアイランダーを含む〕、およびヒスパニック系〔ラテンアメリカ人〕）について、上位50の最も頻度の高いHLA-A-B-DRB1-DQB1ハプロタイプが示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物（Maier et al., 2007, Human Immunology, 68:779-788）からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髓バンクウェブサイト（The National Marrow Donor Program Website）（US）: bioinformatics.bethematchclinical.orgから編集）に基づいてランク付けされる。使用されるアノテーション（例えば、HLA-Aの場合の0201gは、HLA-A*02:01と同じであり、これは、2010年のWHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、（HLA接頭辞）-遺伝子*対立遺伝子群/ファミリー：具体的なHLAタンパク質を示す）ことに留意されたい。例えば、A*0201gは、A*02:01となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義DNA置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない（さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい: hla.alleles.org）。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Maier, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子群を指す。

【0177】

【表20】

表9

表示集団中の最も高頻度のHLA-A-B-DRB1-DQB1 ハプロタイプ																
ランク	ヨーロッパ系アメリカ人				アフリカ系アメリカ人				アジア系パシフィックアイランダー				ヒスパニック系			
	HL A- A	HL A- B	D R B1	D Q B1	HL A- A	HL A- B	D R B1	D Q B1	HL A- A	HL A- B	D R B1	D Q B1	HL A- A	HL A- B	D R B1	D Q B1
1	01 01 g	080 1g	03 01	02 01 g	300 1	420 1	03 02	04 02	330 3	580 1g	03 01	02 01 g	290 2	440 3	70 1	02 01 g
2	03 01 g	070 2g	15 01	06 02	010 1g	080 1g	03 01	02 01 g	020 7g	460 1	09 01	03 03	010 1g	080 1g	30 1	02 01 g
3	02 01 g	440 2g	04 01	03 01 g	030 1g	070 2g	15 01	06 02	330 3	440 3	07 01	02 01 g	030 1g	070 2g	15 01	60 2

【0178】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

4	02 01 g	070 2g	15 01	06 02	330 3	530 1	08 04	03 01 g	110 1g	150 2	12 02	03 01 g	330 1	140 2	10 2	50 1
5	29 02	440 3	07 01	02 01 g	680 2	151 0	03 01	02 01 g	330 3	580 1g	13 02	06 09	300 2	180 1g	30 1	02 01 g
6	02 01 g	150 1g	04 01	03 02	680 1g	580 2	12 01 g	05 01	240 2g	520 1g	15 02	06 01	680 3	390 5	40 7	30 2
7	01 01 g	570 1	07 01	03 03	340 2	440 3	15 03	06 02	300 1	130 2	07 01	02 01 g	020 1g	070 2g	15 01	60 2
8	03 01 g	350 1g	01 01	05 01	680 2	070 2g	15 03	06 02	010 1g	370 1	10 01	05 01	230 1g	440 3	70 1	02 01 g
9	02 01 g	400 1g	13 02	06 04	360 1	530 1	11 01	06 02	010 1g	570 1	07 01	03 03	240 2g	350 2	11 04	03 01 g
10	30 01	130 2	07 01	02 01 g	290 2	440 3	07 01	02 01 g	110 1g	540 1	04 05	04 01	020 1g	351 2	40 7	30 2
11	02 01 g	080 1g	03 01	02 01 g	230 1g	440 3	15 03	06 02	290 1g	070 5g	10 01	05 01	240 2g	400 2g	40 4	30 2
12	02 01 g	570 1	07 01	03 03	740 1g	150 3g	13 02	06 09	020 7g	460 1	08 03	06 01	020 1g	510 1g	70 1	02 01 g
13	24 02 g	070 2g	15 01	06 02	020 1g	440 2g	04 01	03 01 g	330 3	440 3	13 02	06 04	240 2g	390 6	14 06	03 01 g
14	11 01 g	350 1g	01 01	05 01	230 1g	530 1	07 01	02 01 g	240 2g	400 1g	09 01	03 03	020 1g	440 2g	13 01	60 3
15	33 01	140 2	01 02	05 01	230 1g	150 3g	07 01	02 01 g	110 1g	130 1	15 01	06 01	240 2g	354 3g	40 7	30 2
16	23 01 g	440 3	07 01	02 01 g	680 2	530 1	15 03	06 02	240 2g	070 2g	01 01	05 01	206	390 5	40 7	30 2
17	02 01 g	150 1g	13 01	06 03	290 2	490 1	15 03	06 02	240 2g	460 1	09 01	03 03	020 1g	351 2	80 2	40 2
18	01 01 g	070 2g	15 01	06 02	300 1	420 1	08 04	03 01 g	240 7	350 5	12 02	03 01 g	206	400 2g	80 2	40 2
19	02 01 g	130 2	07 01	02 01 g	660 2	580 1g	15 03	06 02	020 1g	510 1g	09 01	03 03	300 1	130 2	70 1	02 01 g
20	31 01	400 1g	04 04	03 02	230 1g	180 1g	07 01	02 01 g	020 1g	400 1g	11 01	03 01 g	010 1g	570 1	70 1	30 3
21	25 01	180 1g	15 01	06 02	020 1g	070 2g	15 01	06 02	110 1g	380 2	15 02	05 02	020 1g	080 1g	30 1	02 01 g

10

20

30

40

【0 1 7 9】

50

【表 2 2】

22	02 01 g	440 3	07 01	02 01 g	020 1g	450 1g	15 03	06 02	240 2g	590 1	04 05	04 01	250 1	180 1g	15 01	60 2
23	02 01 g	440 2g	13 01	06 03	230 1g	530 1	15 03	06 02	260 1g	080 1g	03 01	02 01 g	020 1g	151 5	80 2	40 2
24	02 01 g	440 2g	15 01	06 02	020 2	420 1	03 02	04 02	110 1g	460 1	09 01	03 03	020 1g	350 1g	80 2	40 2
25	02 01 g	440 2g	01 01	05 01	250 1	180 1g	15 01	06 02	240 2g	400 1g	04 03	03 02	020 1g	440 3	70 1	02 01 g
26	01 01 g	080 1g	15 01	06 02	300 2	140 2	15 03	06 02	020 1g	130 1	12 02	03 01 g	020 1g	520 1g	15 02	60 1
27	03 01 g	070 2g	01 01	05 01	740 1g	530 1	11 01	06 02	020 3	380 2	08 03	06 01	020 1g	150 1g	40 1	30 2
28	02 01 g	510 1g	11 01	03 01 g	230 1g	530 1	03 01	02 01 g	110 1g	400 1g	08 03	06 01	110 1g	270 5g	10 1	50 1
29	26 01 g	380 1	04 02	03 02	300 2	080 1g	03 01	02 01 g	110 1g	520 1g	15 02	06 01	110 1g	520 1g	15 02	60 1
30	02 01 g	270 5g	01 01	05 01	290 2	530 1	07 01	02 01 g	240 2g	540 1	04 05	04 01	204	510 1g	41 1	40 2
31	03 01 g	080 1g	03 01	02 01 g	020 1g	080 1g	03 01	02 01 g	020 3	380 2	16 02	05 02	690 1	550 1	11 01	03 01 g
32	30 02	180 1g	03 01	02 01 g	230 1g	440 3	07 01	02 01 g	240 2g	150 1g	11 01	03 01 g	240 2g	400 2g	40 7	30 2
33	02 01 g	180 1g	11 04	03 01 g	300 2	440 3	15 03	06 02	240 2g	540 1	08 03	06 01	010 1g	080 1g	13 01	60 3
34	24 02 g	080 1g	03 01	02 01 g	680 2	151 0	08 04	03 01 g	110 1g	400 1g	09 01	03 03	030 1g	350 1g	10 1	50 1
35	24 02 g	350 2	11 04	03 01 g	030 1g	070 2g	15 03	06 02	110 1g	150 2	15 01	06 01	680 2	140 2	10 2	50 1
36	02 01 g	150 1g	01 01	05 01	740 1g	570 3	13 03	02 01 g	340 1	153 5	04 05	04 02	240 2g	480 1g	40 4	30 2
37	68 02	140 2	13 03	03 01 g	030 1g	580 2	11 02	03 01 g	110 1g	390 1g	08 03	06 01	260 1g	380 1	40 2	30 2
38	02 01 g	510 1g	13 01	06 03	300 2	780 1	07 01	02 01 g	010 1g	080 1g	03 01	02 01 g	020 1g	560 1	10 1	50 1
39	02 01 g	350 1g	01 01	05 01	110 1g	070 2g	15 01	06 02	010 1g	151 7	13 02	06 04	240 2g	350 1g	40 7	30 2

【 0 1 8 0 】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

40	03 01 g	070 2g	13 01	06 03	020 1g	490 1	15 03	06 02	240 2g	380 2	09 01	03 03	300 1	420 1	30 2	40 2
41	32 01	140 1	07 01	02 01 g	300 1	420 1	15 03	06 02	110 1g	150 1g	04 06	03 02	110 1g	490 1	40 5	30 2
42	02 01 g	150 1g	15 01	06 02	330 3	530 1	15 03	06 02	110 1g	350 1g	15 01	06 02	020 1g	510 1g	13 01	60 3
43	11 01 g	070 2g	15 01	06 02	230 1g	420 1	03 02	04 02	020 6	510 1g	15 01	06 02	240 2g	080 1g	30 1	02 01 g
44	01 01 g	080 1g	01 01	05 01	020 1g	510 1g	13 03	03 01 g	240 2g	400 6	15 01	06 01	030 1g	140 2	10 2	50 1
45	02 05	500 1	07 01	02 01 g	680 2	530 1	11 02	03 01 g	240 2g	580 1g	03 01	02 01 g	030 1g	510 1g	70 1	02 01 g
46	02 01 g	400 1g	15 01	06 02	030 1g	350 1g	15 03	06 02	110 2	150 2	12 02	03 01 g	240 2g	140 2	10 2	50 1
47	02 01 g	440 2g	11 01	03 01 g	330 1	140 2	01 02	05 01	110 1g	130 1	12 02	03 01 g	030 1g	440 3	70 1	02 01 g
48	02 01 g	400 1g	04 04	03 02	300 2	580 2	12 01 g	05 01	110 1g	510 1g	14 04	05 03	110 1g	070 2g	15 01	60 2
49	02 01 g	400 1g	08 01	04 02	030 1g	350 1g	10 01	05 01	290 1g	070 5g	08 03	03 01 g	330 1	440 3	10 2	50 1
50	03 01 g	140 2	13 02	06 09	290 2	350 1g	07 01	02 01 g	241 7	150 2	12 02	03 01 g	320 1	140 1	70 1	02 01 g

10

20

30

【0181】

表10は、米国民における最も頻度の高い高解像度HLA-A-C-B-DRB1ハプロタイプを記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系〔パシフィックアイランダーを含む〕、およびヒスパニック系〔ラテンアメリカ人〕）について、上位50の最も頻度の高いHLA-A-C-B-DRB1ハプロタイプが示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物（Majers et al., 2007, Human Immunology, 68:779-788）からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髄バンクウェブサイト（The National Marrow Donor Program Website）（US）：bioinformatics.bethematchclinical.orgから編集）に基づいてランク付けされる。使用されるアノテーション（例えば、HLA-Aの場合の0201gは、HLA-A*02:01と同じであり、これは、2010年のWHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、（HLA接頭辞）-遺伝子*対立遺伝子群/ファミリー：具体的なHLAタンパク質を示す）ことに留意されたい。例えば、A*0201gは、A*02:01となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義DNA置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない（さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい：hla.alleles.org）。この表で、「g」の

40

50

接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「M a i e r s , M . , G r a g e r t , L . , K l i t z , W . H i g h r e s o l u t i o n H L A a l l e l e s a n d h a p l o t y p e s i n t h e U S p o p u l a t i o n . 2 0 0 7」の表1に定義される対立遺伝子群を指す。

【0182】

【表24】

表 10

表示集団中の最も高頻度のHLA-A-C-B-DRB1ハプロタイプ																
ラ ン ク	ヨーロッパ系アメリカ人				アフリカ系アメリカ人				アジア系パシフィックアイランダー				ヒスパニック系			
	HL A- A	HL A- C	HL A- B	D R B1	HL A- A	HL A- C	HL A- B	D R B1	HL A- A	HL A- C	HL A- B	D R B1	HL A- A	HL A- C	HL A- B	D R B1
1	01 01 g	070 1g	080 1g	03 01	300 1	170 1g	420 1	03 02	330 3	030 2	580 1g	03 01	290 2	160 1	440 3	07 01
2	03 01 g	070 2	070 2g	15 01	010 1g	070 1g	080 1g	03 01	020 7g	010 2	460 1	09 01	010 1g	070 1g	080 1g	03 01
3	02 01 g	050 1g	440 2g	04 01	680 1g	060 2	580 2	12 01 g	300 1	060 2	130 2	07 01	030 1g	070 2	070 2g	15 01
4	02 01 g	070 2	070 2g	15 01	030 1g	070 2	070 2g	15 01	330 3	070 1g	440 3	07 01	300 2	050 1g	180 1g	03 01
5	29 02	160 1	440 3	07 01	360 1	040 1g	530 1	11 01	330 3	030 2	580 1g	13 02	330 1	080 2	140 2	01 02
6	01 01 g	060 2	570 1	07 01	330 3	040 1g	530 1	08 04	110 1g	080 1	150 2	12 02	680 3	070 2	390 5	04 07
7	03 01 g	040 1g	350 1g	01 01	680 2	030 4	151 0	03 01	240 2g	120 2	520 1g	15 02	230 1g	040 1g	440 3	07 01
8	02 01 g	030 4	150 1g	04 01	340 2	040 1g	440 3	15 03	010 1g	060 2	570 1	07 01	240 2g	070 2	390 6	14 06
9	02 01 g	030 4	400 1g	13 02	290 2	160 1	440 3	07 01	330 3	140 3	440 3	13 02	020 6	070 2	390 5	04 07
10	02 01 g	070 1g	080 1g	03 01	020 1g	050 1g	440 2g	04 01	010 1g	060 2	370 1	10 01	020 1g	040 1g	351 7	08 02
11	30 01	060 2	130 2	07 01	740 1g	020 2	150 3g	13 02	290 1g	150 5	070 5g	10 01	020 1g	070 2	070 2g	15 01
12	02 01 g	060 2	570 1	07 01	230 1g	020 2	150 3g	07 01	240 2g	010 2	540 1	04 05	240 2g	040 1g	350 2	11 04
13	24 02 g	070 2	070 2g	15 01	680 2	040 1g	530 1	15 03	240 2g	070 2	070 2g	01 01	020 1g	010 2	151 5	08 02

【0183】

10

20

30

40

50

【表 2 5】

14	11 01 g	040 1g	350 1g	01 01	300 2	080 2	140 2	15 03	240 2g	010 2	460 1	09 01	020 1g	040 1g	351 2	08 02
15	33 01	080 2	140 2	01 02	300 1	170 1g	420 1	08 04	110 1g	070 2	380 2	15 02	300 1	060 2	130 2	07 01
16	23 01 g	040 1g	440 3	07 01	680 2	070 2	070 2g	15 03	260 1g	070 2	080 1g	03 01	680 2	080 2	140 2	01 02
17	02 01 g	060 2	130 2	07 01	290 2	070 1g	490 1	15 03	020 7g	010 2	460 1	08 03	680 1g	080 1	480 1g	04 04
18	01 01 g	070 2	070 2g	15 01	740 1g	070 1g	570 3	13 03	110 1g	030 4	130 1	15 01	110 1g	010 2	270 5g	01 01
19	02 01 g	030 3g	150 1g	13 01	020 1g	160 1	450 1g	13 02	110 1g	010 2	460 1	09 01	030 1g	040 1g	350 1g	01 01
20	31 01	030 4	400 1g	04 04	230 1g	040 1g	440 3	15 03	020 1g	030 4	130 1	12 02	020 1g	050 1g	440 2g	13 01
21	25 01	120 3	180 1g	15 01	740 1g	020 2	150 3g	15 03	110 1g	040 1g	150 1g	04 06	250 1	120 3	180 1g	15 01
22	03 01 g	070 2	070 2g	01 01	660 1	060 2	580 2	13 01	240 7	040 1g	350 5	12 02	020 1g	040 1g	351 2	04 07
23	02 01 g	050 1g	440 2g	13 01	230 1g	040 1g	440 3	07 01	110 1g	010 2	540 1	04 05	020 1g	050 1g	180 1g	03 01
24	01 01 g	070 1g	080 1g	15 01	230 1g	170 1g	420 1	03 02	240 2g	140 2	510 1g	09 01	030 1g	040 1g	350 1g	13 01
25	02 01 g	050 1g	440 2g	15 01	230 1g	020 2	150 3g	15 03	020 3	070 2	380 2	16 02	110 1g	120 2	520 1g	15 02
26	26 01 g	120 3	380 1	04 02	230 1g	020 2	150 3g	11 01	240 2g	070 2	400 1g	09 01	240 2g	010 2	354 3g	04 07
27	02 01 g	050 1g	440 2g	01 01	660 2	070 1g	580 1g	15 03	110 1g	120 2	520 1g	15 02	260 1g	120 3	380 1	04 02
28	30 02	050 1g	180 1g	03 01	680 2	040 1g	530 1	13 03	241 7	080 1	150 2	12 02	020 1g	050 1g	440 2g	04 01
29	02 01 g	160 1	440 3	07 01	020 1g	160 1	450 1g	11 01	020 6	010 2	590 1	04 05	310 1	040 1g	350 1g	08 02
30	03 01 g	070 1g	080 1g	03 01	250 1	120 3	180 1g	15 01	110 1g	070 2	390 1g	08 03	020 1g	040 1g	350 1g	04 07
31	24 02 g	040 1g	350 2	11 04	260 1g	030 4	080 1g	13 04	240 2g	070 2	380 2	15 02	010 1g	060 2	570 1	07 01
32	02 01 g	030 3g	150 1g	04 01	020 1g	040 1g	530 1	13 03	020 1g	150 2g	400 1g	11 01	020 1g	080 2	140 2	01 02
33	02	070	180	11	030	040	350	11	240	030	130	12	680	030	400	04

【 0 1 8 4】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

	01 g	1g	1g	04	1g	1g	1g	01	2g	4	1	02	1g	4	2g	07
34	24 02 g	070 1g	080 1g	03 01	300 1	170 1g	420 1	13 02	110 1g	070 2	400 1g	08 03	240 2g	030 4	400 2g	04 04
35	02 01 g	040 1g	350 1g	01 01	020 1g	070 2	070 2g	15 01	110 1g	070 2	400 1g	09 01	030 1g	070 2	070 2g	01 01
36	02 01 g	010 2	270 5g	01 01	680 2	040 1g	530 1	13 02	240 2g	010 2	590 1	04 05	240 2g	080 1	480 1g	04 04
37	68 02	080 2	140 2	13 03	020 1g	070 1g	080 1g	03 01	240 2g	010 2	460 1	08 03	300 1	170 1g	420 1	03 02
38	32 01	080 2	140 1	07 01	030 1g	060 2	580 2	07 01	020 1g	010 2	540 1	04 05	690 1	010 2	550 1	11 01
39	11 01 g	070 2	070 2g	15 01	330 3	040 1g	530 1	15 03	020 3	070 2	380 2	08 03	020 4	150 2g	510 1g	04 11
40	03 01 g	070 2	070 2g	07 01	020 1g	160 1	450 1g	13 01	290 1g	150 5	070 5g	08 03	010 1g	120 2	520 1g	15 02
41	02 05	060 2	500 1	07 01	300 2	180 1g	570 3	13 01	240 2g	040 1g	400 1g	04 03	240 2g	070 1g	080 1g	03 01
42	01 01 g	070 1g	080 1g	01 01	330 3	140 2	151 6	01 02	010 1g	070 1g	151 7	13 02	020 1g	150 2g	510 1g	11 01
43	02 01 g	030 4	400 1g	15 01	230 1g	060 2	450 1g	11 01	110 1g	080 1	150 2	15 01	240 2g	080 2	140 2	01 02
44	03 01 g	070 2	070 2g	04 01	020 1g	160 1	510 1g	13 03	240 2g	030 4	130 1	15 01	680 2	040 1g	530 1	01 02
45	03 01 g	070 2	070 2g	13 01	020 1g	160 1	450 1g	03 02	020 7g	010 2	460 1	04 05	020 1g	050 1g	440 2g	07 01
46	02 01 g	070 2	070 2g	07 01	740 1g	020 2	150 3g	11 01	020 1g	010 2	540 1	08 03	260 1g	080 2	140 1	07 01
47	01 01 g	070 1g	080 1g	04 01	030 1g	060 2	580 2	13 01	340 1	150 2g	400 2g	15 02	240 2g	070 2	390 6	04 04
48	03 01 g	080 2	140 2	13 02	020 1g	160 1	450 1g	01 02	110 1g	040 1g	350 1g	01 01	260 1g	050 1g	440 2g	04 02
49	02 01 g	030 4	400 1g	08 01	010 1g	060 2	570 1	07 01	010 1g	070 2	080 1g	03 01	030 1g	160 1	510 1g	07 01
50	26 01 g	120 3	380 1	13 01	230 1g	070 2	070 2g	09 01	020 1g	030 3g	151 1	09 01	240 2g	030 6	400 2g	08 02

【0185】

表 1 1 は、米国民における最も頻度の高い高解像度 H L A - A - C - B - D R B 1 - D Q B 1 ハプロタイプを記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系 [パシフィックアイランダーを含む]、およびヒスパニック系 [ラテンアメリカ人]）について、上位 5 0 の最も頻度の高い H L A - A - C - B - D R B 1 - D Q B 1 ハプロタイプが示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物（M a i e r s e t a l . , 2 0 0 7 , H u m a n I m m u n o l o g y , 6 8 : 7 7 9 - 7 8 8）からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髓バンクウェブサイト（The National Marrow Donor Program W

ebsite) (US) : bioinformatics.bethematchclinical.orgから編集)に基づいてランク付けされる。使用されるアノテーション (例えば、HLA-Aの場合の0201gは、HLA-A*02:01と同じであり、これは、2010年のWHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、(HLA接頭辞) - 遺伝子*対立遺伝子群/ファミリー: 具体的なHLAタンパク質を示す) ことに留意されたい。例えば、A*0201gは、A*02:01となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義DNA置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない (さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい: hla.alleles.org)。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Majers, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子群を指す。

【0186】

【表27】

表 11

表示集団中の最も高頻度のHLA-A-C-B-DRB1-DQB1ハプロタイプ																				
ラン ク	ヨーロッパ系アメリカ人					アフリカ系アメリカ人					アジア系パシフィックアイランダー					ヒスパニック系				
	H L A- A	H L A- C	H L A- B	D R B 1	D Q B 1	H L A- A	H L A- C	H L A- B	D R B 1	D Q B 1	H L A- A	H L A- C	H L A- B	D R B 1	D Q B 1	H L A- A	H L A- C	H L A- B	D R B 1	D Q B 1
1	01 01 g	07 01 g	08 01 g	0 3 0 1	0 2 0 1 g	30 01	17 01 g	42 01	0 3 0 2	0 4 0 2	33 03	03 02	58 01 g	0 3 0 1	0 2 0 1 g	01 01 g	07 01 g	08 01 g	0 3 0 1	0 2 0 1 g
2	03 01 g	07 02	07 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2	01 01 g	07 01 g	08 01 g	0 3 0 1	0 2 0 1 g	02 07 g	01 02	46 01	0 9 0 1	0 3 0 3	29 02	16 01	44 03	0 7 0 1	0 2 0 1 g
3	02 01 g	05 01 g	44 02 g	0 4 0 1	0 3 0 1 g	03 01 g	07 02	07 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2	33 03	07 01 g	44 03	0 7 0 1	0 2 0 1 g	03 01 g	07 02	07 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2
4	02 01 g	07 02	07 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2	33 03	04 01 g	53 01	0 8 0 4	0 3 0 1 g	11 01 g	08 01	15 02	1 2 0 2	0 3 0 1 g	33 01	08 02	14 02	0 1 0 2	0 5 0 1

【0187】

10

20

30

40

50

【表 2 8】

5	29 02	16 01	44 03	0 7 0 1	0 2 0 1 g	68 02	03 04	15 10	0 3 0 1	0 2 0 1 g	33 03	03 02	58 01 g	1 3 0 2	0 6 0 9	30 02	05 01 g	18 01 g	0 3 0 1	0 2 0 1 g
6	01 01 g	06 02	57 01	0 7 0 1	0 3 0 3	68 01 g	06 02	58 02	1 2 0 0 1 g	0 5 0 0 1	30 01	06 02	13 02	0 7 0 1	0 2 0 0 1 g	68 03	07 02	39 05	0 4 0 7	0 3 0 2
7	03 01 g	04 01 g	35 01 g	0 1 0 1	0 5 0 1	34 02	04 01 g	44 03	1 5 0 3	0 6 0 2	24 02 g	12 02	52 01 g	1 5 0 2	0 6 0 1	23 01 g	04 01 g	44 03	0 7 0 1	0 2 0 1 g
8	02 01 g	03 04	15 01 g	0 4 0 1	0 3 0 2	29 02	16 01	44 03	0 7 0 1	0 2 0 1 g	01 01 g	06 02	37 01	1 0 0 1	0 5 0 1	02 01 g	07 02	07 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2
9	02 01 g	03 04	40 01 g	1 3 0 2	0 6 0 4	68 02	07 02	07 02 g	1 5 0 3	0 6 0 2	01 01 g	06 02	57 01	0 7 0 1	0 3 0 3	24 02 g	04 01 g	35 02	1 1 0 4	0 3 0 1 g
10	02 01 g	07 01 g	08 01 g	0 3 0 1	0 2 0 1 g	36 01	04 01 g	53 01	1 1 0 1	0 6 0 2	02 07 g	01 02	46 01	0 8 0 3	0 6 0 1	24 02 g	07 02	39 06	1 4 0 6	0 3 0 1 g
11	30 01	06 02	13 02	0 7 0 1	0 2 0 1 g	02 01 g	05 01 g	44 02 g	0 4 0 1	0 3 0 1 g	29 01 g	15 05	07 05 g	1 0 0 1	0 5 0 1	02 01 g	04 01 g	35 12	0 4 0 7	0 3 0 2
12	02 01 g	06 02	57 01	0 7 0 1	0 3 0 3	23 01 g	04 01 g	44 03	1 5 0 3	0 6 0 2	33 03	14 03	44 03	1 3 0 2	0 6 0 4	30 01	06 02	13 02	0 7 0 1	0 2 0 1 g
13	24 02 g	07 02	07 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2	74 01 g	02 02	15 03 g	1 3 0 2	0 6 0 9	24 02 g	01 02	46 01	0 9 0 1	0 3 0 3	24 02 g	01 02	35 43 g	0 4 0 7	0 3 0 2
14	11 01 g	04 01 g	35 01 g	0 1 0 1	0 5 0 1	23 01 g	04 01 g	53 01	0 7 0 1	0 2 0 1 g	11 01 g	01 02	54 01	0 4 0 5	0 4 0 1	02 06	07 02	39 05	0 4 0 7	0 3 0 2
15	33 01	08 02	14 02	0 1 0 2	0 5 0 1	29 02	07 01 g	49 01	1 5 0 3	0 6 0 2	24 02 g	07 02	07 02 g	0 1 0 1	0 5 0 1	02 01 g	04 01 g	35 17	0 8 0 2	0 4 0 2

【0 1 8 8】

10

20

30

40

50

【表 2 9】

1 6	23 01 g	04 01 g	44 03	0 7 0 1	0 2 0 1 g	30 01	17 01 g	42 01	0 8 0 4	0 3 0 1 g	24 07	04 01 g	35 05	1 2 0 2	0 3 0 1 g	02 01 g	01 02	15 15	0 8 0 2	0 4 0 2
1 7	02 01 g	06 02	13 02	0 7 0 1 g	0 2 0 1 g	66 02	07 01 g	58 01 g	1 5 0 3	0 6 0 2	24 02 g	01 02	59 01	0 4 0 5	0 4 0 1	24 02 g	03 04	40 02 g	0 4 0 4	0 3 0 2
1 8	31 01	03 04	40 01 g	0 4 0 4	0 3 0 2	02 01 g	16 01	45 01 g	1 5 0 3	0 6 0 2	26 01 g	07 02	08 01 g	0 3 0 1 g	0 2 0 1 g	02 01 g	12 02	52 01 g	1 5 0 2	0 6 0 1
1 9	01 01 g	07 02	07 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2	68 02	04 01 g	53 01	1 5 0 3	0 6 0 2	11 01 g	07 02	38 02	1 5 0 2	0 5 0 2	25 01	12 03	18 01 g	1 5 0 1	0 6 0 2
2 0	02 01 g	03 03 g	15 01 g	1 3 0 1	0 6 0 3	23 01 g	02 02	15 03 g	0 7 0 1 g	0 2 0 1 g	11 01 g	03 04	13 01	1 5 0 1	0 6 0 1	02 01 g	04 01 g	35 12	0 8 0 2	0 4 0 2
2 1	25 01	12 03	18 01 g	1 5 0 1	0 6 0 2	25 01	12 03	18 01 g	1 5 0 1	0 6 0 2	02 01 g	03 04	13 01	1 2 0 2	0 3 0 1 g	02 01 g	05 01 g	44 02 g	1 3 0 1	0 6 0 3
2 2	02 01 g	05 01 g	44 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2	02 01 g	07 02	07 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2	02 03	07 02	38 02	1 6 0 2	0 5 0 2	68 02	08 02	14 02	0 1 0 2	0 5 0 1
2 3	03 01 g	07 02	07 02 g	0 1 0 1	0 5 0 1	23 01 g	02 02	15 03 g	1 5 0 3	0 6 0 2	24 02 g	07 02	40 01 g	0 9 0 1	0 3 0 3	69 01	01 02	55 01	1 1 0 1	0 3 0 1 g
2 4	01 01 g	07 01 g	08 01 g	1 5 0 1	0 6 0 2	02 02	17 01 g	42 01	0 3 0 2	0 4 0 2	11 01 g	01 02	46 01	0 9 0 1	0 3 0 3	11 01 g	01 02	27 05 g	0 1 0 1	0 5 0 1
2 5	02 01 g	05 01 g	44 02 g	1 3 0 1	0 6 0 3	30 02	08 02	14 02	1 5 0 3	0 6 0 2	11 01 g	12 02	52 01 g	1 5 0 2	0 6 0 1	02 04	15 02 g	51 01 g	0 4 1 1	0 4 0 2
2 6	26 01 g	12 03	38 01	0 4 0 2	0 3 0 2	74 01 g	07 01 g	57 03	1 3 0 3	0 2 0 1 g	24 02 g	01 02	54 01	0 4 0 5	0 4 0 1	11 01 g	12 02	52 01 g	1 5 0 2	0 6 0 1

【0 1 8 9】

10

20

30

40

50

【表 3 0】

27	0201g	0501g	4402g	0101	0501	3002	0701g	0801g	0301	0201g	1502g	4001g	1101	0301g	0602	5701	0701	0303	
28	3002	0501g	1801g	0301	0201g	1101g	0702	0702g	1501	0602	1101g	0401g	1501g	0406	0301g	0401g	3501g	0101	0501
29	0301g	0701g	0801g	0301	0201g	2902	0401g	5301	0701	0203	0702	3802	0803	0601	0101g	0701g	0801g	1301	0603
30	2402g	0401g	3502	1104	0301g	6802	0701g	5801g	1503	0602	2402g	0102	5401	0803	0201g	0701g	0801g	0301	0201g
31	0201g	1601	4403	0701	0201g	3002	1601	7801	0701	0203	0303g	3501g	1501	0602	2601g	1203	3801	0402	0302
32	2402g	0701g	0801g	0301	0201g	3001	1701g	4201	1503	0602	0206	1402	5101g	0901	0201g	0401g	4403	0701	0201g
33	0201g	0701g	1801g	1104	0301g	7401g	0401g	5301	1101	0602	2402g	0401g	4001g	0403	1101g	0701g	4901	0405	0302
34	0201g	0401g	3501g	0101	0501	0201g	0701g	4901	1503	0602	1101g	0801	1502	1501	3001	1701g	4201	0302	0402
35	0201g	0102	2705g	0101	0501	2301g	0401g	5301	0301	0201g	0701g	1517	0302	2402g	0801	4801g	0404	0404	0302
36	6802	0802	1402	1303	0301g	2301g	1701g	4201	0302	0402	1101g	0702	3901g	0803	0201g	0102	1501g	0802	0402
37	3201	0802	1401	0701	0201g	2301g	0702	0702g	1503	0602	2402g	1402	5101g	0901	0201g	0102	5601	0101	0501

【0 1 9 0】

10

20

30

40

【表 3 1】

3 8	03 01 g	07 02	07 02 g	1 3 0 1	0 6 0 3	23 01 g	04 01 g	44 03	0 7 0 1	0 2 0 1 g	11 02	08 01	15 02	1 2 0 2	0 3 0 1 g	02 01 g	05 01 g	44 02 g	0 4 0 1	0 3 0 1 g
3 9	11 01 g	07 02	07 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2	02 01 g	16 01	51 01 g	1 3 0 3	0 3 0 1 g	29 01 g	15 05	07 05 g	0 8 0 3	0 3 0 1 g	11 01 g	07 02	07 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2
4 0	02 01 g	03 03 g	15 01 g	0 4 0 1	0 3 0 2	68 02	04 01 g	53 01	1 1 0 2	0 3 0 1 g	24 17	08 01	15 02	1 2 0 2	0 3 0 1 g	03 01 g	08 02	14 02	0 1 0 2	0 5 0 1
4 1	02 01 g	03 04	40 01 g	1 5 0 1	0 6 0 2	02 01 g	05 01 g	44 02 g	1 5 0 1	0 6 0 2	11 01 g	07 02	40 01 g	0 8 0 3	0 6 0 1	03 01 g	16 01	51 01 g	0 7 0 1	0 2 0 1 g
4 2	01 01 g	07 01 g	08 01 g	0 1 0 1	0 5 0 1	66 01	06 02	58 02	1 3 0 1	0 3 0 3	24 02 g	07 02	38 02	0 9 0 1	0 3 0 3	30 10	06 02	41 01	0 4 0 5	0 2 0 1 g
4 3	02 05	06 02	50 01	0 7 0 1	0 2 0 1	03 01 g	04 01 g	35 01 g	1 5 0 3	0 6 0 2	24 02 g	03 02	58 01 g	0 3 0 1	0 2 0 1	68 01 g	08 01	48 01 g	0 4 0 4	0 3 0 2
4 4	02 01 g	03 04	40 01 g	0 8 0 1	0 4 0 2	33 01	08 02	14 02	0 1 0 2	0 5 0 1	11 01 g	07 02	40 01 g	0 9 0 1	0 3 0 3	24 02 g	07 02	39 06	0 4 0 4	0 3 0 2
4 5	03 01 g	08 02	14 02	1 3 0 2	0 6 0 9	02 01 g	16 01	45 01 g	0 9 0 1	0 2 0 1 g	02 11 g	15 02 g	40 06	1 5 0 1	0 6 0 1	26 01 g	05 01 g	44 02 g	0 4 0 2	0 3 0 2
4 6	26 01 g	12 03	38 01	1 3 0 1	0 6 0 3	33 03	02 02	15 03 g	1 1 0 1	0 3 0 1 g	24 02 g	14 02	51 01 g	0 8 0 3	0 6 0 1	32 01	08 02	14 01	0 7 0 1	0 2 0 1 g
4 7	02 01 g	03 04	40 01 g	0 4 0 4	0 3 0 2	02 01 g	07 01 g	49 01	0 3 0 1	0 2 0 1 g	33 03	03 02	58 01 g	1 1 0 1	0 3 0 1 g	02 06	03 06	40 02 g	0 8 0 2	0 4 0 2
4 8	03 01 g	07 02	07 02 g	0 7 0 1	0 2 0 1	26 01 g	03 04	08 01 g	1 3 0 4	0 3 0 1 g	11 01 g	08 01	15 02	0 9 0 1	0 3 0 3	31 01	03 04	40 01 g	0 4 0 4	0 3 0 2

10

20

30

40

【 0 1 9 1】

【表 3 2】

4 9	02 01 g	07 02	07 02 g	0 1 0 1	0 5 0 1	30 01	07 02	07 02 g	1 5 0 3	0 6 0 2	02 01 g	01 02	54 01	0 4 0 5	0 4 0 1	03 01 g	07 02	07 02 g	0 1 0 1	0 5 0 1
5 0	01 01 g	07 01 g	08 01 g	1 3 0 1	0 6 0 3	23 01 g	02 02	18 01 g	0 7 0 1	0 2 0 1 g	03 01 g	12 02	52 01 g	1 5 0 2	0 6 0 1	23 01 g	04 01 g	44 03	0 4 0 5	0 3 0 2

10

【0 1 9 2】

表 1 2 は、米国民およびユダヤ系集団における最も頻度の高い高解像度 HLA-B-DRB1 ハプロタイプを記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系 [パシフィックアイランダーを含む]、ヒスパニック系 [ラテンアメリカ人]、およびユダヤ系統の人）について、上位 50 の最も頻度の高い HLA-B-DRB1 ハプロタイプが示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物 [Maier et al., 2007, Human Immunology, 68: 779-788 からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髓バンクウェブサイト (The National Marrow Donor Program Website) (US): bioinformatics.bethematchclinical.org から編集) に基づいてランク付けされる。ユダヤ系の高解像度 HLA-B-DRB1 ハプロタイプ頻度は、以下：全米骨髓バンクウェブサイト (National Marrow Donor Program Website) (US) URL: bioinformatics.bethematchclinical.org から得たものである。ユダヤ系集団についての HLA-A-B-DRB1 ハプロタイプ頻度データが、Hadassah Registry-Jerusalem, Israel (Klitz et al., 201, Tissue Antigens, 76 (6): 442-58) からのドナーサンプルから得られたものであることに留意されたい。使用されるアノテーション（例えば、HLA-DRB1 の場合の 1501 は、HLA-DRB1*15:01 と同じであり、これは、2010 年の WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System により採用された新命名法に基づき、(HLA 接頭辞) - 遺伝子*対立遺伝子群/ファミリー：具体的な HLA タンパク質を示す）ことに留意されたい。例えば、DRB1*1501 は、DRB1*15:01 となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義 DNA 置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない（さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい: hla.alleles.org）。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Maier, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表 1 に定義される対立遺伝子群を指す。

20

30

40

【0 1 9 3】

50

【表 3 3】

表 12

表示集団中の最も高頻度のHLA-B-DRB1 ハプロタイプ										
ランク	ヨーロッパ系 アメリカ人		アフリカ系 アメリカ人		アジア系パシフィック アイランダー		ヒスパニック系		ユダヤ系	
	HLA -B	HLA- DRB1	HLA -B	HLA- DRB1	HLA -B	HLA- DRB1	HLA -B	HLA- DRB1	HLA -B	HLA- DRB1
1	0801 g	0301	4201	0302	4403	0701	4403	0701	3502	1104

10

【 0 1 9 4】

20

30

40

50

【表 3 4】

2	0702 g	1501	5301	0804	0702 g	1501	0702 g	1501	3801	0402
3	4403	0701	0801 g	0301	0801 g	0301	0801 g	0301	5201	1502
4	4402 g	0401	4403	1503	1402	0102	1402	0102	1402	0102
5	3501 g	0101	5301	1101	3905	0407	3905	0407	1801	1104
6	5701	0701	5802	1201g	1801 g	0301	1801 g	0301	0801	0301
7	1501 g	0401	4403	0701	4002 g	0407	4002 g	0407	1302	0701
8	1302	0701	5301	1503	4801 g	0404	4801 g	0404	5001	0701
9	1402	0102	0702 g	1501	5201 g	1502	5201 g	1502	3801	1401
10	4001 g	0404	1510	0301	3906	1406	3906	1406	3801	1301
11	4001 g	1302	0702 g	1503	3501 g	0802	3501 g	0802	4101	0701
12	1501 g	1301	1503 g	1101	1302	0701	1302	0701	4403	0701
13	2705 g	0101	1503 g	0701	3517	0802	3517	0802	1517	1302
14	1801 g	0301	4901	1503	3512	0802	3512	0802	4402	0402
15	4402 g	1301	5301	1303	3501 g	0101	3501 g	0101	3503	1201
16	0702 g	0101	5301	1302	4002 g	0802	4002 g	0802	3501	0402
17	1801 g	1104	5801 g	1503	5101 g	0701	5101 g	0701	0705	1001
18	5101 g	1101	5802	1301	3502	1104	3502	1104	3508	0403
19	3502	1104	5703	1303	4002 g	0404	4002 g	0404	0702	1501
20	1801 g	1501	5301	0701	5701	0701	5701	0701	5101	1101
21	4402 g	0101	3501 g	0302	3501 g	0407	3501 g	0407	3501	1104
22	3801	1301	1503 g	1302	2705 g	0101	2705 g	0101	4901	1104
23	4402 g	1501	1503 g	1503	5001	0701	5001	0701	4102	1303
24	0702 g	0401	1801 g	0701	1401	0701	1401	0701	4402	1104
25	4402 g	1101	1516	0102	5101 g	0411	5101 g	0411	4402	1301
26	5201 g	1502	0702 g	0901	3512	0407	3512	0407	5501	1101
27	1401	0701	3501 g	1302	1515	0802	1515	0802	1801	0301
28	0801 g	1501	4402 g	0401	4402 g	1301	4402 g	1301	3801	1101

10

20

30

40

【 0 1 9 5 】

【表 3 5】

29	0702 g	0701	0702 g	1101	3543 g	0407	3543 g	0407	3801	1104
30	5101 g	1301	3501 g	1503	4002 g	0411	4002 g	0411	1801	0701
31	1501 g	0101	1801 g	0301	5101 g	1101	5101 g	1101	1402	0701
32	3801	0402	0801 g	1304	1801 g	1501	1801 g	1501	3501	1401
33	0702 g	1301	4201	0804	4402 g	0402	4402 g	0402	5701	1305
34	5101 g	0101	5703	1301	5101 g	0802	5101 g	0802	5201	1104
35	4001 g	1501	5301	0102	3501 g	1301	3501 g	1301	4901	1101
36	1501 g	1501	5801 g	0701	3801	0402	3801	0402	3801	0701
37	5001	0701	1402	1503	4402 g	0401	4402 g	0401	5301	1302
38	5501	1401g	8101 g	1201g	3501 g	1402	3501 g	1402	4101	1305
39	4001 g	0401	1801 g	1101	3801	1301	3801	1301	5701	0701
40	1801 g	1101	4501 g	1503	1801 g	1104	1801 g	1104	5301	0301
41	4402 g	1201g	4501 g	0701	1402	0301	1402	0301	4101	0405
42	5101 g	1501	5703	1503	4901	0405	4901	0405	5001	0301
43	3701	1001	4501 g	0102	4403	1501	4403	1501	3801	1302
44	2705 g	0401	5301	1102	5101 g	1301	5101 g	1301	4102	1104
45	0702 g	0404	3501 g	1102	4002 g	1402	4002 g	1402	5801	1302
46	1402	1303	5802	1102	1503 g	0701	1503 g	0701	4101	0301
47	4001 g	0101	0702 g	1302	4001 g	0404	4001 g	0404	5801	0701
48	1402	1302	1501 g	0401	1501 g	0802	1501 g	0802	4901	0701
49	0702 g	1101	4501 g	1101	0702 g	0101	0702 g	0101	3701	1104

【0 1 9 6】

表 1 3 は、米国民における最も頻度の高い高解像度 H L A - C - B ハプロタイプを記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系 [パシフィックアイランダーを含む]、およびヒスパニック系 [ラテンアメリカ人]）について、上位 5 0 の最も頻度の高い H L A - C - B ハプロタイプが示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物（M a i e r s e t a l . , 2 0 0 7 , H u m a n I m m u n o l o g y , 6 8 : 7 7 9 - 7 8 8）からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髄バンクウェブサイト（The National Marrow Donor Program Website）（US）：bioinformatics.bethematchclinical.orgから編集）に基づいてランク付けされる。使用されるアノテーション（例えば、H L A - C の場合の 0 7 0 1 g は、H L A - C * 0 7 : 0 1 と同じであり、これは、2 0 1 0 年の W H O N o m e n c l a t u r e C

ommittee for Factors of the HLA Systemにより採用された新命名法に基づき、(HLA接頭辞)－遺伝子*対立遺伝子群/ファミリー：具体的なHLAタンパク質を示す)ことに留意されたい。例えば、C*0701gは、C*07:01となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義DNA置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない(さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい：hla.alleles.org)。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Mairers, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子群を指す。接尾辞「N」は、発現の変化を示すのに用いられる(前述の命名法リンクを参照)。

【0197】

【表36】

表13

表示集団中の最も高頻度のHLA-C-B ハプロタイプ								
ランク	ヨーロッパ系 アメリカ人		アフリカ系 アメリカ人		アジア系パシフィック アイランダー		ヒスパニック系	
	HLA-C	HLA-B	HLA-C	HLA-B	HLA-C	HLA-B	HLA-C	HLA-B
1	702	0702g	0401g	5301	0102	4601	0401g	3501g
2	0701g	0801g	0202	1503g	0302	5801g	0702	0702g
3	0501g	4402g	0702	0702g	1402	5101g	0802	1402
4	304	4001g	1701g	4201	0702	3802	0701g	0801g
5	0401g	3501g	0401g	3501g	0801	1502	1601	4403
6	602	5701	0602	5802	1202	5201g	0501g	4402g
7	0303g	1501g	1601	4501g	0702	4001g	0304	4002g
8	1601	4403	0401g	4403	0102	5401	0701g	4901
9	802	1402	0701g	0801g	0304	1301	1502g	5101g
10	602	1302	0701g	4901	0702	0702g	0702	3905
11	304	1501g	0304	1510	0701g	4403	0702	3906
12	1203	3801	0701g	5801g	0304	4001g	1203	3801
13	0701g	1801g	0802	1402	0602	1302	0801	4801g
14	1502g	5101g	0701g	5703	0401g	3501g	0401g	3512
15	202	2705g	0501g	4402g	0602	5701	0401g	4403
16	1203	1801g	0304	4001g	1502g	4006	0501g	1801g
17	0303g	5501	1601	5201g	0303g	3501g	0401g	3517
18	102	2705g	1601	7801	0304	4002g	0602	5001
19	0401g	4403	1601	5101g	0401g	3503	0401g	5301
20	602	3701	1801g	5703	0702	0801g	0202	1503g
21	0701g	4901	1402	1516	0801	4801g	0303g	1501g
22	0401g	3503	0501g	1801g	0602	3701	1202	5201g
23	0501g	1801g	1801g	8101g	1403	4403	0304	4001g
24	1402	5101g	0602	5301	1505	0705g	1203	1801g

【0198】

【表 3 7】

25	0401g	3502	1505	0702g	0801	4006	0602	1302
26	0704g	4402g	1601	4403	0401g	1501g	0401g	3502
27	1202	5201g	0302	5801g	0702	3901g	0401g	3503
28	802	1401	1601	3501g	0303g	1501g	0305	4002g
29	202	4002g	0602	4501g	0401g	3505	0701g	5801g
30	602	5001	0202	1801g	1502g	5101g	0102	2705g
31	1203	3901g	0304	0801g	1203	3503	0102	1501g
32	102	5101g	0804	8101g	0102	5901	0602	5701
33	202	5101g	0602	1302	0102	5502	0802	1401
34	102	5601	0602	5001	1502g	4002g	1701g	4101
35	702	3906	1701g	4202	0501g	4402g	1402	5101g
36	0401g	1501g	0802	1401	0602	5001	0701g	1801g
37	602	4501g	1203	3910	0303g	1511	0102	3543g
38	1701g	4102	1701g	4102	1602	5101g	0306	4002g
39	0401g	3508	0702	0705g	1502g	4001g	0602	4501g
40	1203	3503	0701g	0702g	0401g	4001g	0102	1515
41	0701g	5801g	0303g	1501g	0702	0705g	0401g	3508
42	702	3901g	0701g	4403	0702	1535	0303g	5201g
43	0401g	5301	0501g	1517	1202	2704	0303g	5501
44	1701g	4101	0704g	1801g	0102	5601	0202	2705g
45	0701g	1517	0701g	1801g	0102	5501	1601	4501g
46	202	2702	0602	5701	0102	2705g	1701g	4201
47	202	4405	1601	1516	0701g	1517	0701g	1517
48	602	4701	0602	3701	0704g	1518	1701g	4102
49	102	1501g	1502g	5101g	1203	3801	0304	4008
50	1505	0705g	0303g	5501	0403	1525	0202	5101g

【0199】

表 1 4 は、米国民における最も頻度の高い高解像度 HLA-C-B-DRB1-DQB1 ハプロタイプを記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系 [パシフィックアイランダーを含む]、およびヒスパニック系 [ラテンアメリカ人]）について、上位 50 の最も頻度の高い HLA-C-B-DRB1-DQB1 ハプロタイプが示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物 [Majers et al., 2007, Human Immunology, 68: 779-788 からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髄バンクウェブサイト (The National Marrow Donor Program Website) (US): bioinformatics.bethematchclinical.org から編集) に基づいてランク付けされる。使用されるアノテーション（例えば、HLA-DRB1 の場合の 1501 は、HLA-DRB1*15:01 と同じであり、これは、2010 年の WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System により採用された新命名法に基づき、(HLA 接頭辞) - 遺伝子 * 対立遺伝子群 / ファミリー: 具体的な HLA タンパク質を示す) ことに留意されたい。例えば、DRB1*1501 は、DRB1*15:01 となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義 DNA 置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない（さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい: hla.alleles.org）。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物 [Majers, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution H

LA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表1に定義される対立遺伝子群を指す。

【0200】

【表38】

表 14

表示集団中の最も高頻度のHLA-C-B-DRB1-DQB1ハプロタイプ																
ランク	ヨーロッパ系アメリカ人				アフリカ系アメリカ人				アジア系パシフィックアイランダー				ヒスパニック系			
	HL A- C	HL A- B	D RB 1	D Q B1	HL A- C	HL A- B	D R B1	D Q B1	HL A- C	HL A- B	D RB 1	D Q B1	HL A- C	HL A- B	D R B1	D Q B1
1	070 1g	080 1g	03 01	02 01 g	170 1g	420 1	03 02	04 02	010 2	460 1	09 01	03 03	070 2	070 2g	15 01	06 02
2	070 2	070 2g	15 01	06 02	070 1g	080 1g	03 01	02 01 g	030 2	580 1g	03 01	02 01 g	070 1g	080 1g	03 01	02 01 g
3	050 1g	440 2g	04 01	03 01 g	070 2	070 2g	15 01	06 02	080 1	150 2	12 02	03 01 g	160 1	440 3	07 01	02 01 g
4	040 1g	350 1g	01 01	05 01	040 1g	530 1	08 04	03 01 g	120 2	520 1g	15 02	06 01	080 2	140 2	01 02	05 01
5	160 1	440 3	07 01	02 01 g	040 1g	440 3	15 03	06 02	070 1g	440 3	07 01	02 01 g	070 2	390 5	04 07	03 02
6	060 2	570 1	07 01	03 03	040 1g	530 1	15 03	06 02	030 2	580 1g	13 02	06 09	040 1g	440 3	07 01	02 01 g
7	060 2	130 2	07 01	02 01 g	060 2	580 2	12 01 g	05 01	010 2	540 1	04 05	04 01	050 1g	180 1g	03 01	02 01 g
8	030 4	150 1g	04 01	03 02	070 2	070 2g	15 03	06 02	060 2	130 2	07 01	02 01 g	120 2	520 1g	15 02	06 01
9	080 2	140 2	01 02	05 01	030 4	151 0	03 01	02 01 g	070 2	080 1g	03 01	02 01 g	060 2	130 2	07 01	02 01 g
10	030 4	400 1g	04 04	03 02	070 1g	490 1	15 03	06 02	010 2	460 1	08 03	06 01	040 1g	350 1g	01 01	05 01
11	030 4	400 1g	13 02	06 04	020 2	150 3g	11 01	03 01 g	060 2	570 1	07 01	03 03	070 2	390 6	14 06	03 01 g
12	040 1g	440 3	07 01	02 01 g	070 1g	580 1g	15 03	06 02	060 2	370 1	10 01	05 01	080 1	480 1g	04 04	03 02
13	030 3g	150 1g	13 01	06 03	040 1g	530 1	11 01	06 02	030 4	130 1	12 02	03 01 g	040 1g	350 2	11 04	03 01 g
14	070 2	070 2g	01 01	05 01	040 1g	350 1g	15 03	06 02	070 2	380 2	15 02	05 02	040 1g	351 2	04 07	03 02

【0201】

10

20

30

40

50

【表 3 9】

15	050 1g	180 1g	03 01	02 01 g	040 1g	440 3	07 01	02 01 g	140 2	510 1g	09 01	03 03	030 4	400 2g	04 04	03 02
16	050 1g	440 2g	13 01	06 03	160 1	440 3	07 01	02 01 g	070 2	400 1g	09 01	03 03	010 2	354 3g	04 07	03 02
17	120 3	380 1	13 01	06 03	040 1g	530 1	03 01	02 01 g	150 5	070 5g	10 01	05 01	040 1g	351 7	08 02	04 02
18	010 2	270 5g	01 01	05 01	070 1g	570 3	15 03	06 02	080 1	400 6	09 01	03 03	080 2	140 1	07 01	02 01 g
19	050 1g	440 2g	15 01	06 02	020 2	180 1g	07 01	02 01 g	070 2	070 2g	01 01	05 01	070 1g	490 1	04 05	03 02
20	120 2	520 1g	15 02	06 01	020 2	150 3g	13 02	06 09	140 3	440 3	13 02	06 04	040 1g	351 2	08 02	04 02
21	040 1g	350 2	11 04	03 01 g	020 2	150 3g	07 01	02 01 g	010 2	590 1	04 05	04 01	050 1g	440 2g	13 01	06 03
22	070 1g	180 1g	11 04	03 01 g	050 1g	440 2g	04 01	03 01 g	040 1g	150 1g	04 06	03 02	060 2	570 1	07 01	03 03
23	080 2	140 1	07 01	02 01 g	170 1g	420 1	08 04	03 01 g	030 3g	350 1g	15 01	06 02	060 2	500 1	07 01	02 01 g
24	050 1g	440 2g	01 01	05 01	070 2	070 2g	09 01	02 01 g	030 4	130 1	15 01	06 01	050 1g	440 2g	04 02	03 02
25	120 3	180 1g	15 01	06 02	040 1g	530 1	07 01	02 01 g	150 2g	400 6	15 01	06 01	010 2	151 5	08 02	04 02
26	070 1g	080 1g	15 01	06 02	080 4	810 1g	12 01 g	05 01	040 1g	350 5	12 02	03 01 g	030 4	400 2g	04 07	03 02
27	070 2	070 2g	13 01	06 03	030 4	080 1g	13 04	03 01 g	030 4	400 1g	11 01	03 01 g	040 1g	350 1g	03 01	02 01 g
28	120 3	380 1	04 02	03 02	160 1	450 1g	15 03	06 02	040 1g	350 1g	01 01	05 01	010 2	150 1g	08 02	04 02
29	030 4	400 1g	15 01	06 02	020 2	150 3g	15 03	06 02	070 2	380 2	15 02	05 01	050 1g	440 2g	04 01	03 01 g
30	060 2	500 1	07 01	02 01 g	040 1g	350 1g	11 02	03 01 g	070 2	380 2	16 02	05 02	010 2	270 5g	01 01	05 01
31	070 2	070 2g	07 01	02 01 g	070 1g	570 3	13 03	02 01 g	070 2	400 1g	08 03	06 01	070 1g	151 7	13 02	06 04
32	030 3g	150 1g	04 01	03 02	060 2	580 2	13 01	03 03	070 2	380 2	08 03	06 01	120 3	180 1g	15 01	06 02
33	030 3g	550 1	14 01 g	05 03	080 2	140 2	07 01	02 01 g	080 1	150 2	15 01	06 01	070 1g	080 1g	13 01	06 03

10

20

30

40

【 0 2 0 2】

50

【表 4 0】

34	070 4g	440 2g	11 01	03 01 g	160 1	450 1g	01 02	05 01	070 2	380 2	09 01	03 03	150 2g	510 1g	04 11	04 02
35	060 2	370 1	10 01	05 01	180 1g	570 3	13 01	05 01	070 2	390 1g	08 03	06 01	120 3	380 1	04 02	03 02
36	050 1g	440 2g	12 01 g	03 01 g	080 2	140 1	07 01	02 01 g	030 4	400 2g	09 01	03 03	040 1g	350 1g	08 02	04 02
37	070 2	070 2g	04 04	03 02	160 1	780 1	07 01	02 01 g	030 4	400 2g	15 01	06 02	170 1g	420 1	03 02	04 02
38	080 2	140 2	13 03	03 01 g	080 2	140 2	15 03	06 02	070 2	070 2g	15 01	06 02	070 2	070 2g	01 01	05 01
39	070 2	070 2g	11 01	03 01 g	060 2	130 2	07 01	02 01 g	010 2	540 1	08 03	06 01	010 2	560 1	01 01	05 01
40	080 2	140 2	13 02	06 09	050 1g	180 1g	03 01	02 01 g	150 2g	400 1g	11 01	03 01 g	040 1g	530 1	13 02	06 04
41	030 4	400 1g	08 01	04 02	040 1g	350 1g	01 01	05 01	140 2	510 1g	04 05	04 01	030 6	400 2g	08 02	04 02
42	030 4	400 1g	01 01	05 01	160 1	510 1g	13 03	03 01 g	030 3g	150 1g	15 01	06 02	030 5	400 2g	04 07	03 02
43	070 2	070 2g	04 01	03 02	040 1g	530 1	13 03	02 01 g	040 1g	400 1g	04 03	03 02	040 1g	350 3	11 01	03 01 g
44	040 1g	350 1g	01 03	05 01	040 1g	530 1	03 02	04 02	060 2	500 1	07 01	02 01 g	040 1g	350 1g	14 02	03 01 g
45	070 2	070 2g	04 01	03 01 g	070 2	070 2g	11 02	03 01 g	040 1g	350 3	11 01	03 01 g	120 3	380 1	13 01	06 03
46	070 1g	080 1g	01 01	05 01	020 2	150 3g	03 01	02 01 g	080 1	150 2	09 01	03 03	030 4	400 1g	04 04	03 02
47	070 2	070 2g	14 01 g	05 03	160 1	450 1g	07 01	02 01 g	040 1g	152 7	04 06	03 02	010 2	550 1	11 01	03 01 g
48	030 3g	150 1g	15 01	06 02	040 1g	350 1g	03 02	04 02	150 2g	400 2g	15 02	05 02	030 4	400 2g	04 11	03 02
49	040 1g	350 1g	14 01 g	05 03	140 2	151 6	01 02	05 01	120 2	520 1g	04 03	03 02	160 1	510 1g	07 01	02 01 g
50	030 3g	150 1g	11 01	03 01 g	060 2	580 2	15 03	06 02	030 4	400 1g	08 03	06 01	070 1g	570 3	03 02	04 02

【0 2 0 3】

表 1 5 は、米国民における最も頻度の高い高解像度 H L A - D R B 1 - D Q B 1 ハプロタイプを記載する。表に示される各系統（例えば、ヨーロッパ系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア系 [パシフィックアイランダーを含む]、およびヒスパニック系 [ラテンアメリカ人]）について、上位 5 0 の最も頻度の高い H L A - C - B - D R B 1 - D Q B 1 ハプロタイプが示され、各列に示す系統群におけるその発生頻度（以前の刊行物 [Ma i e r s e t a l . , 2 0 0 7 , H u m a n I m m u n o l o g y , 6 8 : 7 7 9 - 7 8 8] からの高解像度頻度の最新版を掲載する全米骨髄バンクウェブサイト (T h e N a t i o n a l M a r r o w D o n o r P r o g r a m W e b s i t e) (

10

20

30

40

50

US) : bioinformatics.bethematchclinical.org から編集) に基づいてランク付けされる。使用されるアノテーション (例えば、HLA-DRB1 の場合の 1501 は、HLA-DRB1*15:01 と同じであり、これは、2010 年の WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System により採用された新命名法に基づき、(HLA 接頭辞) - 遺伝子*対立遺伝子群/ファミリー: 具体的な HLA タンパク質を示す) ことに留意されたい。例えば、DRB1*1501 は、DRB1*15:01 となる。この表に示す名称に関して、コード領域内の同義 DNA 置換を示すのに用いられる分野、非コード領域の違い、ならびに発現の変化を示すのに用いられる接尾辞は示していない (さらに詳しい情報については次のウェブサイトを参照されたい: hla.alleles.org)。この表で、「g」の接尾辞が付いた対立遺伝子名は、刊行物「Majers, M., Gragert, L., Klitz, W. High resolution HLA alleles and haplotypes in the US population. 2007」の表 1 に定義される対立遺伝子群を指す。

【0204】

【表 41】

表 15

ランク	ヨーロッパ系アメリカ人		アフリカ系アメリカ人		アジア系パシフィック アイランダー		ヒスパニック系	
	HLA- DRB1	HLA- DQB1	HLA- DRB1	HLA- DQB1	HLA- DRB1	HLA- DQB1	HLA- DRB1	HLA- DQB1
1	1501	0602	1503	0602	0901	0303	0701	0201g
2	0301	0201g	0701	0201g	1202	0301g	0301	0201g
3	0701	0201g	0301	0201g	0701	0201g	1501	0602
4	0101	0501	0302	0402	1101	0301g	0407	0302
5	1301	0603	0804	0301g	0301	0201g	0802	0402
6	1101	0301g	0102	0501	0803	0601	0404	0302
7	0401	0301g	1101	0301g	0405	0401	0101	0501
8	0401	0302	1101	0602	1501	0602	1101	0301g
9	0701	0303	1102	0301g	1502	0601	1301	0603
10	0404	0302	1201g	0501	1501	0601	0102	0501
11	1302	0604	1501	0602	0403	0302	1302	0604
12	1104	0301g	0901	0201g	1001	0501	1104	0301g
13	1401g	0503	1302	0609	0101	0501	1406	0301g
14	0801	0402	0101	0501	1404	0503	0402	0302
15	0102	0501	1301	0603	1502	0502	1402	0301g
16	1201g	0301g	1001	0501	1301	0603	0405	0302
17	1601	0502	1303	0301g	1201g	0301g	1001	0501
18	1303	0301g	1303	0201g	0406	0302	0403	0302
19	0402	0302	1302	0604	1502	0501	0411	0302
20	0407	0301g	1401g	0503	1602	0502	1102	0301g

【0205】

10

20

30

40

50

【表 4 2】

21	1001	0501	1302	0501	1302	0609	1602	0301g
22	0901	0303	0405	0302	1405	0503	0701	0303
23	1302	0609	1602	0502	0701	0303	1502	0601
24	1502	0601	1304	0301g	1302	0604	1503	0602
25	0103	0501	0401	0301g	1401g	0503	1401g	0503
26	1103	0301g	0401	0302	1401g	0502	1303	0301g
27	0403	0302	1301	0501	1501	0502	0401	0301g
28	0405	0302	1301	0303	1201g	0303	1201g	0301g
29	1305	0301g	1201g	0301g	0803	0301g	0302	0402
30	0103	0301g	0404	0302	0404	0302	1601	0502
31	0408	0301g	1101	0502	1104	0301g	0401	0302
32	1501	0603	0701	0303	0802	0302	0801	0402
33	1102	0301g	1104	0301g	0802	0402	1103	0301g
34	0803	0301g	1301	0609	1312	0301g	1304	0301g
35	0101	0504	1401g	0501	0405	0402	1302	0609
36	1104	0603	1301	0608	0401	0301g	0901	0201g
37	1602	0502	1101	0501	1506	0502	0103	0501
38	0403	0305	0801	0402	0801	0402	0411	0402
39	1501	0502	1401g	0602	1403	0301g	0804	0301g
40	0403	0304	0804	0402	1106	0301g	1101	0602
41	0804	0402	1302	0502	0402	0302	1201g	0501
42	0404	0402	1104	0502	1502	0503	0901	0303
43	0407	0302	0407	0302	0410	0402	0407	0301g
44	0405	0201g	0806	0602	0401	0302	1302	0501
45	0408	0304	1301	0604	1202	0502	1501	0502
46	1101	0302	0701	0302	0809	0402	0410	0402
47	1404	0503	1503	0201g	1406	0301g	1305	0301g
48	1101	0502	1202	0301g	0404	0402	0804	0402
49	0701	0301g	1110	0602	0405	0503	1303	0201g
50	0901	0201g	0302	0203	1201g	0302	0405	0201g

10

20

30

【0206】

ドナー細胞移植を改善するための方法

本明細書に記載される方法、組成物、および細胞を用いて、例えば、生着を高める、GVHDおよび移植片拒絶を予防する、前処置および免疫抑制の必要性を低減する、またはこれらの組合せによって、移植の結果（例えば、造血幹細胞移植）を改善することができる。例えば、本明細書に記載される方法、組成物、および細胞は、GVHDおよび／もしくは移植片拒絶を予防または治療する治療法、例えば、1回療法または複数回投与療法を提供する。

40

【0207】

一実施形態では、本療法は、対象、例えば、マッチする、もしくはマッチしない移植（例えばアローHSC T）後のレシピエントにおけるGVHDおよび／もしくは移植片拒絶の発生を予防、阻害、または低減する。別の実施形態では、本療法は、対象、例えば、マッチする、もしくはマッチしない移植（例えば、アローHSC T）後のレシピエントにおけるGVHDおよび／もしくは移植片拒絶の重症度を予防、阻害、または低減する。例えば、1つまたは複数のHLA遺伝子もしくは遺伝子座をロックアウトまたはロックダウンすることによる、1つまたは複数のドナーHLA対立遺伝子の不活性化、ならびに1つまたは複数のレシピエントマッチHLA対立遺伝子を、例えば、ロックインなどにより、ド

50

ナー細胞（例えば、本明細書に記載される細胞、例えば、HSPC）に供給することによって、対象、例えば、マッチする、部分的にマッチする、ハプロタイプが同一である、もしくはミスマッチの移植（例えば、アローHSC T）後のレシピエントにおけるGVHDおよび／もしくは移植片拒絶の発生または重症度を予防、阻害、または低減することができると思われる。

【0208】

一実施形態では、本療法は、対象、例えば、マッチもしくはミスマッチ移植（例えば、アローHSC T）後のレシピエントにおける骨髄破壊的前処置を予防、減少、またはその必要性をなくす、またはその強度を軽減する。

【0209】

一実施形態では、本療法は、対象、例えば、マッチする、もしくはマッチしないアローUCT後のレシピエントにおけるGVHDおよび／もしくは移植片拒絶の発生を予防、阻害、または軽減する。別の実施形態では、本療法は、対象、例えば、マッチする、もしくはマッチしないアローUCT後のレシピエントにおけるGVHDおよび／もしくは移植片拒絶の重症度を予防、阻害、または軽減する。一実施形態では、例えば、1つまたは複数のHLA遺伝子もしくは遺伝子座をロックアウトまたはロックダウンすることによる、1つまたは複数のドナーHLA対立遺伝子の不活性化、ならびに1つまたは複数のレシピエントマッチHLA対立遺伝子を、例えば、ノックインなどにより、ドナー細胞（例えば、本明細書に記載される細胞、例えば、HSPC）に供給することによって、対象、例えば、マッチする、部分的にマッチする、ハプロタイプが同一である、もしくはミスマッチアローUCT後のレシピエントにおけるGVHDおよび／もしくは移植片拒絶の発生または重症度を予防、阻害、または軽減することができると思われる。

【0210】

一実施形態では、対象、例えば、マッチもしくはミスマッチ移植（例えば、アローHSC T）後のレシピエントは、疾患、例えば、移植、例えば、HSC Tから利益を受け得る疾患のために、治療を受けているか、または治療を受けたことがある。例示的な疾患として、限定はしないが、悪性疾患、異常ヘモグロビン症、血液疾患、免疫不全、リソソーム蓄積症、または遺伝性もしくは後天性血液疾患が挙げられる。一実施形態では、対象は、抗がん療法、例えば、化学療法または放射線療法を受けているか、または治療を受けたことがある。

【0211】

一実施形態では、本療法は、GVHDの尤度を低下させる。一実施形態では、対象は、移植（例えば、HSC T）の前にレシピエント対象が受ける、より少ない用量の移植前（例えば、HSC T前）前処置レジメンを受ける。一実施形態では、本明細書に記載される方法に従って改変された移植（例えば、HSC T）による治療は、移植後の免疫抑制（例えば、タクロリムス、プレドニゾロン、プレドニゾン、および／またはその他のステロイド、ATG、CTLA4-Ig、MMF、ラパマイシン）の必要性および／または強度を低減する。一実施形態では、本明細書に記載される方法に従って修飾された移植（例えば、HSC T）による治療は、移植前のレシピエント対象の前処置の排除、またはその部分的な軽減を可能にする。

【0212】

一実施形態では、対象は、移植片（例えば、HSC T）で治療することができ、ドナー細胞は、レシピエントに対して延命効果を有することが期待される疾患を有する。一実施形態では、対象は、異常ヘモグロビン症、免疫不全、遺伝性もしくは後天性血液疾患、または悪性疾患を有する。一実施形態では、対象は、抗がん療法、例えば、化学療法または放射線療法を受けているか、または治療を受けたことがある。ドナー細胞（例えば、HSPC）が、レシピエント細胞に対して延命効果を有することが期待されると共に、疾患が、悪性疾患（例えば、IL2RG-SCID、IL7R-SCID、JAK3-SCID、またはファンコーニ貧血）ではないいずれかの疾患において、本明細書に記載される方法による治療は、移植前のレシピエントに対し、より低用量の前処置または前処置なしの

10

20

30

40

50

使用を可能にする。一実施形態では、対象は、他の場合、例えば、以下のいずれかの状態：複数の共存症、重度の共存症、GVHDもしくは移植片拒絶の高いリスク、高齢、または進行中の感染症の存在のために、移植には不適格となり得る。

【0213】

一実施形態では、対象は、血液悪性疾患の治療のために、移植片、例えば、HSCTを必要とする。一実施形態では、対象は、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄単球性白血病、または多発性骨髄腫を有する。

【0214】

一実施形態では、対象は、骨髄異形成症候群または骨髄増殖性腫瘍の治療のために、移植片、例えば、HSCTを必要とする。

【0215】

一実施形態では、対象は、固形腫瘍の治療のために、移植片、例えば、HSCTを必要とする。一実施形態では、対象は、ユーイング肉腫、神経芽細胞腫およびグリオーマ、または線維形成性小細胞腫瘍を有する。

【0216】

一実施形態では、対象は、非悪性病状の治療のために、移植片、例えば、HSCTを必要とする。一実施形態では、対象は、異常ヘモグロビン症、血液疾患、サラセミア（例えば、βサラセミアまたはαサラセミア）、鎌状赤血球症（SCD）、ファンコーニ貧血、再生不良性貧血、または先天性骨髄性ポルフィリン症を有する。

【0217】

一実施形態では、対象は、免疫不全の治療のために、移植片、例えば、HSCTを必要とする。一実施形態では、対象は、重症複合免疫不全（SCID）（例えば、オーメン（Omenn's）症候群、RAG-1 SCID、IL2-RG SCID、CD3-SCID、ADA-SCID、もしくはJAK3-SCID）、無ガンマグロブリン血症、ウィスコット・オルドリッチ（Wiskott-Aldrich）症候群、高免疫グロブリンを伴うX連鎖免疫不全M、X連鎖ブルトン型無ガンマグロブリン血症、露出リンパ球症候群、軟骨毛髪形成不全症、チェディアック・東（Chediak-Higashi）症候群、慢性肉芽腫症、コストマン（Kostman's）症候群、または白血病粘着不全症を有する。

【0218】

一実施形態では、対象は、リソソーム蓄積症の治療のために、移植片、例えば、HSCTを必要とする。一実施形態では、対象は、αマンノシドーシス、副腎白質ジストロフィー、ゴーシェ病、グロバイド細胞白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、ムコ多糖症（全タイプ）、ニーマン・ピック（Niemann-Pick）病、またはウォルマン（Wolmans）病を有する。

【0219】

一実施形態では、対象は、以下：先天性角化不全症、家族性血球貪食性リンパ組織球症、血友病A型、乳児性大理石骨病、骨形成不全症、またはシュワッハマン・ダイヤモンド（Schwachman-Diamond）症候群から選択される疾患の治療のために、移植片、例えば、HSCTを必要とする。

【0220】

一実施形態では、対象は、前処置を妨げる進行中の感染症または共存症を有する。一実施形態では、対象は、50歳を超える年齢であり、移植前の前処置を忍容できない。

【0221】

一実施形態では、対象は、後天性血液免疫不全症HIV/AIDSを有する。一実施形態では、ドナー細胞は、例えば、Cas9分子/gRNA分子媒介性不活性化（例えば、ノックアウトもしくはノックダウン）により、不活性化された1つまたは複数のHIV副受容体を有する（例えば、CCR5もしくはCXCR4）。HLA修飾ドナー細胞における1つまたは複数のHIV副受容体の不活性化は、造血再構成後の細胞子孫のHIV感染

10

20

30

40

50

を予防することができる。

【0222】

本明細書に記載される方法および組成物は、不適合性HLAを不活性化すると共に、レシピエントマッチHLAを供給して、ドナー細胞（例えば、アローHSPC）の移植後の潜在的病原体に対する免疫系の認識および防御における多様性および複雑性を維持するためのドナー細胞（例えば、HSPC）の修飾に重点を置く。本明細書に記載される方法および組成物はまた、GVHDをさらに予防すること（例えば、GVHDを被りやすい組織へのアロ反応性T細胞遊走を阻止するために、アローHSPCにおけるケモカイン受容体のノックアウトもしくは抑制）、生着を高め、ならびに／または血液性および非血液性双方の疾患を修正する（例えば、タンパク質置換療法のための分泌タンパク質をコードする遺伝子の導入、生着の向上および／または、万一悪性疾患の再発が将来起こる場合には、より高い用量の化学療法薬の支持のための化学療法耐性遺伝子をコードする遺伝子の導入）ことを目的として、ドナー細胞（例えば、アローHSPC）に対する追加的非HLA遺伝子修飾を含んでもよい。本明細書に記載される方法および組成物は、対象特異的HLA修飾が、対立遺伝子特異的（例えば、染色体6の1つのHLA遺伝子座での1コピー上での片アレル破壊）となり得るように、バイオインフォマティクスシステムを使用して、現在まで検出および報告されたHLA対立遺伝子に対する標的特異的gRNAを同定および評価する。

10

【0223】

遺伝子または遺伝子座を改変する方法

20

1つまたは複数の免疫原性遺伝子もしくは遺伝子座、例えば、HLA遺伝子もしくは遺伝子座、例えば、HLA対立遺伝子、ハプロタイプ、もしくは遺伝子座は、本明細書に記載される方法によって改変することができる。

【0224】

移植のためのHLAマッチ細胞を作製するためのCRISPR/Cas9関連アプローチ
ヒト対象への移植のためのHLAマッチ細胞（例えば、本明細書に記載される細胞、例えば、CD34⁺HSPC）は、複数ステップ（例えば、2ステップ）プロセスにより、マッチしない、部分的にマッチする、またはハプロタイプが同一のドナー細胞（例えば、HSPC）から作製することができる。

【0225】

一ステップでは、1つまたは複数のミスマッチHLA対立遺伝子、例えば、部分的にマッチするドナー細胞の発現を不活性化する。例えば、不活性化ステップは、次のステップの1つまたは複数を含み得る：1）ドナーとレシピエントの細胞において、例えば、MHC遺伝子座、例えば、HLA-A、-B、-Cおよび-DRB1遺伝子座などでの高解像度HLAタイピングの実施、2）ドナーに存在するが、レシピエント対象には存在しない標的遺伝子座もしくは遺伝子座（例えば、HLA-A）で1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子（例えば、HLA-A*0101）に特異的なgRNAのバイオインフォマティクスに基づくデザイン、階層化、およびスクリーニング、3）個別のミスマッチHLA対立遺伝子（例えば、HLA-A*0101）の発現の破壊（例えば、ノックアウトもしくはノックダウン）するためのCas9および標的特異的gRNAの送達、4）標的化遺伝子座での遺伝子破壊の検証、ならびに5）フローサイトメトリーおよびNK細胞溶解アッセイ（NK細胞は、HLAクラスI抗原を下方制御する細胞を認識し、細胞溶解を誘導する）による細胞表面でのHLA発現の消失の検証。

30

40

【0226】

別のステップでは、1つまたは複数のマッチレシピエント対象HLA対立遺伝子をコードするDNA配列をドナー細胞に導入する。例えば、マッチレシピエントHLA対立遺伝子を導入するステップは、次のステップの1つまたは複数を含み得る：1）標的化遺伝子座のレシピエント対象特異的対立遺伝子（例えば、HLA-A遺伝子座の場合、対立遺伝子変異体HLA-A*301）をコードするレシピエント対象からのcDNAの作製、2）レシピエントの内在性プロモーター（例えば、HLA-Aプロモーター）が、発現の転

50

写調節のためにレシピエント対象特異的HLA対立遺伝子（例えば、HLA-A*301）をコードするDNA配列の上流に位置するトランスジーン発現カセットのアセンブリー、3）ウィルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）もしくは非ウィルス送達系を用いた、ドナー細胞へのトランスジーン発現カセット（例えば、プロモーターおよびHLA対立遺伝子DNA）の送達。あるいは、一実施形態では、HLAレシピエント対象対立遺伝子特異的トランスジーン発現カセットは、「セーフ・ハーバー」遺伝子座（例えば、AAVS1、CCR5）または本来の遺伝子座（例えば、HLA-A）への組み込みを標的化するために、CRISPR/Cas9システムを用いてドナー細胞に送達してもよい。

【0227】

1つまたは複数のミスマッチドナーHLA対立遺伝子を不活性化するステップ、および1つまたは複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子を導入するステップは、任意の順序で実施することができる。一実施形態では、1つまたは複数のミスマッチドナーHLA対立遺伝子を不活性化するステップは、1つまたは複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子を導入するステップの前に実施される。別の実施形態では、1つまたは複数のミスマッチドナーHLA対立遺伝子を不活性化するステップは、1つまたは複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子を導入するステップの後に実施される。また別の実施形態では、1つまたは複数のミスマッチドナーHLA対立遺伝子を不活性化するステップは、1つまたは複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子を導入するステップと同時に実施される。

【0228】

遺伝子編集の前および後に、細胞寿命および細胞（例えば、HSPC）表現型および機能性の維持を促進すると共に、Cas9およびgRNA構成要素への曝露から細胞免疫応答を防御するために最適化された細胞培養条件下で、細胞を培地（例えば、HSPC支持培地）中で培養することができる（実施例を参照されたい）。細胞（例えば、HSPC）は、細胞（例えば、HSPC）維持を促進すると共に、分化を阻止するために最適化された条件下で拡大または培養することができる。最適化細胞培養条件については、本明細書で説明する。一実施形態では、細胞（例えば、HSPC）は、1つまたは複数のミスマッチドナーHLA対立遺伝子を不活性化する前に最適化条件下で拡大または培養する。一実施形態では、細胞（例えば、HSPC）は、1つまたは複数のミスマッチドナーHLA対立遺伝子を不活性化した後、最適化条件下で拡大または培養する。一実施形態では、細胞（例えば、HSPC）は、1つまたは複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子を導入する前に最適化条件下で拡大または培養する。一実施形態では、細胞（例えば、HSPC）は、1つまたは複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子を導入した後、最適化条件下で拡大または培養する。一実施形態では、細胞（HSPC）は、1つまたは複数のミスマッチドナーHLA対立遺伝子を不活性化した後で、かつ1つまたは複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子を導入する前に、最適化条件下で拡大または培養する。一実施形態では、細胞（HSPC）は、1つまたは複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子を導入した後で、1つまたは複数のミスマッチドナーHLA対立遺伝子を不活性化する前に最適化条件下で拡大または培養する。

【0229】

マッチしない遺伝子の不活性化およびマッチ遺伝子置換のプロセスは、特定のHLAが欠失した細胞のNK媒介性溶解を阻止し、HLA対立遺伝子発現の多様性を維持することにより、移植後の生体内免疫機能を保持すると共に（例えば、アローHSC）、ドナーとレシピエントの対象細胞間のHLAマッチングレベルを高めることにより、GVHDの重症度および／または発生を低減することができる。

【0230】

gRNAのデザインおよびスクリーニング

現在まで記録されたHLA対立遺伝子変異体を含む一般に入手可能なデータセット（hla.alleles.org）を用いて、HLA-A、-B、-C、DRB1、-DR

10

20

30

40

50

B3 / 4 / 5、および DQB1 遺伝子座について報告されている個別の対立遺伝子に高度に特異的な gRNA 配列を含むデータベースが構築および確立され、これは、全ての対立遺伝子を、これらの個々の対立遺伝子が提示されるヒト対象の系統、人種、または民族バックグラウンドと相互参照する (Marsh, S. G. E. (2015), Nomenclature for factors of the HLA system, update March 2015. Tissue Antigens. doi:10.1111/tan.12581; Maier M, et al. Hum. Immunol. 2007; 68 (9): 779-788) (対立遺伝子特異的 gRNA 例および詳細なデータベース設計については、「gRNA」および「実施例」のセクションを参照されたい)。下記の数 of 対立遺伝子変異体が、データベースに含まれた: HLA-A (3094 対立遺伝子)、HLA-B (3865 対立遺伝子)、HLA-C (2618)、HLA-DRB1 (1719)、HLA-DR3 / 4 / 5 (95)、HLA-DQB1 (777 対立遺伝子)。データベースを用いて、データベースに示される数千の対立遺伝子変異体のうちの 1 つに特異的な gRNA を選択することができる。さらに、本明細書に記載されるデータベースは、1 つまたは複数の gRNA により両アレル破壊を可能にする対立遺伝子特異性なしで、個別の HLA 遺伝子座を標的化する gRNA を同定し、階層化することもできる。対立遺伝子変異体、gRNA、および系統を既存の臍帯血および骨髄ドナー登録と関連付けることによって、レシピエント対象でマッチするアロー HSC T のために後に修飾することができる部分的にマッチするドナーを相互参照し、同定することができる。

【0231】

片アレルおよび両アレル HLA 標的化

1 遺伝子座の 1 対立遺伝子 (母系もしくは父系のいずれか) が、ドナー細胞とレシピエント対象の間でマッチしない場合、対立遺伝子特異的 gRNA 分子を CRISPR-Cas9 システムと一緒に用いて、対立遺伝子特異的遺伝子産物の発現をノックアウトまたはノックダウンすることができる。さらに、細胞ドナーとレシピエント対象がマッチしないか、またはハプロタイプが同一である場合、単一の染色体上の複数の HLA 遺伝子座 (例えば、HLA-A、-B、-C、および -DRB1) で個別の対立遺伝子の多重ノックアウトまたはノックダウンを、ドナー細胞中のミスマッチ (マッチしない) ハプロタイプを標的化する対立遺伝子特異的 gRNA 分子の共送達、続いてレシピエントマッチハプロタイプの供給によって、適用することができる。この多重ゲノム編集の例は、ドナーとレシピエント間のマッチングをそれぞれ 3 / 6 または 4 / 8 から 6 / 6 または 8 / 8 に増大し、これによって、ハプロタイプ同一のマッチドナー (例えば、染色体 6 の 1 コピーでは HLA-A、-B、-C、-DRB1 ミスマッチで、第 2 コピーは染色体 6 上でマッチ) を完全にマッチするドナーに変換し得る。しかし、1 遺伝子座の双方の対立遺伝子 (母系および父系) が、ドナーとレシピエントの間でミスマッチである (例えば、HLA-A の両対立遺伝子) 場合には、遺伝子特異的であるが、非対立遺伝子特異的 gRNA を、遺伝子座の両アレル破壊のために、CRISPR / Cas9 と一緒に用いることができる。いずれのシナリオでも、ノックアウトまたはノックダウンされる遺伝子をレシピエント特異的対立遺伝子で置換することにより、ドナーとレシピエント間の HLA マッチングを高めて、対象における HLA 多様性を保持することができる。

【0232】

例えば、ドナー細胞における HLA-A の両アレル破壊後に、2 つのレシピエント特異的 HLA-A 対立遺伝子を、従来の非ウイルスまたはウイルス送達方法を用いて、トランスジーン発現カセット内の同種異系ドナー細胞に送達することができる。配列決定、修飾ドナー細胞およびレシピエント細胞の比較タイピング、ならびに発現および機能アッセイによって HLA 置換が確認されたら、HLA 編集ドナー細胞を造血再構成のためにレシピエントに移植することができ、対象は、移植対象のための医療の現行基準に従って治療される。あるいは、一実施形態では、ドナー細胞 (例えば、HSPC) におけるミスマッチ HLA 対立遺伝子を標的化する KRA B および DNMT と融合させた eiCas9 を用いて、ミスマッチ HLA 対立遺伝子の発現を持続的に抑制することも可能である。

【0233】

次に、富化、単離、または精製されたミスマッチHLA対立遺伝子が欠失した細胞集団（例えば、HSPC）を取得するために、1つまたは複数のミスマッチドナーHLA対立遺伝子が不活性化されるドナー細胞を選別することができる。

【0234】

標的化HLA遺伝子座の対立遺伝子の不活性化の検証

1つまたは複数のHLA対立遺伝子がCRISPR/Cas9活性により不活性化されたことを検証するために、従来の方法（例えば、対立遺伝子特異的PCR、qRT-PCR、またはフローサイトメトリーの1つまたは複数）を用いて、標的化前および標的化後のドナー細胞を、対立遺伝子配列または対立遺伝子の発現の改変についてアッセイすることができる。一実施形態では、ゲノム編集を含むまたは含まないドナー細胞をNK細胞と一緒に共培養することができ、ドナー細胞に向けられた細胞傷害活性を定量して、HLA発現の下方制御を決定する。検証後に、不活性化された1つまたは複数のミスマッチドナーHLA対立遺伝子および／または導入された1つまたは複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子を有する細胞を未修飾細胞から、従来の選別方法により、富化、単離、または精製することができる。

10

【0235】

マッチレシピエントHLA対立遺伝子の導入

マッチレシピエントHLA対立遺伝子をコードする核酸を従来のウイルスまたは非ウイルス送達方法によりドナー細胞に導入することができる。一実施形態では、核酸は、cDNA、例えば、レシピエントmRNAから逆転写されたcDNAである。別の実施形態では、核酸は、ゲノムDNA配列である。一実施形態では、複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子をコードする核酸を導入する。一実施形態では、1つまたは複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子をそれぞれコードする複数の核酸を導入する。

20

【0236】

一実施形態では、核酸は、ウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）または非ウイルス送達系（例えば、トランスポゾン）に挿入する。一実施形態では、核酸またはベクターは、導入されたHLA対立遺伝子を転写的に調節するために、HLA遺伝子の特定の内在性プロモーター（例えば、レシピエント遺伝子座からクローニングされた）を含む。

30

【0237】

一実施形態では、レシピエントマッチHLA対立遺伝子をコードする核酸配列は、例えば、トランスジーン発現カセット内のHLA対立遺伝子配列近傍に配置されるレシピエント内在性HLAプロモーターと共に、レンチウイルスベクターに送達される。

【0238】

一実施形態では、核酸は、SINレンチウイルス発現カセット中に挿入され、レンチウイルスベクター粒子内にパッケージされる。ドナー細胞は、レシピエントHLAトランスジーンを含むレンチウイルスベクターで形質導入することができる。形質導入細胞は、レシピエントHLA対立遺伝子特異的レンチウイルスベクターと接触していないドナー細胞と比較して、レシピエントHLA対立遺伝子の発現増大に基づいて選別することができる。あるいは、一実施形態では、レシピエントHLA対立遺伝子ドナーテンプレートは、セーフ・ハーバー遺伝子座（例えば、AAVS1もしくはCCR5）へのCas9媒介性標的化組み込み、または本来の遺伝子座（例えば、HLA-A）へのCas9媒介性遺伝子置換のために、Cas9およびgRNA分子を伴う代替方法（例えば、電気穿孔もしくは脂質形質移入）によって、ドナー細胞に共送達することができる。

40

【0239】

あるいは、CRISPR-Cas9構成要素および標的的特異的gRNA分子、ならびにレシピエントトランスジーン発現カセットをコードするIDLVを送達する、AAV（例えば、AAV6もしくはAAVDJ）または非ウイルスベクターをドナー細胞（例えば、HSPC）に送達することができる。

50

【0240】

ドナー細胞へのレシピエントマッチHLA対立遺伝子の導入は、必要に応じて、遺伝子座特異的PCR、DNA配列決定、またはqPCR（例えば、ゲノム当量当たりのプロウイルスコピー数を決定するための）、ならびにHLAの発現増大をアッセイする（例えば、mRNAおよびタンパク質レベルを検出する従来の方法に基づいて）ことにより、検証することができる。HLAの発現は、例えば、1つまたは複数のミスマッチドナーHLA対立遺伝子の不活性化の前または後、1つまたは複数のマッチレシピエントHLA対立遺伝子の導入前または後に、様々な時点でNK細胞溶解アッセイにより決定することもできる。ドナー細胞が、1つまたは複数の不活性化されたミスマッチドナーHLA対立遺伝子と、1つまたは複数の導入されたマッチレシピエントHLA対立遺伝子を有していれば、NK媒介性細胞溶解は、最小限からゼロとなる。HLA遺伝子編集の前後のドナー細胞のHLAタイピングを従来の方法（例えば、遺伝子座のPCR増幅およびDNA配列決定によって確認することができる。HLA修飾ドナー細胞は、遺伝子発現分析のためにqRT-PCRにより分析することもできる。

10

【0241】

次に、従来の臨床プロトコルおよびレジメンを用いて、HLA適合、遺伝子編集ドナー細胞をレシピエント対象に移植することができる。例えば、そうでなければ好適なドナーを見出すことができない、全国骨髄および臍帯血幹細胞バンクで少数しか存在しない対象集団のために好適なドナーを生み出すことができる。

20

【0242】

HLA遺伝子または遺伝子座を改変する方法

本明細書には、遺伝子または遺伝子座、例えば、HLA遺伝子または遺伝子座における標的位置（例えば、標的ノックアウト位置、標的ノックダウン位置、もしくは標的ノックイン位置）を改変する方法が開示される。標的位置の改変は、例えば、遺伝子における1つまたは複数の遺伝子座もしくは対立遺伝子変異体を改変することによって達成することができる。このアプローチでは、ミスマッチ対立遺伝子が1つまたは複数の特定の対立遺伝子変異体とマッチするように、これらの遺伝子を修飾する。例えば、ドナー細胞（例えば、HSPC）は、レシピエント対象に関連する1つまたは複数のHLA対立遺伝子とマッチするように修飾することができる。本明細書に記載される遺伝子の対立遺伝子変異体の改変は、ドナーとレシピエントの対象細胞間のHLAマッチングの程度を高める。本明細書に記載される方法は、あらゆる細胞型、例えば、本明細書に記載の細胞型で実施することができる。

30

【0243】

標的位置の改変は、例えば、以下：

（1）遺伝子のノックアウト：

（a）遺伝子中の1つまたは複数のヌクレオチドの挿入もしくは欠失（例えば、NHEJ媒介性挿入もしくは欠失）、または

（b）遺伝子の少なくとも一部を含む遺伝子配列の欠失（例えば、NHEJ媒介性欠失）、あるいは、

（2）遺伝子のプロモーター領域を標的化することによって、酵素的に不活性なCas9（e.g. Cas9）分子またはe.g. Cas9融合タンパク質（例えば、転写レプレッサー）により媒介される遺伝子のノックダウン、

40

（3）遺伝子へのノックイン（例えば、HDRによる）
によって達成することができる。

【0244】

全てのアプローチが、遺伝子の改変をもたらす。

【0245】

HLA遺伝子座へのインデルまたは欠失の導入によるHLA遺伝子座のノックアウト

一実施形態では、本方法は、遺伝子座、例えば、HLA遺伝子座、例えば、HLA遺伝子座のコード領域（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、

50

HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP) 内での1つまたは複数のヌクレオチドの挿入または欠失を導入するステップを含む。本明細書に記載される通り、一実施形態では、本方法は、HLA遺伝子座、例えば、HLA遺伝子座のコード領域(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP) 内での1つまたは複数の切断(例えば、一本鎖切断もしくは二本鎖切断)の導入を含む。切断のNHEJ媒介性修復によって、HLA遺伝子座、例えば、HLA遺伝子座のコード領域(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP) 内でのインデルのNHEJ媒介性導入が可能になる。

【0246】

一実施形態では、本方法は、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)の少なくとも1部分(例えば、コード領域、例えば早期コード領域内の1部分、または非コード領域、例えばHLA遺伝子座の非コード配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、3'UTR、および/またはポリアデニル化シグナル内の1部分)を含むゲノム配列の欠失を導入するステップを含む。本明細書に記載される通り、一実施形態では、本方法は、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)の1位置(例えば、コード領域、例えば早期コード領域内、または非コード領域、例えばHLA遺伝子座の非コード配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、3'UTR、および/またはポリアデニル化シグナル内)に対して(すなわち、隣接して)一方は5'側および他方は3'側の2つの二本鎖切断の導入を含む。一実施形態では、2つのgRNA、例えば、非分子(もしくはキメラ)またはモジュラーgRNA分子が、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)の1位置(例えば、コード領域、例えば早期コード領域内、または非コード領域、例えばHLA遺伝子座の非コード配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、3'UTR、および/またはポリアデニル化シグナル内)の反対側に2つの二本鎖切断を配置するように、設計される。

【0247】

一実施形態では、一本鎖切断は、HLA遺伝子座、例えば、HLA遺伝子座のコード領域(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)内に導入される(例えば、1gRNA分子により配置される)。一実施形態では、単一gRNA分子(例えば、Cas9ニッカーゼと共に)を用いて、HLA遺伝子座内、例えば、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DPのコード領域内、またはHLA遺伝子座内の1位置、例えば、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)のコード領域の下流に、一本鎖切断を生成する。一実施形態では、切断は、例えば、Alu反復配列などの反復要素といった不要な標的染色体要素を回避するように配置される。

【0248】

一実施形態では、二本鎖切断は、HLA遺伝子座内、例えば、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)のコード領域内に導入される(例えば、1gRNA分子により配置される)。一実施形態では、単一gRNA分子(例えば、Cas9ニッカーゼ以外のCas9ヌクレアーゼと共に)を用いて、HLA遺伝子座内、例えばHLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-

10

20

30

40

50

DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)のコード領域内に二本鎖切断を生成し、例えば、gRNA分子は、二本鎖切断が、HLA遺伝子座内の1位置、例えば、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)のコード領域の上流または下流のいずれかに位置するように設計される。一実施形態では、切断は、例えば、Alu反復配列などの反復要素といった不要な標的染色体要素を回避するように配置される。

【0249】

一実施形態では、2つの一本鎖切断が、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)内に導入される(例えば、2つのgRNA分子により配置される)。一実施形態では、2つのgRNA分子(例えば、1つまたは2つのCas9ニッケアゼと共に)を用いて、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)内に2つの一本鎖切断を生成し、例えば、gRNA分子は、一本鎖切断の双方が、例えば、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)の1位置(例えば、コード領域、例えば早期コード領域内、または非コード領域、例えばHLA遺伝子座の非コード配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、3'UTR、および/またはポリアデニル化シグナル内)の上流もしくは下流に位置するように設計される。別の実施形態では、2つのgRNA分子(例えば、2つのCas9ニッケアゼと共に)を用いて、HLA遺伝子座内、例えば、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)のコード領域内に2つの一本鎖切断を生成し、例えば、gRNA分子は、一方の一本鎖切断が、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)の1位置(例えば、コード領域、例えば早期コード領域内、または非コード領域、例えばHLA遺伝子座の非コード配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、3'UTR、および/またはポリアデニル化シグナル内)の上流に位置し、第2の一本鎖切断がその下流に位置するように設計される。一実施形態では、切断は、例えば、Alu反復配列などの反復要素といった不要な標的染色体要素を回避するように配置される。

【0250】

一実施形態では、2つの二本鎖切断が、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)内に導入される(例えば、2つのgRNA分子により配置される)。一実施形態では、2つのgRNA分子(例えば、Cas9ニッケアゼではない1つまたは2つのCas9ヌクレアーゼと共に)を用いて、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)の1位置(例えば、コード領域、例えば早期コード領域内、または非コード領域内、例えばHLA遺伝子座の非コード配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、3'UTR、および/またはポリアデニル化シグナル内)とフランキングするように2つの二本鎖切断を生成し、例えば、gRNA分子は、一方の二本鎖切断が、HLA遺伝子座(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP)の1位置(例えば、コード領域、例えば早期コード領域内、または非コード領域内、例えばHLA遺伝子座の非コード配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、3'UTR、および/またはポリアデニル化シグナル内)の上流に位置し、第2の二本鎖切断がその下流に位置するように設計される。一実施形態では、切断は、例えば、Alu反復配列などの反復要素といった不要な標的染色体

要素を回避するように配置される。

【0251】

一実施形態では、1つの二本鎖切断と2つの一本鎖切断が、HLA遺伝子座（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP）内に導入される（例えば、3つのgRNA分子により配置される）。一実施形態では、3つのgRNA分子（例えば、Cas9ニッカゼ以外の1つのCas9ヌクレアーゼおよび1つまたは2つのCas9ニッカゼと共に）を用いて、HLA遺伝子座（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP）の1位置（例えば、コード領域、例えば早期コード領域内、または非コード領域、例えばHLA遺伝子座の非コード配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、3'UTR、および／またはポリアデニル化シグナル内）とフランキングするように1つの二本鎖切断と2つの一本鎖切断を生成し、例えば、gRNA分子は、二本鎖切断が、HLA遺伝子座（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP）の1位置（例えば、コード領域、例えば早期コード領域内、または非コード領域、例えばHLA遺伝子座の非コード配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、3'UTR、および／またはポリアデニル化シグナル内）の上流もしくは下流に位置し、2つの一本鎖切断が、その対向部位、例えば、HLA遺伝子座（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP）のコード領域内の位置の下流もしくは上流に位置するように設計される。一実施形態では、切断は、例えば、Alu反復配列などの反復要素といった不要な標的染色体要素を回避するように配置される。

【0252】

一実施形態では、4つの一本鎖切断が、HLA遺伝子座（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP）のコード領域内に導入される（例えば、4つのgRNA分子により配置される）。一実施形態では、4つのgRNA分子を（例えば、1つまたは複数のCas9ニッカゼと共に用いて、HLA遺伝子座（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP）の1位置（例えば、コード領域、例えば早期コード領域内、または非コード領域内、例えばHLA遺伝子座の非コード配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、3'UTR、および／またはポリアデニル化シグナル内）とフランキングするように4つの一本鎖切断を生成し、例えば、gRNA分子は、第1および第2の一本鎖切断が、HLA遺伝子座のコード領域（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP）内の位置の上流に位置し、かつ第3および第4の一本鎖切断が、HLA遺伝子座のコード領域（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3/4/5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくはHLA-DP）内の位置の下流に位置するように設計される。一実施形態では、切断は、例えば、Alu反復配列などの反復要素といった不要な標的染色体要素を回避するように配置される。

【0253】

一実施形態では、2つ以上（例えば、3つまたは4つ）のgRNA分子を1つのCas9分子と共に使用する。別の実施形態では、2つ以上の（例えば、3つまたは4つ）のgRNA分子を2つ以上のCas9分子と共に使用するとき、少なくとも1つのCas9分子は、他のCas9分子とは異なる種に由来する。例えば、2つのgRNA分子を2つのCas9分子と共に使用するとき、1つのCas9分子は、1つの種に由来してよく、他のCas9分子は、異なる種に由来してよい。所望されれば、双方のCas9種を用いて、一本鎖または二本鎖切断を生成する。

【0254】

酵素的に不活性な Cas9 (e i Cas9) 分子により媒介される HLA 対立遺伝子のノックダウン

標的化ノックダウンアプローチは、機能性遺伝子産物、例えば、機能性 HLA 遺伝子産物（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3 / 4 / 5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくは HLA-DP）の発現を低減または排除する。本明細書に記載される通り、一実施形態では、標的化ノックダウンは、酵素的に不活性な Cas9 (e i Cas9) 分子または転写レプレッサードメインもしくはクロマチン修飾タンパク質と融合した e i Cas9 を標的化して、HLA 遺伝子の転写を改変する、例えば、その転写を遮断、抑制、または低減することによって媒介される。

10

【0255】

本明細書で論じられる方法および組成物を用いて、HLA 遺伝子（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DR3 / 4 / 5、HLA-DQ、例えば、DQB1、もしくは HLA-DP）の発現を改変することもできる。一実施形態では、プロモーター領域を標的化して、HLA 遺伝子の発現をノックダウンする。標的化ノックダウンアプローチは、機能性 HLA 遺伝子産物の発現を低減または排除する。本明細書に記載される通り、一実施形態では、標的化ノックダウンは、酵素的に不活性な Cas9 (e i Cas9) 分子または転写レプレッサードメインもしくはクロマチン修飾タンパク質と融合した e i Cas9 を標的化して、HLA 遺伝子の転写を改変する、例えば、その転写を遮断、抑制、または低減することによって媒介される。

20

【0256】

一実施形態では、1つまたは複数の e i Cas9 を用いて、1つまたは複数の内在性転写因子の結合を遮断することもできる。別の実施形態では、e i Cas9 をクロマチン修飾タンパク質と融合させることができる。クロマチン状態を改変することによって、標的遺伝子の発現低下をもたらすことができる。1つまたは複数のクロマチン修飾タンパク質と融合した1つまたは複数の e i Cas9 を用いて、クロマチン状態を改変することができる。

【0257】

遺伝子配列をノックインする方法

本明細書には、遺伝子または遺伝子座、例えば、本明細書に記載の遺伝子または遺伝子座における標的位置（例えば、標的ノックイン位置）を改変する方法が開示される。一実施形態では、本方法は、標的化組み込みを含む。一実施形態では、本方法は、1つまたは複数のミスマッチ HLA 対立遺伝子が位置する本来の位置に1つまたは複数のマッチレシピエント HLA 対立遺伝子を送達するステップを含む。一実施形態では、本方法は、「セーフ・ハーバー」遺伝子座に1つまたは複数のマッチレシピエント HLA 対立遺伝子を挿入するステップを含む。一実施形態では、本方法は、遺伝子中の生体内選択のための化学療法耐性遺伝子を導入するステップをさらに含んでもよい。標的位置の改変は、例えば、遺伝子配列、例えば本明細書に記載の遺伝子配列（例えば、本明細書に記載の遺伝子の少なくとも1部分をコードする cDNA）を、例えば HDR により、ノックインすることによって達成することができる。本明細書に記載の遺伝子配列のノックインは、レシピエント マッチ HLA 対立遺伝子の発現をもたらす。

30

【0258】

HLA 遺伝子または遺伝子座の多重化改変

1つまたは複数の同じ細胞における2つ以上の遺伝子もしくは遺伝子座の改変は、本明細書では「多重化」と呼ぶ。多重化は、1つまたは複数の同じ細胞における少なくとも2つの遺伝子もしくは遺伝子座（例えば、HLA 遺伝子もしくは遺伝子座）の修飾を構成する。2つ以上の遺伝子または遺伝子座（例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3 / 4 / 5、HLA-DQ、HLA-DP、MiHA、およびいずれか他の MHC クラス I もしくはクラス II 遺伝子または遺伝子座）を改変のために標的化する場合、2つ以上の遺伝子または遺伝子座を順次もしくは同時に改変す

40

50

ることができる。一実施形態では、HLA遺伝子または遺伝子座の改変は、別のHLA遺伝子または遺伝子座の改変前もしくは改変後に行う。一実施形態では、HLA遺伝子または遺伝子座の改変は、別のHLA遺伝子または遺伝子座の改変と同時に進行する。一実施形態では、2つ以上のHLA遺伝子または遺伝子座（例えば、HLA-AおよびHLA-DRB1）は、2つの標的位置に關与するゲノム再編集（例えば、転位）を導入する確率を低下させるために、順次改変する。一実施形態では、改変は、片アレルである。別の実施形態では、改変は、両アレルである。一実施形態では、改変の効果は、相乗的である。HLA遺伝子または遺伝子座の多重改変は、移植（例えば、HSC T）を必要とする対象に好適なドナーを提供し、GVHDの重症度および発生率を低減する、より高い尤度を達成する。

10

【0259】

標的細胞の最適化

本明細書に記載される細胞、例えば、標的細胞は、例えば、生体外もしくは生体内で、最適化または操作することができる。標的細胞の最適化または操作によって、CRISPR/Cas9媒介性遺伝子編集または調節の維持、拡大、持続、もしくは調節が可能になる。例えば、標的細胞、例えば造血幹／前駆細胞（HSPC）などの最適化または操作によって、細胞適合性、機能性、自己再生、もしくは増殖能力を保持するか、またはオートファジー、アポトーシス、壊死、もしくは細胞老化による細胞死を阻止することができる。

【0260】

標的細胞は、CRISPR/Cas構成要素、例えば、Cas9分子、gRNA分子、もしくは双方、ならびに任意選択的に、ドナーテンプレート核酸との接触前、接触中、もしくは接触後に最適化または操作することができる。一実施形態では、標的細胞は、CRISPR/Cas構成要素との接触前および接触中に最適化または操作することができる。一実施形態では、標的細胞は、CRISPR/Cas構成要素との接触中および接触後に最適化または操作することができる。一実施形態では、標的細胞は、CRISPR/Cas構成要素との接触前もしくは接触後に最適化または操作することができる。一実施形態では、標的細胞は、CRISPR/Cas構成要素との接触前、接触中もしくは接触後に最適化または操作することができる。

20

【0261】

いくつかの異なる最適化または操作ステップを順次、例えば、CRISPR/Cas構成要素、例えば、Cas9分子、gRNA分子、またはその両方、および任意選択的に供与体テンプレート核酸との接触に対し特定の時間間隔で、適用することができる。また、いくつかの異なる最適化または操作ステップを同時に、例えば、CRISPR/Cas構成要素、例えば、Cas9分子、gRNA分子、またはその両方、および任意選択的に供与体テンプレート核酸との接触に対し特定の時間間隔で、適用することもできる。

30

【0262】

例えば、1つまたは複数のトランスジーンを含有するように、標的細胞を最適化または操作することができる。トランスジーンは、例えば、CRISPR/Cas関連機構によって、標的細胞のゲノム内の特定の遺伝子座に組み込むことができる。トランスジーンは、拡大および移植前に修飾細胞の富化および／または精製の調節を可能にし得るセイフティ・スイッチをもたらすことができる。また、一実施形態では、生着した細胞が十分に検出されない場合、トランスジーンは、修飾細胞の拡大を生体内で可能にし、あるいは、修飾細胞が機能不全であるか、または白血病性形質転換を被る場合には、修飾細胞の除去を生体内で可能にすると考えられる。また別の例として、標的細胞は、1つまたは複数のe Cas9分子と接触させる、例えば、転写レプレッサーまたはアクチベーターと融合させることにより、最適化または操作することができる。

40

【0263】

切断型細胞表面抗原の導入

細胞表面抗原または選択マーカーを発現する修飾標的細胞の精製は、CRISPR/Cas構成要素、例えば、Cas9分子、gRNA分子、またはその両方、および任意選択

50

的に供与体テンプレート核酸が、細胞に、例えば、生体外で送達されたことを保証する手段を提供し得る。また、標的化細胞による細胞表面抗原の発現は、修飾標的細胞を生体内で追跡することも可能にする。

【0264】

一実施形態では、標的細胞は、細胞表面抗原または選択マーカーをコードする遺伝子を含むか、またはこれと接触させる。一実施形態では、細胞表面抗原または選択マーカーは、切断型CD19 (tCD19) である。別の実施形態では、細胞表面抗原または選択マーカーは、切断型CD20 (tCD20) である。完全長細胞表面受容体CD19およびCD20は、Bリンパ球上に自然に発現される。CD19またはCD20の切断は、細胞質ドメインが除去されていることから、受容体を介した細胞内シグナル伝達を妨げる (Tey et al., 2007, Biol Blood Marrow Transplant, 13 (8) : 913-24)。CD19またはCD20の細胞外ドメインの発現は、細胞上での選別と、生体内で細胞の追跡を可能にし得る (例えば、遺伝子編集細胞の生着をモニターするために、採血し、抗ヒトCD19または抗ヒトCD20抗体で細胞を染色することにより)。一実施形態では、tCD19またはtCD20トランスジーンを供与体テンプレート核酸として送達する。一実施形態では、トランスジーンが組み込まれる領域からの標的ドメインと相補的な標的化ドメインを含む1つまたは複数のgRNA分子と標的細胞を接触させる。一実施形態では、tCD19またはtCD20トランスジーンは、ゲノム中に、例えばセーフ・ハーバー遺伝子座、例えばAAVS1セーフ・ハーバー遺伝子座に組み込まれる。切断型CD19またはCD20細胞表面抗原の導入もしくは同時導入 (マルチプレックスゲノム編集) を用いて、ゲノム編集細胞を生体外で精製するか、またはゲノム編集細胞を生体内でモニターすることができる。

【0265】

化学療法耐性トランスジーンまたは自殺遺伝子の導入

本明細書に記載される方法は、所望の特性を有する修飾標的細胞を選択もしくは拡大することができるか、または不要な特性 (例えば、白血病性形質転換) を有する修飾標的細胞を排除することができるように、標的細胞の調節を生体内または生体外で可能にする。

【0266】

一実施形態では、標的細胞は、例えば、生体外もしくは生体内での所望の標的細胞の選択、または例えば、生体外もしくは生体内での不要な標的細胞の排除を可能にするセーフティ・スイッチを含むか、またはこれと接触させる。一実施形態では、セーフティ・スイッチは、自殺遺伝子および／または化学療法選択マーカーをコードする遺伝子を含む。例えば、標的細胞は、下記の2つの構成要素を含むセーフティ・スイッチを含むことができる：1) ゲノム編集細胞を生体外で選別するために用いることができ、細胞を生体内で追跡するために用いることができ、さらに、リツキシマブ (抗CD20モノクローナル抗体療法薬) の患者への投与により生体内で白血病性形質転換が起こった場合に、細胞を排除するためにも用いることができる、切断型細胞表面抗原 (tCD20) および誘導性自殺遺伝子；ならびに2) アルキル化化学療法薬 (O6-ベンジルグアニン [O6BG] およびBCNU) による患者の治療時に、非編集細胞の除去によってゲノム編集細胞を生体内で選択し、これにより、ゲノム編集細胞を含む骨髄の生体内での再増殖を増大する、薬物誘導性化学療法耐性遺伝子 (例えば、メチルグアニンメチルトランスフェラーゼのP140K変異型 [P140K MGMT]) 。

【0267】

一実施形態では、標的細胞は、自殺遺伝子を含むか、またはこれと接触させる。一実施形態では、自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ-9 (iCasp9) をコードする。一実施形態では、標的細胞は、二量体化の化学誘導剤、例えば、AP1903またはAP2018とさらに接触させる。理論による拘束は望まないが、カスパーゼ-9は、二量体化の化学誘導剤による治療時に、アポトーシスを誘導すると考えられる (Di Stasi et al., 2011, New Eng Journal Med, 365 : 1673-1683)。別の実施形態では、自殺遺伝子は、切断型CD20 (tCD20) をコードする。

一実施形態では、標的細胞は、抗CD20抗体、例えば、リツキシマブとさらに接触させる。抗CD20抗体は、免疫応答を誘導して、CD20を発現する細胞死を引き起こすことができる (Redman et al., 2015, Mol Immunol, 50161-5890 (15): 00361-2)。

【0268】

一実施形態では、標的細胞は、化学療法選択マーカーをコードする遺伝子を含むか、またはこれと接触させる。一実施形態では、化学療法選択マーカーは、メチルグアニンメチルトランスフェラーゼの変異型 (例えば、メチルグアニンメチルトランスフェラーゼのP140K変異型) である。一実施形態では、標的細胞は、化学療法薬、例えば、O6BG/BCNUとさらに接触させる。O6BG/BCNU化学療法と組み合わせたメチルグアニンメチルトランスフェラーゼのP140K変異型の使用は、レンチウイルス形質導入による送達後に、骨髄中の遺伝子修飾造血幹/前駆細胞のレベルを増加する上で有効である (Gori et al., 2012, Cancer Gene Therapy, 19 (8): 1523-9; Beard et al., 2010, J Clin Invest, 120 (7): 2345-54)。

【0269】

一実施形態では、トランスジーンは、供与体テンプレート核酸上に提供されるか、または供与体テンプレート核酸として送達される。一実施形態では、トランスジーンが組み込まれる領域からの標的ドメインと相補的な標的化ドメインを含む1つまたは複数のgRNA分子と標的細胞を接触させる。一実施形態では、トランスジーンは、ゲノム中に、例えばセーフ・ハーバー遺伝子座、例えばAAVS1セーフ・ハーバー遺伝子座に組み込まれる。一実施形態では、トランスジーンは、tCD20-2A-P140K2シストロン性トランスジーンカセットを含む。

【0270】

gRNA分子の修飾

ウイルス-宿主共進化の間に、mRNAのキャッピングを模倣するウイルスRNAキャッピングは進化して、ウイルスRNAが、細胞の自然免疫系からの検出を免れることを可能にした (Delcroix et al., 2012, Nature Reviews Microbiology 10: 51-65)。幹細胞 (例えば、HSPC) 内のトール様受容体は、自然免疫応答、細胞老化、およびプログラム細胞死を引き起こし得る外来の一本鎖および二本鎖RNAの存在を感知する (Kajaste-Rudnitski and Naldini (2015) Human Gene Therapy 26: 201-209)。初期実験の結果から、GFPMRNA単独で電気穿孔された細胞と比較して、非修飾 (例えば、5' キャップもしくは3' ポリA-テールなしで合成されたgRNA) gRNA分子およびCas9mRNAと共に電気穿孔されたヒトHSPCは、細胞寿命、増殖能、または複能性の低減 (例えば、赤血球分化能の喪失および歪んだ骨髄系分化能) を招くことが立証された。この課題に取り組むために、細胞の老化およびアポトーシスは、外来核酸の標的細胞感知および自然免疫応答の誘導、ならびにこれに続くプログラム細胞死の誘導および増殖および分化能の喪失によるものであった可能性があるとして仮定された。外来核酸に対する細胞の自然免疫応答を回避するために、mRNAを模倣するようにgRNA分子を修飾すること (例えば、5' キャップおよび3' ポリA-テールの付加) によって、細胞における自然免疫応答、細胞におけるインターフェロン応答、細胞老化、または外来核酸の感知により起こるプログラム細胞死を阻止することができる。

【0271】

一実施形態では、標的細胞は、キャップおよびテール付加gRNA分子と接触させる。一実施形態では、標的細胞は、キャップおよびテール付加gRNA分子を含むCas9分子/gRNA分子複合体と接触させる。標的細胞をキャップおよびテール付加gRNA分子と接触させるステップは、修飾標的細胞の寿命を増加し、標的細胞の複能性、増殖能、もしくは生存能力を保持するか、または細胞老化もしくはプログラム細胞死を阻止することができる。

【0272】

疾患を治療または予防する方法

本明細書に記載される方法および組成物は、疾患、例えば、本明細書に記載の疾患を治療または予防する治療法、例えば、1回療法または複数回投与療法を提供する。一部の実施形態では、疾患を治療または予防する方法は、細胞、例えば、本明細書に記載される細胞を例えば、生体外または生体内で改変する。疾患に関連するあらゆる型の細胞を本明細書に記載の方法で改変することができる。例えば、細胞は、循環血球、動員血球、骨髓細胞、骨髓前駆細胞、リンパ球前駆細胞、造血幹／前駆細胞（HSPC）、複能性前駆細胞、系列特異的前駆細胞、内皮細胞、または間葉系間質細胞である。別の実施形態では、疾患を治療または予防する方法は、遺伝子、例えば、本明細書に記載される遺伝子を、例えばCRISPR／Cas媒介性遺伝子編集によって改変する。細胞または遺伝子の改変（例えば、修正、ノックアウト、ノックイン、ノックダウン、または活性化）は、疾患の発症前または疾患の発症後に実施することができる。本明細書に記載される方法により治療または予防することができる例示的な疾患として、限定はしないが、表16に列記する疾患が挙げられる。本明細書に記載される方法により改変することができる例示的な遺伝子として、限定はしないが、表16に列記する遺伝子が挙げられる。

10

【0273】

一実施形態では、遺伝子は、CRISPR／Cas媒介方法、あるいは、Sleeping Beautyトランスポゾン、レンチウイルスベクター、もしくはアデノ関連ウイルスベクターをはじめとするいずれか他のノックインまたは遺伝子送達方法を用いて、幹細胞中のセーフ・ハーバー遺伝子座（例えば、AAVS1セーフ・ハーバー遺伝子座）、例えば、HSPCにノックインする。

20

【0274】

一実施形態では、遺伝子は、分泌された可溶性タンパク質をコードする。分泌された可溶性血液タンパク質をコードする遺伝子のノックインを用いて、表16に列記する疾患をはじめとする疾患、例えば、リソソーム蓄積症、グリコーゲン蓄積症、ムコ多糖症、またはタンパク質の分泌が疾患を改善するいずれかの疾患を治療または治癒することができる。

【0275】

一実施形態では、疾患は、循環血液タンパク質の欠乏に関連する。例示的な疾患として、限定はしないが、血友病（例えば、血友病Aまたは血友病B）、A1AT欠乏症、またはライソゾーム酸性リパーゼ欠損症が挙げられる。欠乏に関連する分泌可溶性血液タンパク質をコードする遺伝子を導入することにより、タンパク質の循環血液レベルを高めることから、疾患を改善または治癒することができる。一実施形態では、疾患は、血友病、例えば、血友病Aまたは血友病Bである。一実施形態では、遺伝子は、凝固因子VIIをコードするF8遺伝子である。一実施形態では、本方法は、F8遺伝子をノックインするステップを含み、これによって血友病Aを治療または治癒する。別の実施形態では、遺伝子は、凝固因子IXをコードするF9遺伝子である。一実施形態では、本方法は、F9遺伝子をノックインするステップを含み、これによって血友病Bを治療または治癒する。一実施形態では、疾患は、A1AT欠乏症である。一実施形態では、遺伝子は、 α -1-抗トリプシンをコードする、特定遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、またはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体の配列である。一実施形態では、本方法は、特定遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、またはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体の配列をノックインするステップを含み、これによってA1AT欠乏症を治療または予防する。一実施形態では、疾患は、ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症である。一実施形態では、遺伝子は、ライソゾーム酸性リパーゼをコードするLAL遺伝子であり、これによってライソゾーム酸性リパーゼ欠損症を治療または予防する。

30

40

【0276】

一実施形態では、疾患は、糖尿病である。一実施形態では、遺伝子は、分泌された可溶性血液タンパク質をコードする。例えばドラッグブル、誘導可能または選択可能なプロモ

50

ーターの制御下で、分泌された可溶性血液タンパク質をコードする遺伝子のノックインにより、このタンパク質の循環血液レベルを高めることから、疾患を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、タンパク質インスリンをコードするINS遺伝子である。一実施形態では、遺伝子は、タンパク質グルカゴンをコードするGCG遺伝子である。一実施形態では、本方法は、例えばドラッグブル、誘導可能または選択可能なプロモーターの制御下で、INS遺伝子またはGCG遺伝子をノックインするステップを含み、これによって糖尿病を治療または予防する。

【0277】

一実施形態では、疾患は、成長ホルモン欠乏症である。一実施形態では、遺伝子は、成長ホルモンをコードするGH遺伝子である。例えばドラッグブル、誘導可能または選択可能なプロモーターの制御下での、GH遺伝子のノックインにより、循環成長ホルモンレベルを高めることから、疾患を改善または治療することができる。一実施形態では、本方法は、例えばドラッグブル、誘導可能または選択可能なプロモーターの制御下で、GH遺伝子をノックインするステップを含み、これによって成長ホルモン欠乏症を治療または予防する。

10

【0278】

一実施形態では、疾患は、がん、例えば、血液のがんである。一実施形態では、遺伝子は、がんにおいて過剰発現される遺伝子である。例えば転写レプレッサーに融合したe i C a s 9分子による遺伝子のノックダウンが、疾患を改善または治療する。一実施形態では、遺伝子は、EGFR遺伝子である。一実施形態では、本方法は、EGFR遺伝子を活性化するステップを含み、これによって、がんの進行および転移を治療または予防する。

20

【0279】

一実施形態では、疾患は、遺伝性血液浮腫である。一実施形態では、遺伝子は、遺伝性血液浮腫において低発現される遺伝子である。例えば転写アクチベーターに融合したe i C a s 9分子による遺伝子の上方制御または活性化が、疾患を改善または治療する。一実施形態では、遺伝子は、C1INH遺伝子である。一実施形態では、本方法は、C1INH遺伝子を活性化するステップを含み、これによって、血液浮腫を治療または予防する。

【0280】

一実施形態では、疾患は、フォン・ヴィレブランド病である。一実施形態では、遺伝子は、フォン・ヴィレブランド病において低発現される。一実施形態では、例えば転写アクチベーターに融合したe i C a s 9分子による遺伝子の上方制御または活性化が、疾患を改善または治療する。一実施形態では、遺伝子は、VWF遺伝子である。一実施形態では、本方法は、VWF遺伝子を活性化するステップを含み、これによって、フォン・ヴィレブランド病を治療または予防する。

30

【0281】

一実施形態では、疾患は、遺伝性または後天性貧血である。一実施形態では、遺伝子は、遺伝性または後天性貧血において低発現される遺伝子である。例えば転写アクチベーターに融合したe i C a s 9分子による、一時的な、遺伝子の上方制御または活性化が、疾患を改善または治療する。一実施形態では、遺伝子は、EPO遺伝子である。一実施形態では、本方法は、EPO遺伝子を一時的に活性化するステップを含み、これによって、遺伝性または後天性貧血を治療または予防する。

40

【0282】

一実施形態では、疾患は、好中球減少症である。一実施形態では、遺伝子は、好中球減少症において低発現される遺伝子である。例えば転写アクチベーターに融合したe i C a s 9分子による、一時的な、遺伝子の上方制御または活性化が、疾患を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、CSF2遺伝子である。一実施形態では、本方法は、CSF2遺伝子を一時的に活性化するステップを含み、これによって、好中球減少症を治療または予防する。

【0283】

一実施形態では、疾患は、成長障害である。一実施形態では、遺伝子は、成長障害にお

50

いて低発現される遺伝子である。例えば転写アクチベーターに融合した *e i C a s 9* 分子による、一時的な、遺伝子の上方制御または活性化が、疾患を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、*G H 1* である。一実施形態では、本方法は、*G H 1* 遺伝子を一時的に活性化するステップを含み、これによって、成長障害を治療または予防する。

【0284】

一実施形態では、疾患は、感染症、自己免疫疾患、炎症性疾患、リウマチ性疾患、または腫瘍性疾患である。一実施形態では、遺伝子は、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、または炎症性タンパク質をコードする。例えば転写レプレッサーに融合した *e i C a s 9* 分子（例えば、誘導性 *e i C a s 9* 分子）により、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、または炎症性タンパク質をコードする遺伝子を一時的もしくは持続的に下方制御または阻害することによって、疾患が改善または治療されることができる。一実施形態では、疾患は、血液のがんである。一実施形態では、遺伝子は、*E P O R* 遺伝子である。一実施形態では、本方法は、*E P O R* 遺伝子をノックダウンするステップを含み、これによって血液のがんを治療または予防する。一実施形態では、疾患は、関節リウマチである。一実施形態では、遺伝子は、*T N F* 遺伝子である。一実施形態では、本方法は、*T N F* 遺伝子をノックダウンするステップを含み、これによって関節リウマチを治療または予防する。一実施形態では、疾患は、炎症性疾患である。一実施形態では、遺伝子は、*C 5* 遺伝子である。一実施形態では、本方法は、*C 5* 遺伝子をノックダウンするステップを含み、これによって炎症性疾患を治療または予防する。

【0285】

一実施形態では、疾患は、感染症、自己免疫疾患、炎症性疾患、リウマチ性疾患、または腫瘍性疾患である。一実施形態では、遺伝子は、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、または炎症性タンパク質をコードする。例えば転写アクチベーターに融合した *e i C a s 9* 分子（例えば、誘導性 *e i C a s 9* 分子）により、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、または炎症性タンパク質をコードする遺伝子を一時的もしくは持続的に上方制御または活性化することによって、疾患が改善または治療されることができる。一実施形態では、疾患は、多発性硬化症である。一実施形態では、遺伝子は、*I F N B 1* 遺伝子である。一実施形態では、本方法は、*I F N B 1* 遺伝子を活性化するステップを含み、これによって多発性硬化症を治療または予防する。

【0286】

一実施形態では、疾患は、感染症、自己免疫疾患、炎症性疾患、リウマチ性疾患、または腫瘍性疾患である。一実施形態では、遺伝子は、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、または炎症性タンパク質受容体をコードする。例えば、*e a C a s 9* 分子による、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、または炎症性タンパク質をコードする遺伝子のノックアウトが、疾患を改善または治療する。一実施形態では、疾患は、*H I V* または *A I D S* である。一実施形態では、遺伝子は *C C R 5* である。別の実施形態では、遺伝子は、*C X C R 4* 遺伝子である。一実施形態では、本方法は、*C C R 5* 遺伝子、*C X C R 4* 遺伝子、または両方のノックアウトを含み、これによって *H I V* または *A I D S* を治療または予防する。

【0287】

一実施形態では、疾患は、発作または心筋梗塞である。一実施形態では、遺伝子は、可溶性血液タンパク質、例えば、組織プラスミノゲンアクチベータまたは尿プラスミノゲンアクチベータをコードする。例えば、転写に融合した *e i C a s 9* 分子による、例えば、一時的な、遺伝子の上方制御または活性化が、疾患を改善または予防することができる、例えば、虚血を予防する、または血餅を溶解させる。一実施形態では、遺伝子は、*P L A T* 遺伝子である。一実施形態では、本方法は、*P L A T* 遺伝子を活性化するステップを含み、これによって発作または心筋梗塞を治療または予防する。

【0288】

一実施形態では、疾患は、異常ヘモグロビン症である。一実施形態では、遺伝子は、異

常ヘモグロビン症を引き起こす突然変異を含む。一実施形態では、遺伝子は、異常ヘモグロビン症を引き起こす突然変異を含まない。上記遺伝子のノックアウトまたは修正によって、疾患を改善または治療することができると考えられる。一実施形態では、突然変異を含む遺伝子は、HBB、HBA1またはHBA2である。一実施形態では、本方法は、突然変異したHBB、HBA1またはHBA2遺伝子を修正するステップを含み、これによって鎌状赤血球症、 α サラセミア、または β サラセミアを治療または予防する。一実施形態では、遺伝子は、BCL11Aである。一実施形態では、本方法は、BCL11A遺伝子のノックアウトを含み、これによって鎌状赤血球症または β サラセミアを治療または予防する。

【0289】

一実施形態では、疾患は、貧血である。一実施形態では、遺伝子は、例えば赤血球ピルビン酸キナーゼ欠乏による貧血、例えば、溶血性貧血を引き起こす突然変異を含む。上記遺伝子のノックインまたは修正により貧血を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、PKLRである。一実施形態では、本方法は、野生型PKLR遺伝子中のノックインを修正するステップまたは突然変異PKLR遺伝子を修正するステップを含み、これによって、貧血、例えば、溶血性貧血を治療または予防する。

【0290】

一実施形態では、疾患は、凝固因子障害、例えば、血友病Aである。一実施形態では、遺伝子は、凝固因子障害を引き起こす突然変異を含む。上記遺伝子の修正が、凝固因子障害を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、F8である。一実施形態では、本方法は、突然変異F8遺伝子を修正するステップを含み、これによって血友病Aを治療または予防する。

【0291】

一実施形態では、疾患は、代謝障害、例えば、ムコ多糖症I型である。一実施形態では、遺伝子は、代謝障害を引き起こす突然変異を含む。上記遺伝子のノックインまたは修正によって代謝障害を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、IDUA遺伝子である。一実施形態では、本方法は、野生型IDUA遺伝子におけるノックインまたは突然変異IDUA遺伝子の修正を含み、これによってムコ多糖症I型を治療または予防する。

【0292】

一実施形態では、疾患は、免疫不全、例えば、X連鎖重症複合免疫不全症である。一実施形態では、遺伝子は、免疫不全を引き起こす突然変異を含む。上記遺伝子のノックインまたは修正によって、疾患を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、IL2RG遺伝子である。一実施形態では、本方法は、野生型IL2RG遺伝子のノックインまたは突然変異IL2RG遺伝子の修正を含み、これによってX連鎖重症複合免疫不全症を治療または予防する。

【0293】

一実施形態では、疾患は、骨髄性免疫不全、例えば、慢性肉芽腫性疾患である。一実施形態では、遺伝子は、骨髄性免疫不全を引き起こす突然変異を含む。上記遺伝子のノックインまたは修正によって、疾患を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、NCF1遺伝子である。一実施形態では、本方法は、野生型NCF1遺伝子のノックインまたは突然変異NCF1遺伝子の修正を含み、これによって慢性肉芽腫性疾患を治療または予防する。

【0294】

一実施形態では、疾患は、 β リンパ系または免疫グロブリン欠損症、例えば、X連鎖無ガンマグロブリン血症である。一実施形態では、遺伝子は、 β リンパ系または免疫グロブリン欠損症に関連する突然変異を含む。遺伝子のノックインまたは修正が、疾患を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、BTK遺伝子である。一実施形態では、本方法は、野生型BTK遺伝子のノックインまたは突然変異BTK遺伝子の修正を含み、これによってX連鎖無ガンマグロブリン血症を治療または予防する。

10

20

30

40

50

【0295】

一実施形態では、疾患は、血球減少症、例えば、先天性無巨核球性血小板減少症Ⅰ型である。一実施形態では、遺伝子は、血球減少症に関連する突然変異を含む。上記遺伝子のノックインまたは修正により、疾患を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、MPL遺伝子である。一実施形態では、本方法は、野生型MPL遺伝子のノックインまたは突然変異MPL遺伝子の修正を含み、これによって先天性無巨核球性血小板減少症Ⅰ型を治療または予防する。

【0296】

一実施形態では、疾患は、代謝障害、酵素欠乏、輸送障害、または蓄積症、例えば、ムコ多糖症ⅠⅠⅠA型である。一実施形態では、遺伝子は、代謝障害、酵素欠乏、輸送障害、または蓄積症に関連する突然変異を含む。上記遺伝子のノックインまたは修正によって、疾患を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、SGSH遺伝子である。一実施形態では、本方法は、野生型SGSH遺伝子のノックインまたは突然変異SGSH遺伝子の修正を含み、これによってムコ多糖症ⅠⅠⅠA型を治療または予防する。

10

【0297】

一実施形態では、疾患は、赤血球系疾患、例えば、原発性家族性先天性赤血球増加症である。一実施形態では、遺伝子は、赤血球系疾患に関連する突然変異を含む。上記遺伝子のノックインまたは修正によって、疾患を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、EPOR遺伝子である。一実施形態では、本方法は、一時的または持続的のいずれかで、EPOR遺伝子をノックダウンするステップを含み、これによって原発性家族性先天性赤血球増加症を治療または予防する。

20

【0298】

一実施形態では、疾患は、赤血球系疾患、例えば、原発性家族性先天性赤血球増加症である。一実施形態では、遺伝子は、赤血球系疾患に関連する突然変異を含む。上記遺伝子のノックインまたは修正によって、疾患を改善または治療することができる。一実施形態では、遺伝子は、EPOR遺伝子である。一実施形態では、本方法は、EPOR遺伝子をノックアウトまたはノックダウンするステップを含み、これによって原発性家族性先天性赤血球増加症を治療または予防する。

【0299】

表16は、本明細書に記載の方法によって治療または予防することができる例示的な疾患と、本明細書に記載の方法によって改変することができる例示的な遺伝子を記載する。

30

【0300】

40

50

表 16

異常ヘモグロビン症	
疾患	遺伝子
鎌状赤血球症	HBB
鎌状赤血球症	BCL11a
β サラセミア	HBB
β サラセミア	BCL11a
α サラセミア	HBA1
α サラセミア	HBA2
X連鎖 α サラセミア	ATRX
貧血	
疾患	遺伝子
ブラックファン・ダイヤモンド症候群	RPS19
ファンコーニ貧血	FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCJ, FANCL, FANCM, FANCN, FANCP, RAD51C
ビルビン酸キナーゼ欠損症による溶血性貧血	PKLR
再生不良性貧血	IFNG
先天性赤血球異形成貧血 2 型	SEC23B
遺伝性球状赤血球症	ANK1
遺伝性球状赤血球症	SPTB
遺伝性球状赤血球症	SPTA
遺伝性球状赤血球症	SLC4A1
遺伝性球状赤血球症	EPB42
貧血	EPO
好中球減少症	CSF2
好中球減少症	CSF3
止血障害	
疾患	遺伝子
フォン・ヴィレブランド病	VWF
血友病	F7
血友病 A	F8
血友病 B	F9
止血障害	F2
パラ血友病	F5
出血傾向	F7
第 X 因子欠損症	F10
止血障害, 凝固障害	F11
止血障害	F12

【 0 3 0 1 】

【表 4 4】

第 XIII 因子欠損症	F13A1
第 XIII 因子欠損症	F13B
止血障害	PROC
止血障害	PROS1
血栓症	SERPINC1
フィブリノーゲン欠損症/低フィブリノーゲン血症	FGA, FGB, FGG
止血障害	PROZ
プラスミノーゲン欠損症	PLG
止血障害, 心血管疾患	PLAT
止血障害, 心血管疾患	PLAU
止血障害	F3
止血障害	TFPI
止血障害	PAI
ヘパリンコファクターII 欠損症による血栓形成傾向	HCF2
代謝疾患	
疾患	遺伝子
ムコ多糖症	
MPS I 型ハラー症候群	IDUA
MPS II 型ハラー症候群	IDS
MPS-IVA	GALNS
MPS-VI	ARSB
MPS IIIA	SGSH
MPSIIIB- サンフィリポ B 型症候群	NAGLU
MPSIIC	HGSNAT
MPS IV	GALNS
重症複合免疫不全	
疾患	遺伝子
X 連鎖重症複合免疫不全	IL2RG
ADA 重症複合免疫不全	ADA
IL7-RA 重症複合免疫不全	IL7R
CD3 重症複合免疫不全	CD247
RAG1 重症複合免疫不全	RAG1
RAG2 重症複合免疫不全	RAG2
アルテミス重症複合免疫不全	DCLRE1C
CD45 重症複合免疫不全	PTPRC
Jak3 重症複合免疫不全	JAK3
軟骨毛髪形成不全症候群	RMRP
IPEX X 連鎖免疫調節障害, 多腺性内分泌障害, および腸疾患	FOXP3
IPEX 様症候群	STAT1
分類不能型免疫不全症 1	ICOS
分類不能型免疫不全症 2	TNFRSF13B
分類不能型免疫不全症 3	CD19
分類不能型免疫不全症 4	TNFRSF13C
分類不能型免疫不全症 5	CD20

【 0 3 0 2 】

10

20

30

40

50

【表 4 5】

分類不能型免疫不全症 6	CD81
HIV	CCR5
HIV	CXCR4
露出リンパ球症候群 II 型, 相補群 E	RFX5
露出リンパ球症候群 II 型, 相補群 C	RFX5
露出リンパ球症候群 II 型, 相補群 D	RFXAP
露出リンパ球症候群 II 型, 相補群 A	MHC2TA
露出リンパ球症候群 II 型	RFXB
露出リンパ球症候群 I 型	TAP1
露出リンパ球症候群 I 型	TAP2
露出リンパ球症候群 I 型	TAPBP
骨髄性免疫不全	
疾患	遺伝子
先天性無顆粒球症	VPS45
先天性無顆粒球症	HAX1
先天性無顆粒球症	ELANE
慢性肉芽腫症	NCF1
慢性肉芽腫症	CYBB
慢性肉芽腫症	CYBA
慢性肉芽腫症	NCF2
慢性肉芽腫症	NCF4
家族性血球貪食性リンパ組織球症 2 型	PRF1, HPLH
ウィスコット・オルドリッチ(Wiskott-Aldrich)症候群	WAS
チェディアック・東(Chediak-Higashi)症候群	LYST
細網異形成症	AK2
B リンパ球性およびイムノグロブリン免疫不全	
疾患	遺伝子
X 連鎖無ガンマグロブリン血症	BTK
X 連鎖高イムノグロブリン M	TNFSF5
高 IgM 2 型	AICDA
高 IgM 3 型	CD40
高 IgM 5 型	UNG
血球減少障害(神経系合併症を伴う)	
疾患	遺伝子
ゴーシェ(Gaucher's)病	GBA
先天性無巨核球性血小板減少症 I 型	MPL
代謝、酵素欠乏症、輸送(Trafficking)、および蓄積症	
疾患	遺伝子
α -マンノシドーシス	MAN2B1
ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症	LIPA
糖原病 0	GYS2
糖原病 1A	G6PC

【 0 3 0 3 】

10

20

30

40

50

【表 4 6】

糖原病 1B	G6PT1/SLC37A4
糖原病 II/ポンペ病	GAA
糖原病 III	AGL
糖原病 IV	GBE1
糖原病 V	PYGM
糖原病 VI	PYGL
糖原病 VII	PFKM
糖原病 9a	PHKA2
糖原病 9b	PHKB
糖原病 X	PGAM2
発育不全、発育異常	GH1
甲状腺障害	TG
糖尿病および代謝障害	INS
糖尿病および代謝障害	GCG
フリードライヒ運動失調症	FXN
代謝疾患;コレステロール障害	LCAT
代謝疾患;リポタンパク質障害	APOA1
原発性 IGF-1 欠損症	IGF1
アスパルチルグルコサミン尿症	AGA
痛風	UOX
ムコ多糖症	
MPS I 型ハーラー症候群	IDUA
MPS II 型ハーラー症候群	IDS
MPS-IVA	GALNS
MPS-VI	ARSB
MPS IIIA	SGSH
MPSIIIB-サンフィリポ B 型症候群	NAGLU
異染色性白質ジストロフィー	ARSA
副腎白質ジストロフィー	ABCD1
ファブリー病	GLA
レッシュ・ナイハン(Lesch-Nyhan)症候群	HPRT
アデノシンデアミナーゼ欠損症- ADA	ADA
クラッペ病	GALC
ファーバー病	ASAHI
神経セロイドリポフスチン症 (NCL) 1	PPT1
神経セロイドリポフスチン症 (NCL) 2	TPP1
ニーマンピック病 C1 型	NPC1
ニーマンピック病 C2 型	NPC2 タンパク質
ニーマンピック病 A 型	SMPD1
ニーマンピック病 B 型	SMPD1
赤血球系疾患	
疾患	遺伝子
真性赤血球増加症	JAK2
真性赤血球増加症	TET2
原発性家族性先天性赤血球増加症 (PFCPs)	EPOR

【 0 3 0 4】

10

20

30

40

50

【表 4 7】

がん転移性増殖	EPOR
発作性夜間血色素尿症	PIGA
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症;腫瘍性疾患	
疾患	遺伝子
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症	C5
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症	C3
自己免疫疾患;炎症性疾患;GVHD、急性臓器拒絶反応	IL6
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL1A, IL1B
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL2
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL3
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL7
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL9
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL12
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL17
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL18
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL4
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL10
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL11
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL35
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL26
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL13
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL23
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IL27
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	IFNG
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL1
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL2
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL3
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL4
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL5
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL6
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL7
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL8
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL9
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL10
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL11
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL12
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL13
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL14
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL15
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCL16
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL1
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL2
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL3
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL4
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL5

10

20

30

40

【0 3 0 5】

【表 4 8】

自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL6	10
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL7	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL8	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL9	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL10	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL11	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL12	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL13	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL14	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL15	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL16	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL17	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL18	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL19	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL20	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL21	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL22	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL23	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL24	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL25	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL26	20
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL27	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCL28	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	XCL1	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	XCL2	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CX3CL1	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCR1	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCR2	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCR3	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCR4	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CXCR5	30
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCR1	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCR2	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCR3	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCR4	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCR5	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCR6	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCR7	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCR8	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCR9	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCR10	40
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CCR11	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	CX3CR1	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	DARC	
自己免疫疾患;炎症性疾患;感染症、腫瘍性疾患	C1INH	
遺伝性血管性浮腫	EGF	
炎症性、リウマチ性、腫瘍性疾患		

【0 3 0 6】

【表 4 9】

炎症性、リウマチ性、腫瘍性疾患	VEGF
多発性硬化症	IFNA1, IFNA2, IFNB1
自己免疫疾患;関節リウマチ	TNF
リンパ腫	ABL1
リンパ腫	BCL2
リンパ腫	BCL11A
リンパ腫	BCL11B
リンパ腫	BCR
リンパ腫	BMI1
リンパ腫	BRD2
リンパ腫	CCND1
リンパ腫	CCND2
リンパ腫	CDX2
リンパ腫	ETV6
リンパ腫	JAK2
リンパ腫	JUND
リンパ腫	KLF6
リンパ腫	LCK
リンパ腫	LMO1
リンパ腫	LMO2
リンパ腫	LYL1
リンパ腫	MLL
リンパ腫	MLLT10
リンパ腫	MTCP1
リンパ腫	MYC
リンパ腫	NFKB2
リンパ腫	NOTCH1
リンパ腫	NUP98
リンパ腫	OLIG2
リンパ腫	PBX1
リンパ腫	PICALM
リンパ腫	RAP1GDS1
リンパ腫	RUNX1
リンパ腫	STIL
リンパ腫	TAL1
リンパ腫	TAL2
リンパ腫	NKAIN2
リンパ腫	TCF3
リンパ腫	TCL1A
リンパ腫	TLX1
リンパ腫	TLX3
腫瘍性疾患/がん	FAS
腫瘍性疾患/がん	BID
腫瘍性疾患/がん	CD152
腫瘍性疾患/がん	PCDCD1
腫瘍性疾患/がん	CBLB

10

20

30

40

【 0 3 0 7 】

50

【表 5 0】

腫瘍性疾患/がん	PTPN6
腫瘍性疾患/がん	CD19
腫瘍性疾患/がん	PARP1
腫瘍性疾患/がん	CD223
腫瘍性疾患/がん	CD272
腫瘍性疾患/がん	CD200R1
腫瘍性疾患/がん	TIGIT
腫瘍性疾患/がん	LAIR1
腫瘍性疾患/がん	PTGER2
腫瘍性疾患/がん	PTGER4
腫瘍性疾患/がん	CD16
腫瘍性疾患/がん	PDCD1
腫瘍性疾患/がん	HAVCR2
腫瘍性疾患/がん	CD40
腫瘍性疾患/がん	WAS
腫瘍性疾患/がん;白血病	WT1
腫瘍性疾患/がん;白血病	CHK1

10

【0308】

一実施形態では、治療は、疾患発症後の対象において開始される。一実施形態では、治療は、疾患の発症後であるが、例えば、疾患の進行を予防するために、疾患進行過程の早期に（例えば、特定症状の発生前に）対象において開始される。一実施形態では、本方法は、例えば、疾患の進行を遅らせるために、疾患の進行期に対象の治療を開始することを含む。

20

【0309】

一実施形態では、本方法は、本明細書に記載の疾患を有する対象を治療するために使用される。一実施形態では、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載の疾患の発症または進行を予防するか、または遅らせるために使用される。

【0310】

一実施形態では、本方法は、1つまたは複数の修飾細胞の生存に対する選択的有利性をもたらす。一実施形態では、標的細胞は、修飾されて、遺伝子ノックアウト、ノックイン、ノックダウンまたは修正を有する。修飾されない疾患細胞は、アポトーシスを被り得る。このように、一実施形態では、本明細書に記載の治療後に、修飾細胞は生存するが、非修飾細胞は死滅する。この選択的有利性は、少なくとも50%、例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%の修飾細胞を含む細胞の最終的なコロニー形成を駆動することができる。

30

【0311】

一実施形態では、本方法は、遺伝子、例えば、本明細書に記載の遺伝子に突然変異を見出す遺伝子検査を受ける対象において治療を開始するステップを含む。

【0312】

一実施形態では、本方法は、本明細書に記載の疾患についての検査結果が陽性である対象において治療を開始するステップを含む。

40

【0313】

一実施形態では、本方法は、疾患の症状もしくは兆候のいずれかを示す疾患の家族歴を有する、および／または疾患に関連する遺伝子に突然変異を有することが判明した対象において治療を開始するステップを含む。

【0314】

一実施形態では、本方法は、疾患と一致するか、または疾患に関連する症状が現れた対象を治療するステップを含む。

【0315】

50

一実施形態では、本方法は、対象から細胞を単離するステップを含む。一実施形態では、細胞を生体外で改変した後、対象に戻す（例えば、移植する）。一実施形態では、対象は、細胞を単離した者と同じ対象である。別の実施形態では、対象は、細胞を単離した者とは異なる対象である。一実施形態では、オートログス幹／前駆細胞を生体外で改変した後、対象に戻す。別の実施形態では、異種幹／前駆細胞を生体外で改変した後、対象に戻す。

【0316】

一実施形態では、治療は、本明細書に記載の細胞への gRNA 分子、Cas9 分子、および任意選択的に、供与体テンプレート核酸の送達を含む。一実施形態では、gRNA 分子、Cas9 分子、またはその両方、および任意選択的に供与体テンプレート核酸は、ウイルスベクター、例えば、AAV ベクターまたはレンチウイルスベクター、例えばインテグラーゼ欠損型レンチウイルス (IDLV) によって送達される。別の実施形態では、gRNA 分子および Cas9 分子は、gRNA 分子／Cas9 分子リボ核タンパク質複合体として送達される。別の実施形態では、gRNA 分子および Cas9 分子は、RNA として送達される。一実施形態では、テンプレート核酸は、標的遺伝子の少なくとも 1 つのエキソンを含む。一実施形態では、テンプレート核酸は、疾患に関連する突然変異を含まない。一実施形態では、テンプレート核酸は、プロモーター配列を含む。別の実施形態では、テンプレート核酸は、プロモーター配列を含まない。一実施形態では、テンプレート核酸は、スプライスドナーまたはアクセプターを含む。別の実施形態では、テンプレート核酸は、ポリアデニル化シグナルを含む。

【0317】

移植のための修飾同種異系ドナー HSC

遺伝性血液遺伝疾患（例えば、鎌状赤血球症）または悪性疾患（例えば、白血病）を患う対象へのドナー同種異系 HSC の移植は、レシピエント患者に置換機能性造血系を提供し得る。部分的にマッチするドナー候補と、移植片を必要とするレシピエント対象との間の HLA マッチングを増大するために、ドナー細胞が遺伝子修飾される場合。このシナリオでは、次善最適 HLA マッチング（例えば、6 遺伝子座のうち 3 である、ドナー候補とレシピエント対象間のマッチング）に基づいて、好適なドナーとして通常除外されるはずのドナー候補が、1 つまたは複数の HLA 遺伝子座の遺伝子編集後（例えば、3／6 から 4／6、5／6、または 6／6 までマッチングを増加）にドナーとして適格となり得る。しかし、1 つまたは複数の HLA 遺伝子座の 1 つまたは複数の HLA 対立遺伝子の遺伝子編集は、ミスマッチを低減し得るため、HSC 移植を必要とする患者に対する HSC ドナーとして適格となるのに好適なレベルの HLA マッチングをもたらす（例えば、HLA 遺伝子座で 4／6、5／6、または 6／6 マッチング）。マッチングを高めるためのドナー HSC の遺伝子編集がなければ、レシピエントは、好適なドナーを得られなくなる（例えば、HLA 遺伝子座で 3／6 マッチング）。治療を目的として、レシピエントについて部分的にマッチするドナー（例えば、3／6）を同定し、データベースに入力すると、これは、1 つまたは複数のミスマッチ HLA 対立遺伝子の欠失を標的化するために使用することができる gRNA を出力する。遺伝子編集のための最善の戦略（最も低いオフターゲットプロフィール、最も高いオンターゲットプロフィールを有し、多重化の場合には、対向染色体での標的化対立遺伝子編集を促進する gRNA）、ならびに最も好適なドナー候補（例えば、HLA マッチ対立遺伝子で同型接合、mH A で最大のマッチング度、より近い系統バックグラウンド）が選択される。遺伝子編集の効率は、ドナー T 細胞で試験される（末梢血 T 細胞と比較して供給が限定される、ドナー HSC の修飾前）。ドナー HSC は、マッチングを増加するように遺伝子編集された後、修飾 HSC をレシピエント患者に移植することもできる。手短には、HSC をドナーから収集し、生体外でゲノム編集して、ミスマッチ HLA を欠失または破壊した後、免疫磁気ビーズ戦略（例えば、CliniMAC もしくは Prodigy）を用いて選別することにより、HLA 対立遺伝子陰性画分（例えば、陰性選択のための磁気ビーズに共役した HLA 対立遺伝子特異的抗体を含む）を富化する。次に、レシピエントに対するミスマッチが低減した HSC を患者に注入す

10

20

30

40

50

る。しかし、1つの遺伝子座の2つの異なる対立遺伝子を編集する必要がある場合、もう1つの戦略は、HDRアプローチによる対立遺伝子置換である。HSC生着の後、HSCは、HSC子孫（例えば、血液系列、例えば、骨髄細胞、リンパ球、ミクログリア）が低いGVHDのリスクを有するように、血液系列を再構成することができる。

【0318】

HSC生着中の免疫再構成のためのリンパ球間橋としてのHLA修飾T細胞補充療法

同種異系HSC移植を受けている対象は、移植直後の期間に日和見感染のリスクがある。対象は、HSC移植の準備のために骨髄破壊的前処置レジメンを受けるが、これは、感染を予防する働きをするT細胞をさらに欠失させる。免疫再構成は、対象において数ヵ月を要し得る。この期間中、ドナー由来のHSCは、T細胞に分化し、胸腺に移動し、抗原に曝露されて、適応免疫を再構成し始める。

【0319】

同種異系HSC移植を受けている対象において、移植直後の期間中に修飾T細胞補充療法を使用すれば、適応免疫リンパ球間橋をもたらすことができる。非悪性疾患の場合、ドナーのT細胞およびHSCは、本方法に従って修飾され、例えば、CRISPR/Cas9媒介性修飾に付されて、ドナーとレシピエント間でミスマッチであるHLA遺伝子座でのマッチングを高める。修飾、例えば、HLA遺伝子座でのCRISPR/Cas9媒介性修飾は、ドナーT細胞およびHSCをドナーオートログ免疫系による潜在的拒絶に対して耐性にする。HLA遺伝子編集T細胞は、骨髄破壊的前処置の直後で、同種異系HSC移植の前に対象に投与されるか、またはHSC移植と一緒に共注入されるか、またはHSC移植後に投与される。これらのHLA遺伝子編集T細胞は、HLA修飾HSC移植片が生着する間、日和見感染に対する短期免疫を賦与する。リンパ球またはT細胞補充療法で用いられる修飾T細胞は、限定的な寿命を有し得る（約2週間から60日～1年）（Westera et al., Blood 2013; 122 (13): 2205-2212）。移植直後の期間中、これらの細胞は、対象に防御免疫を賦与することができる。移植を必要とする患者が、血液のがん（例えば、白血病、リンパ腫）、および移植片対宿主病（より高いGVHDのリスクは、より高いT細胞用量に関連する）を有する場合、免疫防御と、移植片対白血病効果（GVL）を均衡させるように、特定のHLA編集事象および補充T細胞の細胞用量を変更することができる（Montero et al., Biol Blood Marrow Transplant. 2006 Dec; 12 (12): 1318-25）。本明細書に記載される方法は、HLA編集ドナーHSC細胞が、生体内でリンパ球生成を再構成するまで、適応免疫を維持すると共に、日和見感染を予防するために、1、2、3または複数回投与することができる。

【0320】

同種異系HSC移植を受けている対象において、移植直後の期間中にHLA修飾赤血球骨髄およびT細胞補充療法を使用すれば、骨髄および適応免疫リンパ球間橋をもたらすことができる。ドナーHSCは、本方法に従って修飾されて、生体外で赤血球骨髄およびリンパ球系前駆細胞に分化する。分化して、HLA編集された赤血球骨髄およびリンパ球は、骨髄破壊的前処置の直後で、かつ同種異系HSC移植の前に対象に投与されるか、またはHSC移植片と一緒に共注入されるか、またはHSC移植後に投与される。分化HLA修飾骨髄およびリンパ球は、一緒に投与されるか、または別々に投与され、例えば、修飾、HLA修飾赤血球骨髄系前駆細胞は、一投与レジメンで投与され、修飾、HLA修飾リンパ球系前駆細胞は、別の投与レジメンで投与される。HSC移植を受けた対象へのHLA修飾、分化骨髄およびリンパ球の投与は、HLAマッチ自然および適応免疫細胞の短期赤血球骨髄およびリンパ球間橋を賦与する。これらの細胞は、貧血に対する短期保護と、日和見感染に対する短期免疫を賦与する。これらの細胞は、限定的な寿命を有し得る。移植直後の期間中、これらの細胞は、対象の貧血を改善し、対象に防御免疫を賦与することができる。免疫防御と、移植片対宿主病（より高いGVHDのリスクは、より高いT細胞用量に関連する）を均衡させるように、こうした細胞の用量を変更することができる（Montero et al., Biol Blood Marrow Transplan

10

20

30

40

50

t. 2006 Dec; 12 (12) : 1318-25)。本明細書に記載される方法は、ドナーHSC細胞が、骨髄およびリンパ系列を再構成するまで、赤血球骨髄およびリンパ球数を維持するために、1、2、3または複数回投与することができる。

【0321】

対立遺伝子特異的遺伝子修飾を含む細胞が富化された治療組成物

角膜移植拒絶率を低減するためのドナー角膜における1、2もしくは3つのHLA-A、HLA-Bおよび／またはHLA-DRB1対立遺伝子の生体外破壊（例えば、ノックアウト）

角膜移植は、米国および世界中で一般的な処置である。毎年米国では、40,000人を超える患者が角膜移植を受けている。（Eye Bank Association of America 2014 Eye Banking Statistical Report. Available at http://www.restore sight.org/wp-content/uploads/2015/03/2014_Statistical_Report-FINAL.pdf. Accessed: June 16, 2015）。角膜移植は、角膜の混濁および視力障害を引き起こす角膜ジストロフィー、感染症および外傷について適用される。

10

【0322】

角膜移植患者の約20%が、角膜拒絶を示し、米国では毎年約6,000～8,000人の患者が、角膜移植の拒絶を経験している（Dunn et al., Cornea 33 (10) : 1003-9 (2014)）。拒絶事象を経験する患者は、一般に、移植不全を起こし、後の角膜移植を必要とする。

20

【0323】

角膜移植拒絶を予防するために、眼の免疫抑制など、現在検証中のアプローチがいくつかある。しかし、角膜移植拒絶率は、依然として高く、多くの場合、移植不全を伴う。

【0324】

本開示は、角膜移植片拒絶を低減し、最終的に、角膜移植不全率を低下させるために、非マッチMHCクラスIおよびクラスII遺伝子、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRB1の発現を低減することを目標とする。角膜移植片拒絶のマウスモデルにおいて、MHCクラスI抗原の発現の低減が、移植片拒絶率を低下させることが立証されている（Kamiya et al., Exp Eye Res. 70 (6) : 737-43 (2000)）。本方法は、非マッチMHCクラスI遺伝子を破壊（例えば、ノックアウト）し、これによって、非マッチMHCクラスI抗原の発現を低減する。これによって、本方法は移植片拒絶率を低下させることになる。

30

【0325】

本方法は、以下のようにして、ドナー角膜における1、2もしくは3つのHLA-A、HLA-BまたはHLA-DRB1対立遺伝子をノックアウトする。本方法は、本方法を用いて、角膜上皮細胞および間質細胞、例えば、角膜実質細胞をはじめとする角膜細胞を標的化する以外は、HSCにおいてHLA-A、HLA-BまたはHLA-DRB1対立遺伝子の破壊（例えば、ノックアウト）を標的化するために使用される方法と同じである。

【0326】

単一のHLA対立遺伝子の破壊（例えば、ノックアウト）、例えば、単一のHLA-A、HLA-BまたはHLA-DRB1のKOは、3/6 HLA対立遺伝子でレシピエントにドナーをマッチさせ、ここで、1/6ドナー対立遺伝子が発現されず、外来抗原認識に関して有効な4/6適合が達成される。単一对立遺伝子のKOは、ミスマッチHLA抗原の発現を低減し、角膜移植片拒絶のリスクを低下させることになる。

40

【0327】

2つのHLA対立遺伝子の破壊（例えば、HLA-A対立遺伝子とHLA-B対立遺伝子、HLA-A対立遺伝子とHLA-DRB1対立遺伝子、またはHLA-B対立遺伝子とHLA-DRB1対立遺伝子のKO）は、3/6 HLA対立遺伝子でレシピエントにドナーを適合させ、ここで、2/6ドナー対立遺伝子が発現されず、外来抗原認識に関して

50

有効な 5 / 6 適合が達成される。2つの対立遺伝子の KO は、ミスマッチ HLA 抗原の発現を低減し、角膜移植片拒絶のリスクを低下させることになる。

【0328】

3つの HLA 対立遺伝子の破壊（例えば、ノックアウト）（例えば、HLA-A 対立遺伝子、HLA-B 対立遺伝子、および HLA-DRB1 対立遺伝子の KO）は、3 / 6 HLA 対立遺伝子でレシピエントにドナーをマッチさせ、ここで、3 / 6 ドナー対立遺伝子が発現されず、外来抗原認識に関して有効な 6 / 6 適合が達成される。3つの対立遺伝子の KO は、ミスマッチ HLA 抗原の発現を低減し、角膜移植片拒絶のリスクを低下させることになる。

【0329】

特定の HLA 対立遺伝子が、角膜移植において、より高い拒絶率に関連する場合、その HLA 対立遺伝子は、破壊（例えば、ノックアウト）のために標的化されることになる。

【0330】

ノックアウトのために標的化された HLA 対立遺伝子は、実施例 12：「HLA 遺伝子型のマッチングを促進するための HLA 対立遺伝子のノックアウト」に見出されるものと同じである。例えば、HLA-遺伝子型：

【0331】

【表 51】

	ドナー		
	HLA クラス I		HLA クラス II
	HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*
対立遺伝子 1	0101g	0801g	0301
対立遺伝子 2	0301g	0702g	1501

【0332】

を有するドナー角膜は、ヨーロッパ系集団における最も一般的な HLA ハプロタイプを有する。3つの HLA 対立遺伝子、例えば、HLA-A*0301g、HLA-B*0702g、HLA-DRB1*1501 のノックアウトは、ヨーロッパ系統の個体において最も一般的な HLA ハプロタイプを発現する角膜組織を生成するであろう。この組織は、ヨーロッパ系集団の最も大きな割合とマッチする可能性が非常に高い。特定の集団について最も一般的なハプロタイプを有するドナー角膜組織における HLA 対立遺伝子の同じ破壊戦略、例えば、ノックアウトは、実施例 12 に説明する通り、アフリカ系アメリカ人、ヒスパニック系、およびアジア系の角膜組織について最も一般的な HLA ハプロタイプに適用することができる。

【0333】

本方法は、ドナー角膜に生体外で適用することができる。角膜細胞は、HLA 破壊（例えば、ノックアウト）のために生体外で修飾し、修飾後、ドナーに移植することができる。角膜修飾のために標的化される細胞型としては、角膜上皮細胞、例えば、基底細胞、翼細胞、表面細胞、角膜間質細胞、例えば、実質細胞、線維芽細胞、筋線維芽細胞が挙げられる。

【0334】

より一般的には、本明細書に記載されるシステムおよび方法は、対立遺伝子特異的遺伝子修飾を有する細胞が富化された治療組成物（例えば、そうした細胞の精製組成物）の生産に有用である。対立遺伝子特異的遺伝子修飾を有する細胞の富化集団を生産する例示的な方法は、2つの大まかなステップを含み、最初に、同定可能な遺伝子産物、すなわち、直接または間接的のいずれかで、検出することができる遺伝子産物をコードする遺伝子の

単一の対立遺伝子と結合し、任意選択的に切断もしくは突然変異させることができる C R I S P R / C a s 9 システムに細胞の集団を暴露するか、それと接触させる、遺伝子編集ステップを含む。第 2 のステップは、遺伝子産物を発現するが、標的化対立遺伝子によりコードされた遺伝子産物の変異体は発現しない細胞を同定、収集および／または分離する（例えば、こうした細胞を「富化する」）ものである。これらのステップのいずれも、以下にさらに詳しく説明する。

【0335】

まず、遺伝子編集ステップに関して、C R I S P R / C a s 9 システムは、g R N A 分子の標的化ドメイン中に、編集が望まれる対立遺伝子に特異的な標的配列と相補的な配列を組み込むことによって、遺伝子の単一の対立遺伝子と結合するように、設計され得る。標的化対立遺伝子の標的配列は、例えば、塩基対の違い、挿入、欠失、逆転、複製などによって、g R N A 分子と非標的化対立遺伝子との結合を低減または阻止する任意の好適な様式で、非標的化対立遺伝子の配列とは相違し得る。細胞の集団は、富化ステップの生体外実施を促進するために、身体外部で C R I S P R / C a s 9 システムに曝露させるのが好ましいが、必ずしも必要というわけではなく、治療に有用なあらゆる細胞型もしくは集団であってよく、例えば、血液もしくは骨髄などの組織からの操作されていないか、または最小限に操作された細胞画分、H S C などの細胞の精製画分、またはインビトロで精製、処理および／もしくは拡大された集団であってよい。細胞は、それらが後に再導入される対象から採取してもよいし、あるいは、ドナーから採取してもよい。好適な細胞および細胞の集団は、以下の「標的細胞」で概略的に記載され、そうした細胞または集団に C R I S P R / C a s 9 システムを投与する手段は、「送達、製剤化および投与経路」で概略的に説明される。

【0336】

編集細胞の富化に関しては、これは、ほとんどの（しかし、全てではない）場合、同定可能な遺伝子産物の検出によって促進される。以下に示す例示的な実施形態では、同定可能な遺伝子産物は、細胞表面マーカーであるか、または細胞表面タンパク質複合体の一部を形成し、例えば、蛍光標識抗体および蛍光活性化細胞選別（F A C S）を用いて、抗体検出により生存細胞中で同定することができる。これらのおよびその他のツールは、当技術分野において公知であり、B D B i o s c i e n c e s（S a n J o s e, C A）、A b c a m（C a m b r i d g e, U K）などをはじめとする様々な供給者により市販されている。

【0337】

H L A 対立遺伝子、ならびにそれに対する抗体が入手可能であるか、または作製することができる細胞表面タンパク質をコードするその他の遺伝子産物の場合、例示的な F A C S による富化プロセスは、典型的に、対立遺伝子特異的編集プロセスに事前に付した細胞の集団を 2 つの蛍光抗体：遺伝子編集ステップで標的化された遺伝子の対立遺伝子によりコードされる同定可能な遺伝子産物の第 1 の変異体に特異的に標的化させた第 1 の蛍光抗体、および第 1 のステップで標的化されていない遺伝子の対立遺伝子によりコードされる同定可能な遺伝子産物の第 2 の変異体に結合する第 2 の蛍光抗体と接触させるステップを含む。第 2 の抗体は、第 2 の変異体に特異的であってもよいし、または第 2 の変異体および任意選択的に第 1 の変異体をはじめとする複数の変異体に対する広範な特異性を有してもよい。F A C S 選別の間、第 1 の抗体からの低もしくは無蛍光シグナルにより同定される、第 1 の変異体を発現しない細胞、ならびに第 2 抗体からの高シグナルにより同定される、第 2 の変異体を発現しない細胞についてゲートを設定した後、これらのゲートに入る細胞を収集して、対立遺伝子特異的遺伝子修飾を含む細胞の富化集団を形成する。

【0338】

F A C S およびその他のフローサイトメトリー検出方法に加えて、標的化および非標的化対立遺伝子の両方によりコードされる遺伝子産物の検出を可能にする方法であれば、任意の他の好適な検出方法を用いて、編集細胞を富化することができることに留意すべきである。非限定的な例として、共役磁気ビーズおよび直接顕微鏡操作のいずれを使用して、

対立遺伝子特異的遺伝子修飾を含む細胞を富化してもよい。非標的化対立遺伝子の検出は、第2の非標的化対立遺伝子によりコードされる変異体に特異的であるか、またはより広範に遺伝子産物の複数もしくは全ての変異体を検出する試薬を用いて実施してもよい。これらの遺伝子産物を検出する上で有用な試薬として、標識もしくはタグ付き抗体、リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト、アプタマー、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどが挙げられ、これらは、非標的化対立遺伝子によりコードされる遺伝子産物を発現する個別の細胞を同定および収集する上で十分な解像度で、集団内の細胞上もしくは細胞内で検出することができる。遺伝子産物を直接検出する代替方法として、遺伝子の標的化および非標的化対立遺伝子により促進もしくは阻害される物質または細胞状態を検出することが有用となり得る。

10

【0339】

さらに、前述および本開示全体の実施例は、標的化対立遺伝子の欠失またはノックアウトに焦点を合わせているが、標的化対立遺伝子を第2の対立遺伝子に変えるものをはじめとする、他の編集戦略にも容易に適応可能であり、その場合、第2の対立遺伝子は、第1の検出抗体もしくは試薬（すなわち、非修飾、標的化対立遺伝子に特異的な抗体もしくは試薬）によっては検出されないが、遺伝子の良好に編集された対立遺伝子によりコードされる第2の変異体に結合する第2の抗体もしくは試薬によって検出されるものとする。

【0340】

I. ガイドRNA (gRNA) 分子

gRNA分子は、この用語の本明細書の用法では、標的核酸へのgRNA分子/Cas9分子複合体の特異的ターゲティングまたはホーミングを促進する核酸である。gRNA分子は、本明細書では「キメラ」gRNA、もしくはモジュラー（2つ以上、典型的には2つの個別のRNA分子を含む）と呼ぶことがある単分子（単一のRNA分子を有する）であってよい。本明細書に提供されるgRNA分子は、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体の配列内またはその付近の標的核酸配列と完全もしくは部分的に相補的な核酸配列を含むか、それから構成されるか、またはほぼ構成される標的化ドメインを含む。特定の実施形態では、gRNA分子は、例えば、第1の相補性ドメイン、結合ドメイン、第2の相補性ドメイン、隣接ドメイン、テールドメイン、および5'伸長ドメインをはじめとする1つまたは複数の追加ドメインをさらに含む。これらのドメインの各々については、以下にさらに詳しく述べる。特定の実施形態では、gRNA分子中の1つまたは複数のドメインは、例えば、S.ピオゲネス (S. pyogenes)、S.アウレウス (S. aureus) またはS.サーモフィルス (S. thermophilus) に由来する天然に存在する配列と同一の、またはそれと配列相同性を有するアミノ酸配列を含む。

20

30

【0341】

いくつかの例示的なgRNA構造を図1A~1Iに示す。gRNAの活性形態の3次元形態、または鎖内もしくは鎖間相互作用に関して、高相補性の領域を図1A~1I中の二重鎖および本明細書に提供されるその他の描写に示す場合がある。図7は、配列番号42のgRNA配列を用いたgRNAドメイン命名法を示し、これは、tracrRNA由来領域内に1つのヘアピンループを含む。特定の実施形態では、gRNAは、この領域に2つ以上（例えば、2つ、3つ、またはそれ以上の）ヘアピンループを含んでもよい（例えば、図1H~1I）。

40

【0342】

特定の実施形態では、単分子、またはキメラgRNAは、好ましくは5'から3'の方向に以下：特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体の配列内の標的ドメインと相補的な標的化ドメイン；第1の相補性ドメイン；結合ドメイン；第2の相補性ドメイン（第1の相補性ドメインと相補的である）；隣接ドメイン；および任意選択的に、テールドメインを含む。

50

【0343】

特定の実施形態では、モジュラー gRNA は、好ましくは 5' から 3' の方向に以下：特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくは HLA-DQB1 の対立遺伝子変異体の配列内の標的ドメインと相補的な標的化ドメイン；および第 1 の相補性ドメインを含む第 1 の鎖と；好ましくは 5' から 3' の方向に以下：任意選択的に、5' 伸長ドメイン；第 2 の相補性ドメイン；隣接ドメイン；および任意選択的に、テールドメインを含む第 2 の鎖とを含む。

【0344】

標的化ドメイン

標的化ドメイン（あるいは、ガイド配列または相補性領域と呼ばれることもある）は、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくは HLA-DQB1 の対立遺伝子変異体の配列内もしくはその付近の核酸配列と相補的であるか、または部分的に相補的な核酸配列を含むか、これから構成されるか、またはほぼこれから構成される。標的化ドメインの全部もしくは一部が相補的であるか、または部分的に相補的である、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくは HLA-DQB1 の対立遺伝子変異体の配列内もしくはその付近の核酸配列は、本明細書では標的ドメインと呼ぶ。特定の実施形態では、標的ドメインは、標的位置を含む。他の実施形態では、標的位置は、標的ドメインの外部（すなわち、その上流もしくは下流）にある。

【0345】

標的化ドメインを選択する方法は、当該技術分野で公知である（例えば、Fu 2014；Sternberg 2014 を参照のこと）。本明細書に記載される方法、組成物、およびキットで使用するための好適な標的化ドメインの例として、配列番号 219～361 に記載されているものがある。

【0346】

標的ドメインを含む標的核酸の鎖は、それが標的化ドメイン配列と相補的であるため、本明細書では「相補鎖」と呼ばれる。標的化ドメインは、gRNA 分子の一部であることから、これは、チミン（T）ではなく、塩基ウラシル（U）を含み；反対に、gRNA 分子をコードするいずれの DNA 分子も、ウラシルではなく、チミンを含むことになる。標的化ドメイン／標的ドメインペアでは、標的化ドメイン中のウラシル塩基は、標的ドメイン中のアデニン塩基と対合することになる。特定の実施形態では、標的化ドメインと標的ドメイン同士の相補性の程度は、Cas9 分子を標的核酸に標的化することを可能にするのに十分なものである。

【0347】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、コアドメインと任意選択の二次ドメインを含む。これらの実施形態のいくつかでは、コアドメインは、二次ドメインの 3' 側に位置し、これらの実施形態のいくつかでは、コアドメインは、標的化ドメインの 3' 側またはその付近に位置する。これらの実施形態のいくつかでは、コアドメインは、標的化ドメインの 3' 末端の約 8～約 13 ヌクレオチドから構成されるか、またはほぼこれらから構成される。特定の実施形態では、コアドメインだけが、標的ドメインの対応部分と相補的であるか、またはそれと部分的に相補的であり、これらの実施形態のいくつかでは、コアドメインは、標的ドメインの対応部分と完全に相補的である。他の実施形態では、二次ドメインも、標的ドメインの一部と相補的であるか、またはそれと部分的に相補的である。特定の実施形態では、コアドメインは、標的ドメイン中のコアドメイン標的と相補的であるか、またはそれと部分的に相補的であるのに対し、二次ドメインは、標的ドメイン中の二次ドメイン標的と相補的であるか、またはそれと部分的に相補的である。特定の実施形態では、コアドメインと二次ドメインは、標的ドメインのそれぞれの対応部分と同程度の相補性を有する。他の実施形態では、コアドメインとその標的同士の相補性の程度および二次ドメインとその標的同士の相補性の程度は異なってもよい。これらの実施形態のいくつかで

は、コアドメインは、二次ドメインよりその標的に対する相補性の程度が高いのに対し、他の実施形態では、二次ドメインの方が、コアドメインより相補性の程度が高い。

【0348】

特定の実施形態では、標的化ドメインおよび／または標的化ドメイン内のコアドメインは、3～100、5～100、10～100、または20～100ヌクレオチド長であり、これらの実施形態のいくつかでは、標的化ドメインまたはコアドメインは、3～15、3～20、5～20、10～20、15～20、5～50、または20～50ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、標的化ドメインおよび／または標的化ドメイン内のコアドメインは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、標的化ドメインおよび／または標的化ドメイン内のコアドメインは、6+/-2、7+/-2、8+/-2、9+/-2、10+/-2、10+/-4、10+/-5、11+/-2、12+/-2、13+/-2、14+/-2、15+/-2、または16+/-2、20+/-5、30+/-5、40+/-5、50+/-5、60+/-5、70+/-5、80+/-5、90+/-5、あるいは、100+/-5ヌクレオチド長である。

10

【0349】

標的化ドメインがコアドメインを含む特定の実施形態では、コアドメインは、3～20ヌクレオチド長であり、これらの実施形態のいくつかでは、コアドメインは、5～15または8～13ヌクレオチド長である。標的化ドメインが二次ドメインを含む特定の実施形態では、二次ドメインは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15ヌクレオチド長である。標的化ドメインが、8～13ヌクレオチド長のコアドメインを含む特定の実施形態では、標的化ドメインは、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、または16ヌクレオチド長であり、二次ドメインは、13～18、12～17、11～16、10～15、9～14、8～13、7～12、6～11、5～10、4～9、または3～8ヌクレオチド長である。

20

【0350】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと完全に相補的である。同様に、標的化ドメインがコアドメインおよび／または二次ドメインを含む場合、特定の実施形態では、コアドメインと二次ドメインの一方または両方が、標的ドメインの対応部分と完全に相補的である。他の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと部分的に相補的であり、標的化ドメインがコアドメインおよび／または二次ドメインを含むこれらの実施形態のいくつかでは、コアドメインと二次ドメインの一方または両方が、標的ドメインの対応部分と部分的に相補的である。これらの実施形態のいくつかでは、標的化ドメインの核酸配列、または標的化ドメイン内のコアドメインもしくは標的化ドメインは、標的ドメインまたは標的ドメインの対応部分と少なくとも80、85、90、または95%相補的である。特定の実施形態では、標的化ドメインおよび／または標的化ドメイン内のコアもしくは二次ドメインは、標的ドメインまたはその一部と相補的ではない1または複数個のヌクレオチドを含み、これらの実施形態のいくつかでは、標的化ドメインおよび／または標的化ドメイン内のコアもしくは二次ドメインは、標的ドメインと相補的ではない1、2、3、4、5、6、7、または8個のヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、コアドメインは、標的ドメインの対応部分と相補的ではない1、2、3、4、または5個のヌクレオチドを含む。標的化ドメインが、標的ドメインと相補的ではない1または複数個のヌクレオチドを含む特定の実施形態では、前記非相補的ヌクレオチドの1または複数個は、標的化ドメインの5'または3'末端の5ヌクレオチド以内に位置する。これらの実施形態のいくつかでは、標的化ドメインは、標的ドメインと相補的ではないその5'末端、3'末端、またはその5'末端と3'末端の両方の5ヌクレオチド内に1、2、3、4、または5個のヌクレオチドを含む。標的化ドメインが、標的ドメインと相補的ではない2個以上のヌクレオチドを含む特定の実施形態では、前記非相補的ヌクレオチドの2個以上は、互いに隣接しており、これらの実施形態のいくつかでは、2個以上の連続した非相補的ヌク

30

40

50

レオチドは、標的化ドメインの5'または3'末端の5ヌクレオチド以内に位置する。他の実施形態では、2個以上の連続した非相補的ヌクレオチドは、いずれも、標的化ドメインの5'および3'末端から6ヌクレオチド以上に位置する。

【0351】

特定の実施形態では、標的化ドメイン、コアドメイン、および／または二次ドメインは、修飾を一切含まない。他の実施形態では、標的化ドメイン、コアドメイン、および／もしくは二次ドメイン、またはそれらの中の1または複数個のヌクレオチドは、限定はしないが、以下に記載する修飾をはじめとする修飾を有する。特定の実施形態では、標的化ドメイン、コアドメイン、および／または二次ドメインの1または複数個のヌクレオチドは、2'修飾（例えば、リボース上の2'位の修飾）、例えば、2'-アセチル化、例えば、2'メチル化を含んでよい。特定の実施形態では、標的化ドメインの骨格をホスホロチオエートで修飾することができる。特定の実施形態では、標的化ドメイン、コアドメイン、および／または二次ドメインの1つまたは複数のヌクレオチドに対する修飾は、標的化ドメインおよび／または標的化ドメインを含むgRNAを分解に対して低感受性にするか、または、より生体適合性、例えば低免疫原性にする。特定の実施形態では、標的化ドメインおよび／またはコアもしくは二次ドメインは、1、2、3、4、5、6、7、または8つ以上の修飾を含み、これらの実施形態のいくつかでは、標的化ドメインおよび／またはコアもしくは二次ドメインは、それぞれの5'末端の5ヌクレオチド以内に1、2、3、もしくは4つの修飾および／またはそれぞれの3'末端の5ヌクレオチド以内に1、2、3、もしくは4つの修飾を含む。特定の実施形態では、標的化ドメインおよび／またはコアもしくは二次ドメインは、2個以上の連続したヌクレオチドに修飾を含む。

【0352】

標的化ドメインが、コアおよび二次ドメインを含む特定の実施形態では、コアおよび二次ドメインは、同じ数の修飾を含む。これらの実施形態のいくつかでは、いずれのドメインも修飾を含まない。他の実施形態では、コアドメインは、二次ドメインより多くの修飾を含むか、あるいは、その逆である。

【0353】

特定の実施形態では、コアまたは二次ドメイン内を含め、標的化ドメインにおける1または複数個のヌクレオチドに対する修飾は、標的化効率を妨げないように選択され、この効率は、以下に記載されるシステムを用いて、候補修飾を試験することにより、評価することができる。選択された長さ、配列、相補性の程度、または修飾の程度を備えた候補標的化ドメインを有するgRNAは、以下に記載されるシステムを用いて評価することができる。候補標的化ドメインは、選択した標的について機能性であることがわかっているgRNA分子／Cas9分子システム中に、単独で、または1つまたは複数のその他の候補変化と一緒に配置し、評価することができる。

【0354】

特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドの全部が、標的ドメイン中に存在する対応ヌクレオチドと相補的であり、かつそれらとハイブリダイズすることができる。別の実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、または8個以上のヌクレオチドが、標的ドメイン中に存在する対応ヌクレオチドと相補的であり、かつそれらとハイブリダイズすることができる。

【0355】

第1および第2の相補性ドメイン

第1および第2の相補性（それぞれ、crRNA由来のヘアピン配列およびtracrRNA由来のヘアピン配列と呼ばれることもある）ドメインは、互いに完全または部分的に相補的である。特定の実施形態では、相補性の程度は、2つのドメインが少なくともいくつかの生理学的条件下で二本鎖領域を形成するのに十分である。特定の実施形態では、第1および第2の相補性ドメイン同士の相補性の程度は、gRNAの他の特性と共に、Cas9分子の標的核酸への標的化を可能にする上で十分である。第1および第2の相補性ドメインの例は、図1A～1Gに示す。

10

20

30

40

50

【0356】

特定の実施形態では（例えば、図1A～1Bを参照）、第1および／または第2の相補性ドメインは、対応する相補性ドメインとの相補性が不足した1つまたは複数のヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、第1および／または第2の相補性ドメインは、対応する相補性ドメインと相補的ではない1、2、3、4、5、または6個のヌクレオチドを含む。例えば、第2の相補性ドメインは、第1の相補性ドメイン中の対応ヌクレオチドと対合しない1、2、3、4、5、または6個のヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、対応する相補性ドメインと相補的ではない第1または第2の相補性ドメイン上のヌクレオチドは、第1および第2の相補性ドメインの間に形成される二重鎖からループアウト（loop out）する。これらの実施形態のいくつかでは、不對ループアウトは、第2の相補性ドメイン上に位置し、これらの実施形態のいくつかでは、不對領域は、第2の相補性ドメインの5'末端から、1、2、3、4、5、または6番目のヌクレオチドで開始する。

10

【0357】

特定の実施形態では、第1の相補性ドメインは、5～30、5～25、7～25、5～24、5～23、7～22、5～22、5～21、5～20、7～18、7～15、9～16、または10～14ヌクレオチド長であり、これらの実施形態のいくつかでは、第1の相補性ドメインは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、第2の相補性ドメインは、5～27、7～27、7～25、5～24、5～23、5～22、5～21、7～20、5～20、7～18、7～17、9～16、または10～14ヌクレオチド長であり、これらの実施形態のいくつかでは、第2の相補性ドメインは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、第1および第2の相補性ドメインは、各々独立して、6+/-2、7+/-2、8+/-2、9+/-2、10+/-2、11+/-2、12+/-2、13+/-2、14+/-2、15+/-2、16+/-2、17+/-2、18+/-2、19+/-2、または20+/-2、21+/-2、22+/-2、23+/-2、または24+/-2ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、第2の相補性ドメインは、第1の相補性ドメインよりも、例えば、2、3、4、5、または6個分長い。

20

30

【0358】

特定の実施形態では、第1および／または第2の相補性ドメインは、各々独立して、5'から3'方向に、5'サブドメイン、中心サブドメイン、および3'サブドメインである、3つのサブドメインを含む。特定の実施形態では、第1の相補性ドメインの5'サブドメインおよび3'サブドメインは、第2の相補性ドメインの3'サブドメインおよび5'サブドメインそれぞれ、と完全または部分的に相補的である。

【0359】

特定の実施形態では、第1の相補性ドメインの5'サブドメインは、4～9ヌクレオチド長であり、これらの実施形態のいくつかでは、5'サブドメインは、4、5、6、7、8または9ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、第2の相補性ドメインの5'サブドメインは、3～25、4～22、4～18、または4～10ヌクレオチド長であり、これらの実施形態のいくつかでは、5'ドメインは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、第1の相補性ドメインの中心サブドメインは、1、2、または3ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、第2の相補性ドメインの中心サブドメインは、1、2、3、4、または5ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、第1の相補性ドメインの3'サブドメインは、3～25、4～22、4～18、または4～10ヌクレオチド長であり、これらの実施形態のいくつかでは、3'サブドメインは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチド長であ

40

50

る。特定の実施形態では、第2の相補性ドメインの3'サブドメインは、4~9、例えば、4、5、6、7、8または9ヌクレオチド長である。

【0360】

第1および／または第2の相補性ドメインは、天然起源のもしくは参照の第1および／または第2の相補性ドメインと相同性を共有するか、またはそれに由来し得る。これらの実施形態のいくつかでは、第1および／または第2の相補性ドメインは、天然起源のもしくは参照の第1および／または第2の相補性ドメインと、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、もしくは95%の相同性を有するか、またはそれと1、2、3、4、5、もしくは6個以下のヌクレオチドが異なる。これらの実施形態のいくつかでは、第1および／または第2の相補性ドメインは、S. ピオゲネス (S. pyogenes) またはS. アウレウス (S. aureus) と、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、もしくは95%の相同性を有し得る。

10

【0361】

特定の実施形態では、第1および／または第2の相補性ドメインは、修飾を一切含まない。他の実施形態では、第1および／または第2の相補性ドメインもしくはそれらの中の1つまたは複数のヌクレオチドは、限定はしないが、以下に記載する修飾をはじめとする修飾を有する。特定の実施形態では、第1および／または第2の相補性ドメインの1つまたは複数のヌクレオチドは、2'修飾（例えば、リボース上の2'位の修飾）、例えば、2-アセチル化、例えば、2メチル化を含んでよい。特定の実施形態では、標的化ドメインの骨格をホスホロチオエートで修飾することができる。特定の実施形態では、第1および／または第2の相補性ドメインの1つまたは複数のヌクレオチドに対する修飾は、第1および／もしくは第2の相補性ドメインならびに／または第1および／もしくは第2の相補性を含むgRNAを、分解に対して低感受性にするか、または、より生体適合性、例えば低免疫原性にする。特定の実施形態では、第1および／または第2の相補性ドメインは、1、2、3、4、5、6、7、もしくは8つまたはそれ以上の修飾を含み、これらの実施形態のいくつかでは、第1および／または第2の相補性ドメインは、各々独立して、そのそれぞれの5'末端、3'末端、またはその5'末端および3'末端の両方の5ヌクレオチド以内に1、2、3、もしくは4つの修飾を含む。他の実施形態では、第1および／または第2の相補性ドメインは、各々独立して、そのそれぞれの5'末端、3'末端、またはその5'末端および3'末端の両方の5ヌクレオチド以内に修飾を一切含まない。特定の実施形態では、第1および第2の相補性ドメインの一方または両方は、2個以上の連続したヌクレオチドに修飾を含む。

20

30

【0362】

特定の実施形態では、第1および／または第2の相補性ドメイン中の1つまたは複数のヌクレオチドに対する修飾は、標的化効率を妨げないように選択され、これは、以下に記載されるシステムを用いて、候補修飾を試験することにより、評価することができる。選択された長さ、配列、相補性の程度、または修飾の程度を有する候補第1または第2の相補性ドメインを有するgRNA分子は、以下に記載されるシステムを用いて評価することができる。候補相補性ドメインは、選択された標的について機能性であることがわかっていいるgRNA分子／Cas9分子システム中に、単独で、または1つまたは複数のその他の候補変化と一緒に配置し、評価することができる。

40

【0363】

特定の実施形態では、第1および第2の相補性ドメインによって形成される二重鎖領域は、例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または22塩基対長である（あらゆるループアウトまたは不対ヌクレオチドを除く）。

【0364】

特定の実施形態では、第1および第2の相補性ドメインは、二重鎖化すると、11の対形成ヌクレオチドを含む（例えば、配列番号48のgRNAを参照のこと）。特定の実施形態では、第1および第2の相補性ドメインは、二重鎖化すると、15の対形成ヌクレオ

50

チドを含む（例えば、配列番号 50 の gRNA を参照のこと）。特定の実施形態では、第 1 および第 2 の相補性ドメインは、二重鎖化すると、16 の対形成ヌクレオチドを含む（例えば、配列番号 51 の gRNA を参照のこと）。特定の実施形態では、第 1 および第 2 の相補性ドメインは、二重鎖化すると、21 の対形成ヌクレオチドを含む（例えば、配列番号 29 の gRNA を参照のこと）。

【0365】

特定の実施形態では、1 つまたは複数のヌクレオチドは、第 1 および第 2 の相補性ドメインの間で交換されて、ポリ-U 配列が除去される。例えば、配列番号 48 の gRNA のヌクレオチド 23 と 48 またはヌクレオチド 26 と 45 が交換されて、それぞれ、配列番号 49 または 31 の gRNA を生成することができる。同様に、配列番号 29 の gRNA のヌクレオチド 23 と 39 は、ヌクレオチド 50 および 68 と交換されて、配列番号 30 の gRNA を生成することができる。

【0366】

連結ドメイン

単分子またはキメラ gRNA 中では、連結ドメインは、第 1 および第 2 の相補性ドメインの間に配置されて、これらを結合する働きをする。図 1B～1E は、結合ドメインの例を提供する。特定の実施形態では、連結ドメインの一部は、crRNA 由来領域から、別の部分は、tracrRNA 由来領域からのものである。

【0367】

特定の実施形態では、連結ドメインは、第 1 および第 2 の相補性ドメインを共有結合する。特定の実施形態では、連結ドメインは、共有結合から構成されるか、またはこれを含む。他の実施形態では、連結ドメインは、第 1 および第 2 の相補性ドメインを非共有的に結合する。特定の実施形態では、連結ドメインは、10 以下のヌクレオチド長、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 ヌクレオチド長である。他の実施形態では、連結ドメインは、10 を超えるヌクレオチド長、例えば、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、もしくは 25 またはそれ以上のヌクレオチド長である。特定の実施形態では、連結ドメインは、2～50、2～40、2～30、2～20、2～10、2～5、10～100、10～90、10～80、10～70、10～60、10～50、10～40、10～30、10～20、10～15、20～100、20～90、20～80、20～70、20～60、20～50、20～40、20～30、または 20～25 ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、連結ドメインは、10+/-5、20+/-5、30+/-5、30+/-10、40+/-5、40+/-10、50+/-5、50+/-10、60+/-5、60+/-10、70+/-5、70+/-10、80+/-5、80+/-10、90+/-5、90+/-10、100+/-5、または 100+/-10 ヌクレオチド長である。

【0368】

特定の実施形態では、連結ドメインは、天然起源の配列、例えば、第 2 の相補性ドメインの 5' 側にある tracrRNA の配列と相同性を共有するか、またはそれに由来する。特定の実施形態では、結合ドメインは、本明細書に記載される結合ドメイン、例えば図 1B～1E の結合ドメインと少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、もしくは 95% の相同性を有するか、またはそれらと 1、2、3、4、5、もしくは 6 個のヌクレオチドしか違わない。

【0369】

特定の実施形態では、連結ドメインは、修飾を一切含まない。他の実施形態では、連結ドメインまたはその中の 1 つまたは複数のヌクレオチドは、限定はしないが、以下に記載する修飾などの修飾を有する。特定の実施形態では、連結ドメインの 1 つまたは複数のヌクレオチドは、2' 修飾（例えば、リボース上の 2' 位の修飾）、例えば、2'-アセチル化、例えば、2'-メチル化を含んでもよい。特定の実施形態では、連結ドメインの骨格をホスホロチオエートで修飾することができる。特定の実施形態では、連結ドメインの 1 つまたは複数のヌクレオチドに対する修飾は、連結ドメインおよび/または連結ドメインを含む

gRNAを、分解に対して低感受性にするか、または、より生体適合性、例えば低免疫原性にする。特定の実施形態では、連結ドメインは、1、2、3、4、5、6、7、もしくは8つまたはそれ以上の修飾を含み、これらの実施形態のいくつかでは、連結ドメインは、その5'末端および／または3'末端から5ヌクレオチド以内に1、2、3、もしくは4つの修飾を含む。特定の実施形態では、連結ドメインは、2個以上の連続したヌクレオチドに修飾を含む。

【0370】

特定の実施形態では、連結ドメイン中の1つまたは複数のヌクレオチドに対する修飾は、標的化効率を妨げないように選択され、これは、以下に記載されるシステムを用いて候補修飾を試験することにより、評価することができる。選択された長さ、配列、相補性の程度、または修飾の程度を有する候補連結ドメインを有するgRNAは、以下に記載されるシステムで評価することができる。候補連結ドメインは、選択された標的について機能性であることがわかっているgRNA分子／Cas9分子システム中に、単独で、または1つまたは複数のその他の候補変化と一緒に配置し、評価することができる。

【0371】

特定の実施形態では、連結ドメインは、典型的に、第1の相補性ドメインの3'末端、および／または第2の相補性ドメインの5'末端に隣接するか、またはそれから1、2、または3ヌクレオチド以内である、二重鎖領域を含む。これらの実施形態のいくつかでは、連結領域の二重鎖領域は、10+／-5、15+／-5、20+／-5、または30+／-5塩基対の長さである。特定の実施形態では、連結ドメインの二重鎖領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15塩基対の長さである。特定の実施形態では、二重鎖領域を形成する配列は、完全に相補的である。他の実施形態では、二重鎖領域を形成する配列の一方または両方は、他方の二重鎖配列と相補的ではない1つまたは複数のヌクレオチド（例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8ヌクレオチド）を含む。

【0372】

5'伸長ドメイン

一実施形態では、本明細書に開示されるモジュラーgRNAは、5'伸長ドメイン、すなわち、第2の相補性ドメインの5'側に1つまたは複数の追加ヌクレオチドを含む（例えば、図1Aを参照）。特定の実施形態では、5'伸長ドメインは、2～10以上、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、または2～4ヌクレオチド長であり、これらの実施形態のいくつかでは、5'伸長ドメインは、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長以上である。

【0373】

特定の実施形態では、5'伸長ドメインヌクレオチドは、例えば、セクションVIIIIで提供されるタイプの修飾などの修飾を含まない。しかし、特定の実施形態では、5'伸長ドメインは、例えば、分解の影響を受けにくくする、または例えば、より低い免疫原性などより生体適合性にする修飾などの1つまたは複数の修飾を含む。一例として、5'伸長ドメインの骨格は、ホスホロチオエートで、または以下に記載のその他の修飾で、修飾され得る。特定の実施形態では、5'伸長ドメインのヌクレオチドは、例えば、2-アセチル化、例えば、2'メチル化、または以下に記載のその他の修飾などの2'修飾（例えば、リボース上の2'位置での修飾）を含み得る。

【0374】

特定の実施形態では、5'伸長ドメインは、1、2、3、4、5、6、7または8程度の数の修飾を含み得る。特定の実施形態では、5'伸長ドメインは、例えば、モジュラーgRNA分子中などのその5'末端の5ヌクレオチド以内に、1、2、3、または4程度の数の修飾を含む。特定の実施形態では、5'伸長ドメインは、例えば、モジュラーgRNA分子中などのその3'末端の5ヌクレオチド以内に、1、2、3、または4程度の数の修飾を含む。

【0375】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、5'伸長ドメインは、例えば、5'伸長ドメインの5'末端の5ヌクレオチド以内にあり、5'伸長ドメインの3'末端の5ヌクレオチド以内にあり、または5'伸長ドメインの片方または双方の末端から5ヌクレオチドを超えて離れた2連続ヌクレオチドなどの2連続ヌクレオチドに、修飾を含む。特定の実施形態では、5'伸長ドメインの5'末端の5ヌクレオチド以内にあり、5'伸長ドメインの3'末端の5ヌクレオチド以内にあり、または5'伸長ドメインの片方または双方の末端から5ヌクレオチドを超えて離れた2連続ヌクレオチドは、修飾されていない。特定の実施形態では、5'伸長ドメインの5'末端の5ヌクレオチド以内にあり、5'伸長ドメインの3'末端の5ヌクレオチド以内にあり、または5'伸長ドメインの片方または双方の末端から5ヌクレオチドを超えて離れたヌクレオチドは、修飾されていない。

10

【0376】

5'伸長ドメイン中の修飾は、セクションIVに記載されるシステム中で候補修飾を試験することで評価されるgRNA分子効率を妨げないように、選択され得る。選択された長さ、配列、相補性程度、または修飾程度を有する候補5'伸長ドメインを有するgRNAは、以下に記載されるシステム中で評価され得る。候補5'伸長ドメインは、選択された標的について機能的であることが知られているgRNA分子/Cas9分子システム中に、単独で配置され、または1つまたは複数のその他の候補変化と共に配置されて、評価され得る。

【0377】

特定の実施形態では、5'伸長ドメインは、例えば、S.ピオゲネス(*S. pyogenes*)、S.アウレウス(*S. aureus*)、またはS.サーモフィルス(*S. thermophilus*)などの天然起源の5'伸長ドメインと、本明細書、例えば、図1A~1Gに記載される5'伸長ドメインなどの参照5'伸長ドメインと、少なくとも60%、70%、80%、85%、90%または95%の相同性を有し、またはそれと1、2、3、4、5、または6個以下のヌクレオチドが異なる。

20

【0378】

隣接ドメイン

図1A~1Gは、隣接ドメインの例を提供する。特定の実施形態では、隣接ドメインは、5~20ヌクレオチド長、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26ヌクレオチド長である。これらの実施形態のいくつかでは、隣接ドメインは、6+/-2、7+/-2、8+/-2、9+/-2、10+/-2、11+/-2、12+/-2、13+/-2、14+/-2、14+/-2、16+/-2、17+/-2、18+/-2、19+/-2、または20+/-2ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、隣接ドメインは、5~20、7~18、9~16、または10~14ヌクレオチド長である。

30

【0379】

特定の実施形態では、隣接ドメインは、天然起源の隣接ドメインと相同性を共有するか、またはそれに由来し得る。これらの実施形態のいくつかでは、隣接ドメインは、本明細書に開示される隣接ドメイン、例えば、図1A~1Gに記載されるものを含む、S.ピオゲネス(*S. pyogenes*)、S.アウレウス(*S. aureus*)、またはS.サーモフィルス(*S. thermophilus*)などの天然起源の隣接ドメインと、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、または95%の相同性を有するか、またはそれと1、2、3、4、5、または6個以下のヌクレオチドが異なる。

40

【0380】

特定の実施形態では、隣接ドメインは、修飾を一切含まない。他の実施形態では、隣接ドメインまたはその中の1つまたは複数のヌクレオチドは、限定はしないが、本明細書に記載される修飾などの修飾を含む。特定の実施形態では、隣接ドメインの1つまたは複数のヌクレオチドは、2'修飾(例えば、リボース上の2'位の修飾)、例えば、2'-アセチル化、例えば、2'メチル化を含んでもよい。特定の実施形態では、隣接ドメインの骨格をホスホロチオエートで修飾することができる。特定の実施形態では、隣接ドメインの1つ

50

または複数のヌクレオチドに対する修飾は、隣接ドメインおよび／または隣接ドメインを含む gRNA を、分解に対して低感受性にするか、または、より生体適合性、例えば低免疫原性にする。特定の実施形態では、隣接ドメインは、1、2、3、4、5、6、7、または8つ以上の修飾を含み、これらの実施形態のいくつかでは、隣接ドメインは、その5'末端および／または3'末端から5ヌクレオチド以内に1、2、3、もしくは4つの修飾を含む。特定の実施形態では、隣接ドメインは、2個以上の連続したヌクレオチドに修飾を含む。

【0381】

特定の実施形態では、隣接ドメイン中の1つまたは複数のヌクレオチドに対する修飾は、標的化効率を妨げないように選択され、これは、以下に記載されるシステムで候補修飾を試験することにより、評価することができる。選択された長さ、配列、相補性程度、または修飾程度を有する候補隣接ドメインを有する gRNA は、以下に記載されるシステムで評価することができる。候補隣接ドメインは、選択された標的について機能性であることがわかっている gRNA 分子／Cas9 分子システム中に、単独で、または1つまたは複数のその他の候補変化と一緒に配置し、評価することができる。

【0382】

テールドメイン

多様なテールドメインが、本明細書に開示される gRNA 分子での使用に好適である。図1Aおよび図1C～1Gは、そのようなテールドメインの例を提供する。

【0383】

特定の実施形態では、テールドメインは、存在しない。他の実施形態では、テールドメインは、1～100ヌクレオチド長、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、テールドメインは、1～5、1～10、1～15、1～20、1～50、10～100、20～100、10～90、20～90、10～80、20～80、10～70、20～70、10～60、20～60、10～50、20～50、10～40、20～40、10～30、20～30、20～25、10～20、または10～15ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、テールドメインは、5+／-5、10+／-5、20+／-5、25+／-10、30+／-10、30+／-5、40+／-10、40+／-5、50+／-10、50+／-5、60+／-10、60+／-5、70+／-10、70+／-5、80+／-10、80+／-5、90+／-10、90+／-5、100+／-10または100+／-5ヌクレオチド長である。

【0384】

特定の実施形態では、テールドメインは、天然起源のテールドメインもしくは天然起源のテールドメインの5'末端と相同性を共有するか、またはそれに由来し得る。これらの実施形態のいくつかでは、隣接ドメインは、本明細書に開示される天然起源のテールドメイン、例えば、図1Aおよび1C～1Gに記載されるものを含む、S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. アウレウス (S. aureus)、またはS. サーモフィルス (S. thermophilus) テールドメインと、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、または95%の相同性を有するか、またはそれと1、2、3、4、5、または6個以下のヌクレオチドが異なる。

【0385】

特定の実施形態では、テールドメインは、互いに相補的で、しかも、少なくともいくつかの生理学的条件下で二重鎖領域を形成する配列を含む。これらの実施形態のいくつかでは、テールドメインは、テール二重鎖領域を形成しうるテール二重鎖ドメインを含む。特定の実施形態では、テール二重鎖領域は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12塩基対長である。特定の実施形態では、テールドメインは、二重鎖を形成しないテール二重鎖ドメインの3'側に一本鎖ドメインを含む。これらの実施形態のいくつかでは、一本鎖ドメインは、3～10ヌクレオチド長、例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、または4～6ヌクレオチド長である。

【0386】

特定の実施形態では、テールドメインは、修飾を一切含まない。他の実施形態では、テールドメインまたはその中の1つまたは複数のヌクレオチドは、限定はしないが、本明細書に記載される修飾などの修飾を含む。特定の実施形態では、テールドメインの1つまたは複数のヌクレオチドは、2'修飾（例えば、リボース上の2'位の修飾）、例えば、2'-アセチル化、例えば、2'-メチル化を含んでもよい。特定の実施形態では、テールドメインの骨格をホスホロチオエートで修飾することができる。特定の実施形態では、テールドメインの1つまたは複数のヌクレオチドに対する修飾は、テールドメインおよび／またはテールドメインを含むgRNAを、分解に対して低感受性にするか、または、より生体適合性、例えば低免疫原性にする。特定の実施形態では、テールドメインは、1、2、3、4、5、6、7、または8つ以上の修飾を含み、これらの実施形態のいくつかでは、テールドメインは、その5'末端および／または3'末端から5ヌクレオチド以内に1、2、3、もしくは4つの修飾を含む。特定の実施形態では、テールドメインは、2個以上の連続したヌクレオチドに修飾を含む。

10

【0387】

特定の実施形態では、テールドメイン中の1つまたは複数のヌクレオチドに対する修飾は、標的化効率を妨げないように選択され、これは、以下に記載されるように候補修飾を試験することにより、評価することができる。選択された長さ、配列、相補性程度、または修飾程度を有する候補テールドメインを有するgRNAは、以下に記載されるシステムを用いて評価することができる。候補テールドメインは、選択された標的について機能性であることがわかっているgRNA分子／Cas9分子システム中に、単独で、または1つまたは複数のその他の候補変化と一緒に配置し、評価することができる。

20

【0388】

特定の実施形態では、テールドメインは、生体外または生体内転写法に関連する、3'末端のヌクレオチドを含む。gRNAの生体外転写のためにT7プロモーターが使用される場合、これらのヌクレオチドは、DNAテンプレートの3'末端の前に存在する、任意のヌクレオチドであってもよい。生体内転写のためにU6プロモーターが使用される場合、これらのヌクレオチドは、UUUUUU配列であってもよい。転写のためにH1プロモーターが使用される場合、これらのヌクレオチドは、UUUU配列であってもよい。交互の(alternate)poly-IIIプロモーターが利用される場合、これらのヌクレオチドは、例えば、poly-IIIプロモーターの終結シグナルに応じて様々な数のウラシル塩基であってもよいし、または交互の(alternate)塩基を含んでもよい。

30

【0389】

特定の実施形態では、隣接およびテールドメインは、一緒に、配列番号32、33、34、35、36、または37に記載される配列を含むか、これから構成されるか、またはほぼこれから構成される。

【0390】

gRNAの生体内およびインビトロ転写

T7RNAポリメラーゼが、転写を開始するためにGを必要とすることを考慮すれば、T7プロモーターは、プロモーター下流のgRNA配列全体の転写を確実にするために、典型的にはその3'末端に2つのGを有する（例えば、

40

【化1】

TAATACGACTCACTATAGG,

、2つの3'末端Gは下線で示す（配列番号209））。しかし、その結果、生成される転写物は、プロモーター配列由来の少なくとも1つのG、そうでなければ両方を含むことになる、これによって、gRNA特異性またはgRNAとCas9タンパク質同士の相互作用が改変され得る。gRNA標的配列がGで開始する（例えば、T7プロモーターを用いたインビトロ転写により調製しようとするgRNA分子の標的化ドメインが、次の

50

標的化ドメイン配列：

【化 2】

GTAACGGCAGACTTCTCCTC (配列番号206)

を含む場合のこの懸念事項に対処するため、T7プロモーターの3'末端のGの1つだけが除去されるように、gRNA PCRテンプレート内でコードされるT7プロモーター配列を修飾することができる：（修飾T7プロモーター配列：TAATACGACTCACTATA（配列番号211）。従って、gRNA PCRテンプレートの5'センスプライマーを

【化 3】

CACCGCTAGCTAATACGACTCACTATAGTAACGGCAGACTTCTCCTCGTTTTAGAGCTAG
AAATA (配列番号207)

としてを設計することができる（ここで、修飾T7プロモーター配列は、下線で示す）。Gで開始しないgRNA標的配列（例えば、T7プロモーターを用いたインビトロ転写により調製しようとするgRNA分子の標的化ドメインが、次の標的化ドメイン配列：

【化 4】

AAGGTGAACGTGGATGAAGT (配列番号208)

を含む）については、T7プロモーターの3'末端のGの1つだけが除去されるように、gRNA PCRテンプレート内でコードされるT7プロモーター配列を修飾することができる：（修飾T7プロモーター配列：

【化 5】

TAATACGACTCACTATAGU (配列番号210)

【0391】

T7プロモーター配列および修飾T7プロモーター配列は、本明細書に記載される配列に限定されない。例えば、T7プロモーター配列（およびその修飾物）は、Registry of Standard Biological Partsの「Promoters/Catalog/T7」（[http:// address: parts. igem. org/Promoters/Catalog/T7](http://address.parts.igem.org/Promoters/Catalog/T7)に位置する）に示される配列の少なくともいずれかであってよい。本開示は、本明細書で開示されるgRNAが、本明細書で記載される修飾T7プロモーター配列を含むDNAテンプレートからの生体外転写により生成され、ここで、3'末端のGの1つまたは複数が除去される（例えば、配列

【化 6】

TAATACGACTCACTATAGU (配列番号210)

が、その5'末端でGが欠失する標的化ドメインのすぐ上流に位置するか、または配列TAATACGACTCACTATA（配列番号211）が、その5'末端にGを有する標的化ドメインのすぐ上流に位置する）方法を包含することは理解すべきである。これらの修飾T7プロモーターに対する他の改変は、Registry of Standard Biological Partsの「Promoters/Catalog/T7」（[http:// address: parts. igem. org/Promoters/Catalog/T7](http://address.parts.igem.org/Promoters/Catalog/T7)に位置し、その全体が参照により本明細書で援用される）に示される配列の少なくともいずれかを含む他のT7プロモーター配列に基づいて、当業者によって

認識されるであろう。

【0392】

例示的な単分子／キメラ gRNA

特定の実施形態では、本明細書に開示される単分子またはキメラ gRNA は、5' [標的化ドメイン] - [第1の相補性ドメイン] - [連結ドメイン] - [第2の相補性ドメイン] - [隣接ドメイン] - [テールドメイン] - 3' の構造を有し、

式中、

標的化ドメインは、コアダメインおよび任意選択的に二次ドメインを含み、10～50ヌクレオチド長であり；

第1の相補性ドメインは、5～25ヌクレオチド長であり、特定の実施形態では、本明細書で開示される参照の第1の相補性ドメインと、少なくとも50、60、70、80、85、90、または95%の相同性を有し；

連結ドメインは、1～5ヌクレオチド長であり；

第2の相補性ドメインは、5～27ヌクレオチド長であり、特定の実施形態では、本明細書で開示される参照の第2の相補性ドメインと、少なくとも50、60、70、80、85、90、または95%の相同性を有し；

隣接ドメインは、5～20ヌクレオチド長であり、特定の実施形態では、本明細書で開示される参照隣接相補性ドメインと、少なくとも50、60、70、80、85、90、または95%の相同性を有し；

および

テールドメインは非存在であり、またはヌクレオチド配列は、1～50ヌクレオチド長であり、特定の実施形態では、本明細書で開示される参照テールドメインと、少なくとも50、60、70、80、85、90、または95%の相同性を有する。

【0393】

特定の実施形態では、本明細書に開示される単分子 gRNA は、好ましくは、5' から3方向に以下；例えば、10～50ヌクレオチドを含む標的化ドメイン；例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26ヌクレオチドなどを含む第1の相補性ドメイン；連結ドメイン；第2の相補性ドメイン；隣接ドメイン；およびテールドメインを含み、

式中、

(a) 隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；

(b) 第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3' 側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；または

(c) 第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3' 側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

【0394】

特定の実施形態では、(a)、(b)、および／または(c)からの配列は、天然起源 gRNA の対応する配列と、または本明細書に記載される gRNA と、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の相同性を有する。

【0395】

特定の実施形態では、隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、または53ヌクレオチドを含む。

【0396】

特定の実施形態では、第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3' 側に、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、または53ヌ

10

20

30

40

50

クレオチドがある。

【0397】

特定の実施形態では、第1の相補性ドメインの対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

【0398】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインまたはその一部分と相補的であるか、もしくは部分的に相補的である、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26ヌクレオチド（例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26連続ヌクレオチド）を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26ヌクレオチド長である。これらの実施形態のいくつかでは、標的化ドメインは、標的化ドメインの全長、標的ドメインの全長、または双方にわたって標的ドメインと相補的である。

【0399】

特定の実施形態では、本明細書に開示される単分子またはキメラのgRNA分子（標的化ドメイン、第1の相補性ドメイン、連結ドメイン、第2の相補性ドメイン、隣接ドメイン、および任意選択的に、テールドメインを含む）は、配列番号42に記載されるアミノ酸配列を含み、そこで、標的化ドメインは、20個のN（残基1～20）として列記されるが、それは、16～26ヌクレオチド長の範囲であってよく、その中で最後の6つの残基（残基97～102）は、U6プロモーターの終結シグナルを表すが、それは存在しなくても、またはより少数であってもよい。特定の実施形態では、単分子、またはキメラのgRNA分子は、S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）gRNA分子である。

【0400】

特定の実施形態では、本明細書に開示される単分子またはキメラgRNA分子（標的化ドメイン、第1の相補性ドメイン、連結ドメイン、第2の相補性ドメイン、隣接ドメイン、および任意選択的に、テールドメインを含む）は、配列番号38に記載されるアミノ酸配列を含み、そこで、標的化ドメインは、20個のN（残基1～20）として列記されるが、それは、16～26ヌクレオチド長の範囲であってよく、その中で最後の6つの残基（残基97～102）は、U6プロモーターの終結シグナルを表すが、それは存在しなくてもよいし、またはより少数であってもよい。特定の実施形態では、単分子またはキメラgRNA分子は、S.アウレウス（*S. aureus*）gRNA分子である。

【0401】

例示的なキメラgRNAの配列および構造も図1H～1Iに示す。

【0402】

例示的なモジュラーgRNA

特定の実施形態では、本明細書に開示されるモジュラーgRNAは、好ましくは、5'から3方向に以下；例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26ヌクレオチドを含む標的化ドメイン；第1の相補性ドメインを含む第1鎖と；好ましくは、5'から3方向に以下；任意選択的に5'伸長ドメイン；第2の相補性ドメイン；隣接ドメイン；およびテールドメインを含む第2鎖とを含み、

式中、

(a) 隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；

(b) 第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；または

(c) 第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

【0403】

特定の実施形態では、(a)、(b)、または(c)からの配列は、天然起源gRNAの対応する配列と、または本明細書に記載されるgRNAと、少なくとも60、75、80、85、90、95、または99%の相同性を有する。

【0404】

特定の実施形態では、隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、または53ヌクレオチドを含む。

【0405】

特定の実施形態では、第2の相補的ドメインの最後のヌクレオチドに対して3'に、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、または53ヌクレオチドがある。

10

【0406】

特定の実施形態では、第1の相補的ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補的ドメインの最後のヌクレオチドに対して3'に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインとの相補性を有する、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26ヌクレオチド（例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26連続ヌクレオチド）を含み、それを有し、またはそれからなり、例えば、標的化ドメインは、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26ヌクレオチド長である。

20

【0407】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインまたはその一部分と相補的である、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26ヌクレオチド（例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26連続ヌクレオチド）を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなる。これらの実施形態のいくつかでは、標的化ドメインは、標的ドメインの全長、標的ドメインの全長、または双方にわたって標的ドメインと相補的である。

【0408】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと相補性を有する16ヌクレオチド（例えば、16連続ヌクレオチド）を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、16ヌクレオチド長である。これらの実施形態の特定の実施形態では、(a) 隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；(b) 第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；ならびに／または(c) 第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

30

40

【0409】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと相補性を有する17ヌクレオチド（例えば、17連続ヌクレオチド）を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、17ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、(a) 隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；(b) 第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；ならびに／または(c) 第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、3

50

1、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

【0410】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと相補性を有する18ヌクレオチド（例えば、18連続ヌクレオチド）を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、18ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、（a）隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；（b）第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；ならびに／または（c）第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

10

【0411】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと相補性を有する19ヌクレオチド（例えば、19連続ヌクレオチド）を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、19ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、（a）隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；（b）第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；ならびに／または（c）第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

20

【0412】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと相補性を有する20ヌクレオチド（例えば、20連続ヌクレオチド）を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、20ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、（a）隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；（b）第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；ならびに／または（c）第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

30

【0413】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと相補性を有する21ヌクレオチド（例えば、21連続ヌクレオチド）を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、21ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、（a）隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；（b）第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；ならびに／または（c）第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

40

【0414】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと相補性を有する22ヌクレオチド（例えば、22連続ヌクレオチド）を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、22ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、（a）隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、

50

30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；(b) 第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；ならびに／または(c) 第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

【0415】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと相補性を有する23ヌクレオチド(例えば、23連続ヌクレオチド)を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、23ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、(a) 隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；(b) 第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；ならびに／または(c) 第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

【0416】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと相補性を有する24ヌクレオチド(例えば、24連続ヌクレオチド)を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、24ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、(a) 隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；(b) 第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；ならびに／または(c) 第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

【0417】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと相補性を有する25ヌクレオチド(例えば、25連続ヌクレオチド)を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、25ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、(a) 隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；(b) 第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；ならびに／または(c) 第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

【0418】

特定の実施形態では、標的化ドメインは、標的ドメインと相補性を有する26ヌクレオチド(例えば、26連続ヌクレオチド)を含むか、それからなるか、またはほぼそれからなり、例えば、標的化ドメインは、26ヌクレオチド長である。特定の実施形態では、(a) 隣接およびテールドメインは、一緒になって、少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドを含み；(b) 第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に少なくとも15、18、20、25、30、31、35、40、45、49、50、もしくは53ヌクレオチドがあり；ならびに／または(c) 第1の相補性ドメインのその対応するヌクレオチドと相補的な第2の相補性ドメインの最後のヌクレオチドの3'側に、少なくとも16、19、21、26、31、32、36、41、46、50、51、または54ヌクレオチドがある。

【0419】

gRNA送達

本明細書に提供される方法の特定の実施形態では、本方法は、本明細書に記載される1つまたは複数（例えば、2つ、3つ、もしくは4つ）のgRNA分子の送達を含む。これらの実施形態のいくつかでは、gRNA分子は、肝臓内注射、肝臓への実質内注射、肺への実質内注射、門脈への静脈内注射、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、または吸入により送達される。

【0420】

II. gRNAをデザインする方法

標的ドメインを選択し、デザインし、検証する方法をはじめとする、gRNAをデザインする方法が本明細書に記載される。例示的な標的化ドメインもまた、本明細書で提供される。本明細書で考察される標的化ドメインは、本明細書に記載されるgRNAに組み込むことができる。

【0421】

標的配列の選択および検証、ならびにオフターゲット分析の方法は、例えば、以下Mali 2013 Science 339 (6121): 823-826; Hsu et al., Nat Biotechnol, 31 (9): 827-32; Fu et al., 2014 Nat Biotechnol, doi:10.1038/nbt.2808. PubMed PMID: 24463574; Heigwer et al., 2014 Nat Methods 11 (2): 122-3. doi:10.1038/nmeth.2812. PubMed PMID: 24481216; Bae et al., 2014 Bioinformatics PubMed PMID: 24463181; Xiao A et al., 2014 Bioinformatics PubMed PMID: 24389662に記載されている。

【0422】

例えば、ソフトウェアツールを用いて、例えば、ゲノム全体にわたる総オフターゲット活性の最小化など、使用者の標的配列内のgRNAの選択を最適化することができる。オフターゲット活性は、切断以外であってもよい。S. ピオゲネス (S. pyogenes) Cas9を使用するそれぞれの可能なgRNA選択のために、上記ツールは、特定数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）以下のミスマッチ塩基対を含有するゲノム全域で、全てのオフターゲット配列（NAGまたはNGG PAMのどちらかに先行する）を同定することができる。各オフターゲット配列における切断効率は、例えば、実験的に誘導される重みづけスキームを使用して予測することができる。次に、考えられるgRNAが各々、その全予測オフターゲット切断に従って格付けされ；最高位のgRNAは、最大のオンターゲットと最小のオフターゲット切断を有する可能性が高いものを表す。例えば、CRISPR構築のための自動化された試薬デザイン、オンターゲットサーベイヤー (Surveyor) アッセイ用のプライマーデザイン、および次世代シーケンシングを介したオフターゲット切断のハイスループット検出と定量化のためのプライマーデザインなどのその他の機能もまた、ツールに包含され得る。候補gRNA分子は、当該技術分野で周知の方法によって、または本明細書のセクションIVに記載されるようにして、評価することができる。S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. アウレウス (S. aureus)、およびN. メニンジチディス (N. meningitidis) Cas9と共に使用されるガイドRNA (gRNA) が、DNA配列検索アルゴリズムを用いて同定された。ガイドRNAデザインは、公共ツールcas-offinderに基づく特定用途向けガイドRNA設計ソフトウェアを使用して実施された（参照：Cas-Offinder: Cas9 RNA誘導エンドヌクレアーゼの潜在的オフターゲット部位を検索する高速多用途アルゴリズム、Bioinformatics. 2014 Feb 17. Bae S, Park J, Kim JS. PMID: 24463181）。前記特定用途向けガイドRNA設計ソフトウェアは、それらの全ゲノムでのオフターゲット性向を計算した後に、ガイドをスコアする。典型的に、完全な一致から7つのミス

10

20

30

40

50

ッチに至るマッチが、17～24の長さに至るガイドのために検討される。ひとたびオフターゲット部位が計算的に判定されたら、各ガイドについて集約スコアが計算されて、ウェブインタフェースを使用して、表形式の出力に要約された。PAM配列に隣接する可能なgRNA部位を同定するのに加えて、ソフトウェアはまた、選択されたgRNA部位と、1、2、3つ以上のヌクレオチドが異なる、全てのPAM隣接配列も同定する。各遺伝子のゲノムのDNA配列は、UCSCゲノムブラウザから得られ、配列は、公的に利用可能なRepeatMaskerプログラムを使用して、反復要素についてスクリーニングされる。RepeatMaskerは、反復要素および低複雑度領域について、供試DNA配列を検索する。結果は、所与のクエリー配列中に存在する反復の詳細な注釈である。

【0423】

同定の後、gRNAが、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体の配列を標的化する頻度に基づいてgRNAを分類した。「頻度」は、例えば、本明細書に記載されるデータベースに開示されているように、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1について、対立遺伝子変異体の総数に対して、gRNAが標的化する対立遺伝子変異体の数を指す。例えば、gRNAが、ある遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体の全てを標的化する場合、gRNAは、100%の頻度で特定の遺伝子座の対立遺伝子変異体を標的化する。

【0424】

これに続いて、RNAは、標的部位に対するそれらの距離、それらの直交性または5' Gの存在に基づいて階層にランク付けされた（例えばS.ピオゲネス（*S. pyogenes*）の場合は、NGG PAM、S.アウレウス（*S. aureus*）の場合は、NNGRRN（配列番号203）（例えばNNGRRT（配列番号204）またはNNGRRV（配列番号205））PAM、およびN.メニンジチディス（*N. meningitidis*）の場合は、NNNNGATT（配列番号212）またはNNNNGCTT（配列番号213）PAMなどの妥当な（relevant）PAMを含有するヒトゲノム中の近いマッチの同定に基づく）。直交性は、標的配列に対する最小数のミスマッチを含有するヒトゲノム中の配列数を指す。「高レベルの直交性」または「良好な直交性」は、例えば、ヒトゲノム中に意図される標的以外の同一配列を有さず、または標的配列中に1つまたは2つのミスマッチを含有する任意の配列を有さない、20量体gRNAを指してもよい。良好な直交性がある標的化ドメインが選択されて、オフターゲットDNA切断が最小化される。

【0425】

一例として、S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）およびN.メニンジチディス（*N. meningitidis*）標的について、17量体、または20量体gRNAがデザインされた。別の例として、S.アウレウス（*S. aureus*）標的については、18量体、19量体、20量体、21量体、22量体、23量体、および24量体gRNAがデザインされている。本明細書に開示される標的化ドメインは、17量体を含み得る。18以上のヌクレオチドの標的化ドメインは、17量体を含み得る。本明細書に開示される標的化ドメインは、18量体を含み得る。19以上のヌクレオチドの標的化ドメインは、18量体を含み得る。本明細書に開示される標的化ドメインは、19量体を含み得る。20以上のヌクレオチドの標的化ドメインは、19量体を含み得る。本明細書に開示される標的化ドメインは、20量体を含み得る。21以上のヌクレオチドの標的化ドメインは、20量体を含み得る。本明細書に開示される標的化ドメインは、21量体を含み得る。22以上のヌクレオチドの標的化ドメインは、21量体gRNAを含み得る。本明細書に開示される標的化ドメインは、22量体を含み得る。23以上のヌクレオチドの標的化ドメインは、22量体を含み得る。本明細書に開示される標的化ドメインは、23量体を含み得る。24以上のヌクレオチドの標的化ドメインは、23量体を含み得る。本明細書に

10

20

30

40

50

開示される標的化ドメインは、24量体を含み得る。25以上のヌクレオチドの標的化ドメインは、24量体gRNAを含み得る。

【0426】

一例として、*S. pyogenes* (*S. pyogenes*)、*S. aureus* (*S. aureus*) および *N. meningitidis* (*N. meningitidis*) Cas9 酵素を用いて使用するためにgRNAが設計された。*S. pyogenes* (*S. pyogenes*) についてgRNAが同定され、4つの階層にランク付けされた。階層1のgRNA分子の*S. pyogenes* (*S. pyogenes*) Cas9 酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、(1) 標的部位 (例えば、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離、(2) 高レベルの直交性、および(3) 5' Gの存在に基づいて選択された。階層2のgRNA分子の*S. pyogenes* (*S. pyogenes*) Cas9 酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、(1) 標的部位 (例えば、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離、および(2) 高レベルの直交性に基づいて選択された。階層3のgRNA分子の*S. pyogenes* (*S. pyogenes*) Cas9 酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、(1) 標的部位 (例えば、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離、および(2) 5' Gの存在に基づいて選択された。階層4のgRNA分子の*S. pyogenes* (*S. pyogenes*) Cas9 酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、標的部位 (例えば、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離に基づいて選択された。

【0427】

S. aureus (*S. aureus*) についてgRNAが同定され、妥当な (relevant) PAMが、NNGRRTまたはNNGRRVであるとき、5つの階層にランク付けされた。階層1のgRNA分子の*S. aureus* (*S. aureus*) Cas9 酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、(1) 標的部位 (例えば、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離、(2) 高レベルの直交性、(3) 5' Gの存在、および(4) PAMがNNGRRTであることに基づいて選択された。階層2のgRNA分子の*S. aureus* (*S. aureus*) Cas9 酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、(1) 標的部位 (例えば、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離、(2) 高レベルの直交性、(3) PAMがNNGRRTであることに基づいて選択された。階層3のgRNA分子の*S. aureus* (*S. aureus*) Cas9 酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、(1) 標的部位 (例えば、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3/4/5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離、(2) 5' Gの存在、および(3) PAMがNNGRRTであることに基づいて選択された。階層4のgRNA分子の*S. aureus* (*S. aureus*) Cas9 酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、(1) 標的部位 (例えば、特定の遺伝子座、

例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離および(2) PAMがNNGRRVであることに基づいて選択された。

【0428】

N. メニンジチディス(N. meningitidis)についてgRNAが同定され、4つの階層にランク付けされた。N. メニンジチディス(N. meningitidis)についてgRNAが同定され、4つの階層にランク付けされた。階層1のgRNA分子のN. メニンジチディス(N. meningitidis) Cas9酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、(1) 標的部位(例えば、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離、(2) 高レベルの直交性、および(3) 5' Gの存在に基づいて選択された。階層2のgRNA分子のN. メニンジチディス(N. meningitidis) Cas9酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、(1) 標的部位(例えば、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離、および(2) 高レベルの直交性に基づいて選択された。階層3のgRNA分子のN. メニンジチディス(N. meningitidis) Cas9酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、(1) 標的部位(例えば、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離、および(2) 5' Gの存在に基づいて選択された。階層4のgRNA分子のN. メニンジチディス(N. meningitidis) Cas9酵素と一緒に使用される標的化ドメインは、標的部位(例えば、特定の遺伝子座、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、もしくはHLA-DQB1の対立遺伝子変異体配列のコード配列を標的化する) に対する距離に基づいて選択された。

【0429】

一実施形態では、単一gRNA分子を用いて、Cas9ニッカーゼを標的化することにより、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、もしくはHLA-DQB1などの対立遺伝子変異体配列のコード配列に一本鎖切断を生成する。

【0430】

一実施形態では、単一gRNA分子を用いて、Cas9ヌクレアーゼを標的化することにより、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、もしくはHLA-DQB1などの対立遺伝子変異体配列のコード配列に二本鎖切断を生成する。

【0431】

一実施形態では、二重標的化を用いて、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、もしくはHLA-DQB1などの対立遺伝子変異体配列のコード配列に2つの二本鎖切断を生成する。一実施形態では、2つのgRNAを用いて、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、もしくはHLA-DQB1などの対立遺伝子変異体配列のコード配列内の1位置の上流または下流いずれかを標的化する。一実施形態では、第1および第2のgRNAを用いて、2つのCas9ヌクレアーゼを標的化してフランキングさせ、例えば、第1のgRNAを用いて、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、HLA-DRB3／4／5、もしくはHLA-DQB1などの対立遺伝子変異体配列のコード配列内の1位置の上流を標的化すると共に、第2のgRNAを用いてその下流を標的化する。

【0432】

一実施形態では、例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1、

H L A - D R B 3 / 4 / 5、もしくはH L A - D Q B 1などの対立遺伝子変異体配列のゲノム配列を欠失させるために、二重標的化を用いて、1つの二本鎖切断と1ペアの一本鎖切断を生成する。一実施形態では、第1、第2および第3のg R N Aを用いて、1つのC a s 9ヌクレアーゼと2つのC a s 9ニッカーゼを標的化してフランキングさせ、例えば、C a s 9ヌクレアーゼと一緒に使用されることになる第1のg R N Aを用いて、例えば、H L A - A、H L A - B、H L A - C、H L A - D R B 1、H L A - D R B 3 / 4 / 5、もしくはH L A - D Q B 1などの対立遺伝子変異体配列のコード配列内の1位置の上流または下流いずれかを標的化すると共に、C a s 9ニッカーゼペアと一緒に使用されることになる第2および第3のg R N Aを用いて、例えば、H L A - A、H L A - B、H L A - C、H L A - D R B 1、H L A - D R B 3 / 4 / 5、もしくはH L A - D Q B 1などの対立遺伝子変異体配列のコード配列内の上記位置の反対側を標的化する。

10

【0433】

一実施形態では、突然変異を含むゲノム配列を欠失させるために、4つのg R N A（例えば、2ペア）を用いて、4つのC a s 9ニッカーゼを標的化して4つの一本鎖切断を生成する場合、g R N Aの第1ペアおよび第2ペアを用いて、4つのC a s 9ニッカーゼを標的化してフランキングさせ、例えば、g R N Aの第1ペアを用いて、例えば、H L A - A、H L A - B、H L A - C、H L A - D R B 1、H L A - D R B 3 / 4 / 5、もしくはH L A - D Q B 1などの対立遺伝子変異体配列のコード配列内の1位置の上流を標的化すると共に、g R N Aの第2ペアを用いて、例えば、H L A - A、H L A - B、H L A - C、H L A - D R B 1、H L A - D R B 3 / 4 / 5、もしくはH L A - D Q B 1などの対立遺伝子変異体配列のコード配列内の下流を標的化する。

20

【0434】

単一g R N Aヌクレアーゼ切断および二重g R N A対形成「ニッカーゼ」ストラテジーの双方で、g R N Aが同定された。g R N Aを選択する基準、およびそれに対してg R N Aが使用され得るストラテジーの判定はいくつかの考察に基づく：
g R N A対は、DNA上で、P A M上が外側を向き、D 1 0 A C a s 9ニッカーゼによる切断が、5'オーバーハングをもたらすような配向であるべきである。

【0435】

二重ニッカーゼ対による切断が、妥当な出現頻度で全介在配列の欠失をもたらすという仮説。しかし、それはまた、g R N Aの1つのみの部位にインデル変異を頻繁にもたらすことになる。候補ペア構成要素は、1つのg R N Aの部位にインデル変異を引き起こす場合と比較して、全配列をいかに効率的に除去するかについて試験され得る。

30

【0436】

本明細書で考察される標的化ドメインは、本明細書に記載されるg R N Aに組み込むことができる。

【0437】

III. C a s 9分子

多様な生物種のC a s 9分子が、本明細書に記載される方法および組成物で使用され得る。S. ピオゲネス (S. p y o g e n e s) およびS. アウレウス (S. a u r e u s) C a s 9分子が、本明細書の開示の多くの対象である一方で、本明細書で列挙されるその他の生物種からの、それに由来する、またはそのC a s 9タンパク質をベースとする、C a s 9分子もまた使用され得る。これらは、例えば、アシドボラクス・アベナエ (A c i d o v o r a x a v e n a e)、アクチノバチルス・プルロニューモニアエ (A c t i n o b a c i l l u s p l e u r o p n e u m o n i a e)、アクチノバチルス・サクシノゲネス (A c t i n o b a c i l l u s s u c c i n o g e n e s)、アクチノバチルス・スイス (A c t i n o b a c i l l u s s u i s)、アクチノミセス属 (A c t i n o m y c e s) 種、アリシクリフィルス・デニトリフィカンズ (c y c l i p h i l u s d e n i t r i f i c a n s)、アミノモナス・パウシボランズ (A m i n o m o n a s p a u c i v o r a n s)、バチルス・セレウス (B a c i l l u s c e r e u s)、バチルス・スミシイ (B a c i l l u s s m i t h i i)、バチルス・チュ

40

50

ーリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides*) 種、ブラストピレルラ・マリナ (*Blastopirella marina*)、ブラディリゾビウム属 (*Bradyrhizobium*) 種、ブレビバチルス・ラテロスポラス (*Brevibacillus laterosporus*)、カンピロバクター・コリ (*Campylobacter coli*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、カンピロバクター・ラリ (*Campylobacter lari*)、カンジダツス・プニセイスピリルム (*Candidatus Puniceispirillum*)、クロストリジウム・セルロリチカム (*Clostridium cellulolyticum*)、クロストリジウム・パーフリングENS (*Clostridium perfringens*)、コリネバクテリウム・アクコレNS (*Corynebacterium accolens*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheria*)、コリネバクテリウム・マトルコチイ (*Corynebacterium matruchotii*)、ディノロセオバクター・シバエ (*Dinoroseobacter shibae*)、ユウバクテリウム・ドリクム (*Eubacterium dolichum*)、ガンマプロテオバクテリア綱 (*gamma proteobacterium*)、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)、ヘモフィルス・パラインフルエンザエ (*Haemophilus parainfluenzae*)、ヘモフィルス・スプトラム (*Haemophilus sputorum*)、ヘリコバクター・カナデNS (*Helicobacter canadensis*)、ヘリコバクター・シナエディ (*Helicobacter cinaedi*)、ヘリコバクター・ムステラエ (*Helicobacter mustelae*)、イリオバクター・ポリトロパス (*Ilyobacter polytropus*)、キングラ・キングア (*Kingella kingae*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*Lactobacillus crispatus*)、リステリア・イバノビイ (*Listeria ivanovii*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、リステリア科 (*Listeriaceae*) 細菌、メチロシスチス科 (*Methylocystis*) 種、メチロシナス・トリコスפורリウム (*Methylosinus trichosporium*)、モビルンカス・ムリエリス (*Mobiluncus mulieris*)、ナイセリア・バシリフォルミス (*Neisseria bacilliformis*)、ナイセリア・シネレア (*Neisseria cinerea*)、ナイセリア・フラベツセス (*Neisseria flavescens*)、ナイセリア・ラクタミカ (*Neisseria lactamica*)、ナイセリア属 (*Neisseria*) 種、ナイセリア・ワズワーシイ (*Neisseria wadsworthii*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*) 種、パルビバクラム・ラバメンチボランス (*Parvibaculum lavamentivorans*)、パストツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)、ファスコラクトバクテリウム・スクシナテュテNS (*Phascolarctobacterium succinatutens*)、ラルストニア・シジジイ (*Ralstonia syzygii*)、ロドシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*)、ロドブラム属 (*Rhodovulum*) 種、シモンシエラ・ムエレリ (*Simonsiella muelleri*)、スフィンゴモナス属 (*Sphingomonas*) 種、スポロラクトバチルス・ビネア (*Sporolactobacillus vineae*)、スタフィロコッカス・ルグドウネNS (*Staphylococcus lugdunensis*)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) 種、サブドリグラヌルム属 (*Subdoligranulum*) 種、チストレラ・モビリス (*Tistrella mobilis*)、トレポネーマ属 (*Treponema*) 種、またはベルミネフロバクター・エイセニア (*Verminephrobacter eiseniae*) からの Cas 9 分子を含む。

10

20

30

40

50

【0438】

Cas9ドメイン

2つの異なる天然細菌Cas9分子について、結晶構造が決定されている。非結合状態の*S. pyogenes* Cas9の結晶構造が、Jinek et al., Science, 2014 Mar 14; 343 (6176): 1247997に記載されている。単一のgRNAを有する複合体における*S. pyogenes* Cas9の結晶構造は、Jiang et al.; Science. 2015 Jun 26; 348 (6242): 1477-81に開示されている。単一のgRNAとの複合体としての*S. pyogenes* Cas9の結晶構造（例えば、crRNAとtracrRNAの合成融合物）とその標的DNAは、Nishimasu et al., Cell, 2014 Feb 27; 156 (5): 935-49; Anders et al., Nature. 2014 Sep 25; 513 (7519): 569-73に記載されている。単一のガイドRNA (sgRNA) との複合体としての*S. aureus* Cas9の結晶構造とその二本鎖DNA標的は、Nishimasu et al., Cell, 2015 Aug 27; 162 (5): 1113-26に開示されている。

10

【0439】

天然Cas9分子は、認識 (REC) ロープおよびヌクレアーゼ (NUC) ロープの2つのロープを含んでなり；その各々が、本明細書に記載されるドメインをさらに含む。Cas9ドメインは、Jinek et al., Science, 2014 Mar 14; 343 (6176): 1247997; Jiang et al.; Science. 2015 Jun 26; 348 (6242): 1477-81; Nishimasu et al., Cell, 2014 Feb 27; 156 (5): 935-49; Anders et al., Nature. 2014 Sep 25; 513 (7519): 569-73; Nishimasu et al., Cell, 2015 Aug 27; 162 (5): 1113-26に記載されている。本開示全体を通じて使用されるドメイン命名法および各ドメインに包含されるアミノ酸残基の番号付与は、以前記載されている通りである (Nishimasu et al., Cell, 2014 Feb 27; 156 (5): 935-49)。アミノ酸残基の番号付与は、*S. pyogenes* に由来するCas9を参照する。

20

30

【0440】

RECロープは、アルギニンに富む架橋らせん (BH)、REC1ドメイン、およびREC2ドメインを含む。RECロープは、その他の既知のタンパク質と構造的類似性を有せず、それがCas9特異的機能ドメインであることが示唆される。BHドメインは、長いαらせんおよびアルギニンに富む領域であり、*S. pyogenes* Cas9配列のアミノ酸60~93を含む。REC1ドメインは、例えば、gRNAまたはatracrRNAなどの反復：抗反復二本鎖の認識に重要であり、したがって標的配列を認識することでCas9活性に重要である。REC1ドメインは、*S. pyogenes* Cas9配列のアミノ酸94~179および308~717に、2つのREC1モチーフを含む。これらの2つのREC1ドメインは、直鎖一次構造内ではREC2ドメインによって隔てられるが、三次構造に構築されてREC1ドメインを形成する。REC2ドメインまたはその部分はまた、反復：抗反復二本鎖の認識における役割を有してもよい。REC2ドメインは、*S. pyogenes* Cas9配列のアミノ酸180~307を含む。

40

【0441】

NUCロープは、RuvCドメイン、HNHドメイン、およびPAM相互作用 (PI) ドメインを含む。RuvCドメインは、レトロウイルスインテグラーゼスーパーファミリー構成要素との構造類似性を有して、例えば、標的核酸分子の非相補鎖などの一本鎖を切断する。RuvCドメインは、それぞれ*S. pyogenes* Cas9配列のアミノ酸1~59、718~769、および909~1098にある、3つの分

50

割 RuvCモチーフ (RuvCI、RuvCII、および RuvCIII、当該技術分野で一般に RuvCIDメイン、または N末端 RuvCDメイン、RuvCEIDメイン、および RuvCEIIDメインと称されることが多い) から構築される。REC1ドメインと同様に、3つの RuvCモチーフは、一次構造内ではその他のドメインによって直線的に隔離されるが、三次構造内では、3つの RuvCモチーフに構築されて RuvCDメインが形成する。HNHドメインは、HNHエンドヌクレアーゼとの構造的類似性を有し、例えば、標的核酸分子の相補鎖などの一本鎖を切断する。HNHドメインは、RuvCII~IIIMotifの間にあり、S. pyogenes (S. pyogenes) Cas9配列のアミノ酸 775~908を含む。PIDメインは、標的核酸分子の PAMと相互作用し、S. pyogenes (S. pyogenes) Cas9. 配列のアミノ酸 1099~1368を含む。

10

【0442】

RuvC様ドメインおよび HNH様ドメイン

特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、HNH様ドメインおよびRuvC様ドメインを含み、これらの特定の実施形態では、切断活性は、RuvC様ドメインおよびHNH様ドメインに依存する。Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、RuvC様ドメインおよびHNH様ドメインのドメインの1つまたは複数を含み得る。特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、例えば、以下に記載されるRuvC様ドメイン、および／または例えば、以下に記載されるHNH様ドメインなどのHNH様ドメインなどのRuvC様ドメインを含む。

20

【0443】

RuvC様ドメイン

特定の実施形態では、RuvC様ドメインは、例えば、標的核酸分子の非相補鎖などの一本鎖を切断する。Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、2つ以上のRuvC様ドメイン (例えば、1、2、3つ以上のRuvC様ドメイン) を含み得る。特定の実施形態では、RuvC様ドメインは、少なくとも5、6、7、8アミノ酸長であるが、20、19、18、17、16または15アミノ酸長以下である。特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、例えば、約15アミノ酸長などの約10~20個のアミノ酸のN末端RuvC様ドメインを含む。

【0444】

N末端RuvC様ドメイン

いくつかの天然Cas9分子は、2つ以上のRuvC様ドメインを含み、切断はN末端RuvC様ドメインに依存する。したがって、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、N末端RuvC様ドメインを含み得る。代表的なN末端RuvC様ドメインは、以下に記載される。

【0445】

特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、式I、
D-X₁-G-X₂-X₃-X₄-X₅-G-X₆-X₇-X₈-X₉ (配列番号20)
のアミノ酸配列を含む、N末端RuvC様ドメインを含み、
式中、

40

X₁は、I、V、M、L、およびTから選択され (例えば、I、V、およびLから選択され) ；

X₂は、T、I、V、S、N、Y、E、およびLから選択され (例えば、T、V、およびIから選択され) ；

X₃は、N、S、G、A、D、T、R、M、およびF (例えば、AまたはN) から選択され；

X₄は、S、Y、N、およびF (例えば、S) から選択され；

X₅は、V、I、L、C、T、およびFから選択され (例えば、V、I、およびLから選択され) ；

X₆は、W、F、V、Y、S、およびL (例えば、W) から選択され；

50

X₇は、A、S、C、V、およびGから選択され（例えば、AおよびSから選択され）；
X₈は、V、I、L、A、M、およびHから選択され（例えば、V、I、M、およびLから選択され）；

X₉は、任意のアミノ酸から選択され、または不在である（例えば、T、V、I、L、Δ、F、S、A、Y、M、およびRから選択され、または、例えば、T、V、I、L、およびΔから選択される）。

【0446】

特定の実施形態では、N末端RuvC様ドメインは、配列番号20の配列と、1つ程度であるが、2、3、4、または5つ以下の残基が異なる。

【0447】

特定の実施形態では、N末端RuvC様ドメインは、切断能力がある。他の実施形態では、N末端RuvC様ドメインは、切断能力がない。

【0448】

特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、式II：
D-X₁-G-X₂-X₃-S-X₅-G-X₆-X₇-X₈-X₉（配列番号21）
のアミノ酸配列を含む、N末端RuvC様ドメインを含み、

式中、

X₁は、I、V、M、LおよびTから選択され（例えば、I、V、およびLから選択され）；

X₂は、T、I、V、S、N、Y、E、およびLから選択され（例えば、T、V、およびIから選択され）；

X₃は、N、S、G、A、D、T、R、M、およびF（例えば、AまたはN）から選択され；

X₅は、V、I、L、C、T、およびFから選択され（例えば、V、IおよびLから選択され）；

X₆は、W、F、V、Y、SおよびL（例えば、W）から選択され；

X₇は、A、S、C、VおよびGから選択され（例えば、AおよびSから選択され）；

X₈は、V、I、L、A、MおよびHから選択され（例えば、V、I、MおよびLから選択され）；

X₉は、任意のアミノ酸から選択されるか、または非存在である（例えば、T、V、I、L、Δ、F、S、A、Y、MおよびRから選択されるか、または例えば、T、V、I、L、およびΔから選択される）。

【0449】

特定の実施形態では、N末端RuvC様ドメインは、配列番号21の配列と、1つ程度であるが、2、3、4、または5つ以下の残基が異なる。

【0450】

特定の実施形態では、N末端RuvC様ドメインは、式III：
D-I-G-X₂-X₃-S-V-G-W-A-X₈-X₉（配列番号22）
のアミノ酸配列を含み、

式中、

X₂は、T、I、V、S、N、Y、E、およびLから選択され（例えば、T、V、およびIから選択され）；

X₃は、N、S、G、A、D、T、R、M、およびF（例えば、AまたはN）から選択され；

X₈は、V、I、L、A、MおよびHから選択され（例えば、V、I、MおよびLから選択され）；

X₉は、任意のアミノ酸から選択されるか、または非存在であり（例えば、T、V、I、L、Δ、F、S、A、Y、MおよびRから選択されるか、または例えば、T、V、I、L、およびΔから選択される）。

【0451】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、N末端RuvC様ドメインは、配列番号22の配列と、1つ程度であるが、2、3、4、または5つ以下の残基が異なる。

【0452】

特定の実施形態では、N末端RuvC様ドメインは、式IV：
D-I-G-T-N-S-V-G-W-A-V-X（配列番号23）
のアミノ酸配列を含んでなり、
式中、

Xは、非極性アルキルアミノ酸またはヒドロキシルアミノ酸であり、例えば、Xは、V、I、L、およびTから選択される（例えば、Cas9分子は、図2A～2Gに示されるN末端RuvC様ドメインを含み得る（Yとして示される））。

10

【0453】

特定の実施形態では、N末端RuvC様ドメインは、配列番号23の配列と、1つ程度であるが、2、3、4、または5つ以下の残基が異なる。

【0454】

特定の実施形態では、N末端RuvC様ドメインは、例えば、図3A～3Bにおいて、本明細書で開示されるN末端RuvC様ドメインの配列と、1つ程度であるが、2、3、4、または5つ以下の残基が異なる。一実施形態では、図3A～3Bで同定された高度に保存された残基のうち、1つ、2つ、3つまたは全部が存在する。

【0455】

特定の実施形態では、N末端RuvC様ドメインは、例えば、図4A～4Bにおいて、本明細書で開示されるN末端RuvC様ドメインの配列と、1つ程度であるが、2、3、4、または5つ以下の残基が異なる。一実施形態では、図4A～4Bで同定された高度に保存された残基のうち、1つ、2つ、3つまたは全部が存在する。

20

【0456】

追加的RuvC様ドメイン

N末端RuvC様ドメインに加えて、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、1つまたは複数の追加的RuvC様ドメインを含み得る。特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、2つの追加的RuvC様ドメインを含み得る。好ましくは、追加的RuvC様ドメインは、例えば、15未満のアミノ酸長、例えば、5～10アミノ酸長、例えば、8アミノ酸長などの少なくとも5アミノ酸長である。

30

【0457】

追加的RuvC様ドメインは、式V：
I-X₁-X₂-E-X₃-A-R-E（配列番号15）
のアミノ酸配列を含んでよく、
式中、

X₁は、VまたはHであり；

X₂は、I、LまたはV（例えば、IまたはV）であり；

X₃は、MまたはTである。

【0458】

特定の実施形態では、追加的RuvC様ドメインは、式VI：
I-V-X₂-E-M-A-R-E（配列番号16）
のアミノ酸配列を含んでなり、
式中、

40

X₂は、I、LまたはV（例えば、IまたはV）である（例えば、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、図2A～2Gに示される、追加的RuvC様ドメインを含み得る（Bとして示される））。

【0459】

追加的RuvC様ドメインは、式VII：
H-H-A-X₁-D-A-X₂-X₃（配列番号17）
のアミノ酸配列を含んでもよく、

50

式中、

X_1 は、H または L であり；

X_2 は、R または V であり；

X_3 は、E または V である。

【0460】

特定の実施形態では、追加的 R u v C 様ドメインは、

H-H-A-H-D-A-Y-L（配列番号18）

のアミノ酸配列を含む。

【0461】

特定の実施形態では、追加的 R u v C 様ドメインは、配列番号15～18の配列と、1つ程度であるが、2、3、4、または5つ以下の残基が異なる。

10

【0462】

いくつかの実施形態では、N末端 R u v C 様ドメインの側面に位置する配列は、式 V I I I : K-X₁'-Y-X₂'-X₃'-X₄'-Z-T-D-X₉'-Y（配列番号：19）のアミノ酸配列を有し、

式中、

X_1' は、K および P から選択され、

X_2' は V、L、I、および F（例えば V、I、および L）から選択され；

X_3' は、G、A、および S（例えば、G）から選択され；

X_4' は L、I、V、および F（例えば、L）から選択され；

20

X_9' は、D、E、N、および Q から選択され；

Z は、例えば、上述されるような、例えば、5～12 アミノ酸を有する N末端 R u v C 様ドメインである。

【0463】

H N H 様ドメイン

一実施形態では、H N H 様ドメインは、例えば、二本鎖核酸分子の相補鎖などの一本鎖相補的ドメインを切断する。特定の実施形態では、H N H 様ドメインは、少なくとも15、20、または25 アミノ酸長であるが、40、35 または30 以下のアミノ酸長であり、例えば、20～35 アミノ酸長、例えば、25～30 アミノ酸長である。代表的な H N H 様ドメインは、以下に記載される。

30

【0464】

一実施形態では、C a s 9 分子または C a s 9 ポリペプチドは、式 I X : X₁-X₂-X₃-H-X₄-X₅-P-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-N-X₁₆-X₁₇-X₁₈-X₁₉-X₂₀-X₂₁-X₂₂-X₂₃-N（配列番号25）のアミノ酸配列を有する H N H 様ドメインを含み、

式中、

X_1 は、D、E、Q、および N（例えば、D および E）から選択され；

X_2 は、L、I、R、Q、V、M、および K から選択され；

X_3 は、D および E から選択され；

X_4 は、I、V、T、A、および L（例えば、A、I、および V）から選択され；

40

X_5 は、V、Y、I、L、F、および W（例えば、V、I、および L）から選択され；

X_6 は、Q、H、R、K、Y、I、L、F、および W から選択され；

X_7 は、S、A、D、T、および K（例えば、S および A）から選択され；

X_8 は、F、L、V、K、Y、M、I、R、A、E、D、および Q（例えば、F）から選択され；

X_9 は、L、R、T、I、V、S、C、Y、K、F、および G から選択され；

X_{10} は、K、Q、Y、T、F、L、W、M、A、E、G、および S から選択され；

X_{11} は、D、S、N、R、L、および T（例えば、D）から選択され；

X_{12} は、D、N、および S から選択され；

X_{13} は、S、A、T、G、および R（例えば、S）から選択され；

50

X₁₄は、I、L、F、S、R、Y、Q、W、D、K、およびH（例えば、I、L、およびF）から選択され；

X₁₅は、D、S、I、N、E、A、H、F、L、Q、M、G、Y、およびVから選択され；

X₁₆は、K、L、R、M、T、およびF（例えば、L、R、およびK）から選択され；

X₁₇は、V、L、I、A、およびTから選択され；

X₁₈は、L、I、V、およびA（例えば、LおよびI）から選択され；

X₁₉は、T、V、C、E、S、およびA（例えば、TおよびV）から選択され；

X₂₀は、R、F、T、W、E、L、N、C、K、V、S、Q、I、Y、H、およびAから選択され；

X₂₁は、S、P、R、K、N、A、H、Q、G、およびLから選択され；

X₂₂は、D、G、T、N、S、K、A、I、E、L、Q、R、およびYから選択され；

X₂₃は、K、V、A、E、Y、I、C、L、S、T、G、K、M、D、およびFから選択される。

【0465】

特定の実施形態では、HNH様ドメインは、配列番号25の配列と、少なくとも1つであるが、2、3、4、または5つ以下の残基が異なる。

【0466】

特定の実施形態では、HNH様ドメインは、切断能力がある。特定の実施形態では、HNH様ドメインは、切断能力がない。

【0467】

特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、式X、
X₁-X₂-X₃-H-X₄-X₅-P-X₆-S-X₈-X₉-X₁₀-D-D-S-X₁₄-X₁₅-N-K-V-L-X₁₉-X₂₀-X₂₁-X₂₂-X₂₃-N（配列番号26）

のアミノ酸配列を含むHNH様ドメインを含み、
式中、

X₁は、DおよびEから選択され；

X₂は、L、I、R、Q、V、M、およびKから選択され；

X₃は、DおよびEから選択され；

X₄は、I、V、T、A、およびL（例えば、A、I、およびV）から選択され；

X₅は、V、Y、I、L、F、およびW（例えば、V、I、およびL）から選択され；

X₆は、Q、H、R、K、Y、I、L、F、およびWから選択され；

X₈は、F、L、V、K、Y、M、I、R、A、E、D、およびQ（例えば、F）から選択され；

X₉は、L、R、T、I、V、S、C、Y、K、F、およびGから選択され；

X₁₀は、K、Q、Y、T、F、L、W、M、A、E、G、およびSから選択され；

X₁₄は、I、L、F、S、R、Y、Q、W、D、K、およびH（例えば、I、L、およびF）から選択され；

X₁₅は、D、S、I、N、E、A、H、F、L、Q、M、G、Y、およびVから選択され；

X₁₉は、T、V、C、E、S、およびA（例えば、TおよびV）から選択され；

X₂₀は、R、F、T、W、E、L、N、C、K、V、S、Q、I、Y、H、およびAから選択され；

X₂₁は、S、P、R、K、N、A、H、Q、G、およびLから選択され；

X₂₂は、D、G、T、N、S、K、A、I、E、L、Q、R、およびYから選択され；

X₂₃は、K、V、A、E、Y、I、C、L、S、T、G、K、M、D、およびFから選択される。

【0468】

特定の実施形態では、HNH様ドメインは、配列番号26の配列と、1、2、3、4、

または5つの残基が異なる。

【0469】

特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、式XI、
 $X_1-V-X_3-H-I-V-P-X_6-S-X_8-X_9-X_{10}-D-D-S-X_{14}-X_{15}-N-K-V-L-T-X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-N$ （配列番号27）のアミノ酸配列を含むHNH様ドメインを含む。

式中、

X_1 は、DおよびEから選択され；

X_3 は、DおよびEから選択され；

X_6 は、Q、H、R、K、Y、I、L、およびWから選択され；

X_8 は、F、L、V、K、Y、M、I、R、A、E、D、およびQ（例えば、F）から選択され；

X_9 は、L、R、T、I、V、S、C、Y、K、F、およびGから選択され；

X_{10} は、K、Q、Y、T、F、L、W、M、A、E、G、およびSから選択され；

X_{14} は、I、L、F、S、R、Y、Q、W、D、K、およびH（例えば、I、L、およびF）から選択され；

X_{15} は、D、S、I、N、E、A、H、F、L、Q、M、G、Y、およびVから選択され；

X_{20} は、R、F、T、W、E、L、N、C、K、V、S、Q、I、Y、H、およびAから選択され；

X_{21} は、S、P、R、K、N、A、H、Q、G、およびLから選択され；

X_{22} は、D、G、T、N、S、K、A、I、E、L、Q、R、およびYから選択され；

X_{23} は、K、V、A、E、Y、I、C、L、S、T、G、K、M、D、およびFから選択される。

【0470】

特定の実施形態では、HNH様ドメインは、配列番号27の配列と、1、2、3、4、または5つの残基が異なる。

【0471】

特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、式XII、
 $D-X_2-D-H-I-X_5-P-Q-X_7-F-X_9-X_{10}-D-X_{12}-S-I-D-N-X_{16}-V-L-X_{19}-X_{20}-S-X_{22}-X_{23}-N$ （配列番号28）
 のアミノ酸配列を有するHNH様ドメインを含む。

式中、

X_2 は、IおよびVから選択され；

X_5 は、IおよびVから選択され；

X_7 は、AおよびSから選択され；

X_9 は、IおよびLから選択され；

X_{10} は、KおよびTから選択され；

X_{12} は、DおよびNから選択され；

X_{16} は、R、K、およびLから選択され； X_{19} は、TおよびVから選択され；

X_{20} は、SおよびRから選択され；

X_{22} は、K、D、およびAから選択され；

X_{23} は、E、K、G、およびNから選択される（例えば、e a Cas9分子またはe a Cas9ポリペプチドは、本明細書に記載されるようなHNH様ドメインを含み得る）。

【0472】

一実施形態では、HNH様ドメインは、配列番号28の配列と、1つ程度であるが、2、3、4、または5つ以下の残基が異なる。

【0473】

特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、式XIII、
 $L-Y-Y-L-Q-N-G-X_1'-D-M-Y-X_2'-X_3'-X_4'-X_5'-L-D-$

$I - X_6' - X_7' - L - S - X_8' - Y - Z - N - R - X_9' - K - X_{10}' - D - X_{11}' - V - P$ (配列番号 24)

のアミノ酸配列を含む。

式中、

X_1' は、K および R から選択され；

X_2' は、V および T から選択され；

X_3' は、G および D から選択され；

X_4' は、E、Q、および D から選択され；

X_5' は、E および D から選択され；

X_6' は、D、N、および H から選択され；

X_7' は、Y、R、および N から選択され；

X_8' は、Q、D、および N から選択され； X_9' は、G および E から選択され；

X_{10}' は、S および G から選択され；

X_{11}' は、D および N から選択され；および

Z は、例えば、上述されるような HNH 様ドメインである。

【0474】

特定の実施形態では、Cas9 分子または Cas9 ポリペプチドは、配列番号 24 の配列と、1 つ程度であるが、2、3、4、または 5 つ以下の残基が異なる、アミノ酸配列を含む。

【0475】

特定の実施形態では、HNH 様ドメインは、例えば、図 5A～5C などの本明細書で開示される HNH 様ドメインの配列と、1 つ程度であるが、2、3、4、または 5 つ以下の残基が異なる。特定の実施形態では、図 5A～5C で同定された高度に保存された残基のうち、片方または双方が存在する。

【0476】

特定の実施形態では、HNH 様ドメインは、例えば、図 6A～6B などの本明細書で開示される HNH 様ドメインの配列と、1 つ程度であるが、2、3、4、または 5 つ以下の残基が異なる。一実施形態では、図 6A～6B で同定された高度に保存された残基のうち、1 つ、2 つ、または 3 つ全てが存在する。

【0477】

分断 Cas9 分子および遺伝子編集システム

いくつかの実施形態では、国際公開第 15/089427 号および同第 14/018423 号パンフレット（その各々の全内容を参照により本明細書に明示的に組み込む）にさらに詳述されているように、Cas9 融合分子は、分断 Cas9 分子を含む。分断 Cas9 分子については以下に簡単にまとめる。

【0478】

一態様では、非天然または改変された誘導性 CRISPR 酵素、例えば、Cas9 酵素が本明細書に開示され、これは、以下：誘導性二量体の第 1 半分に結合された第 1 の CRISPR 酵素融合構築物と、誘導性二量体の第 2 半分に結合された第 2 の CRISPR 酵素融合構築物を含んでなり、ここで、第 1 の CRISPR 酵素融合構築物は、1 つまたは複数の核局在化シグナルに作動可能に連結され、第 2 の CRISPR 酵素融合構築物は、1 つまたは複数の核輸シグナルに作動可能に連結されており、ここで、誘導物質エネルギー源との接触によって、誘導性二量体の第 1 および第 2 半分が一緒にされ、誘導性二量体の第 1 および第 2 半分が一緒にされることによって、第 1 および第 2 CRISPR 酵素融合構築物が機能性遺伝子編集システムを構成することが可能になる。

【0479】

別の態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、誘導性二量体は、誘導性ヘテロ二量体であるか、またはこれを含むか、またはこれからほぼ構成されるか、またはこれから構成される。一態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、誘導性ヘテロ二量体の第 1 半分または第 1 部分または第 1 断片は、FKBP、任意選択的に FKBP12 であるか

10

20

30

40

50

、またはこれを含むか、またはこれから構成されるか、またはこれからほぼ構成される。一態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、誘導性ヘテロ二量体の第2半分または第2部分または第2断片は、FRBであるか、またはこれを含むか、またはこれから構成されるか、またはこれからほぼ構成される。一態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、第1CRISPR酵素融合構築物の配列は、N'末端Cas9部分-FRB-NESであるか、またはこれを含むか、またはこれから構成されるか、またはこれからほぼ構成される。別の態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、第1CRISPR酵素融合構築物の配列は、NES-N'末端Cas9部分-FRB-NESであるか、またはこれを含むか、またはこれから構成されるか、またはこれからほぼ構成される。一態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、第2CRISPR酵素融合構築物の配列は、C末端Cas9部分-FKBP-NLSであるか、またはこれを含むか、またはこれからほぼ構成されるか、またはこれから構成される。別の態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、第2CRISPR酵素融合構築物の配列は、NLS-C末端Cas9部分-FKBP-NLSであるか、またはこれを含むか、またはこれから構成されるか、またはこれからほぼ構成される。一態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、Cas9部分を誘導性二量体の半分または部分または断片から隔てるリンカーがあってもよい。一態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、誘導物質エネルギー源は、ラパマイシンであるか、またはこれを含むか、またはこれからほぼ構成されるか、またはこれから構成される。一態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、誘導性二量体は、誘導性ホモ二量体である。一態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、CRISPR酵素は、Cas9、例えば、SpCas9またはSaCas9である。遺伝子編集システムの一態様では、Cas9は、SpCas9に従って、またはSpCas9を参照にして、以下の分断点のいずれか1つで2つの部分に分断される：202A/203S間の分断位置；255F/256D間の分断位置；310E/311I間の分断位置；534R/535間の分断位置；572E/573C間の分断位置；713S/714G間の分断位置；1003L/104E間の分断位置；1G54G/1Q55E間の分断位置；1114N/1115S間の分断位置；1152K/1153S間の分断位置；1245K/1246G間の分断位置；または1098および1099間の分断位置。一態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、1つまたは複数の機能性ドメインが、Cas9酵素の一方または両部分、例えば、転写アクチベーター、転写またはfokIヌクレアーゼなどのヌクレアーゼを任意選択的に含む機能性ドメインと結合している。一態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、機能性遺伝子編集システムは、標的配列と結合し、酵素は、不活性型Cas9（deadCas9）であり、これは、任意選択的に、少なくとも1つの突然変異を含まないCRISPR酵素と比較して、少なくとも97%もしくは100%低減したヌクレアーゼ活性（または3%以下、有利には0%）のヌクレアーゼ活性を有する。一態様では、誘導性遺伝子編集システムにおいて、不活性型Cas9（CRISPR酵素）は、2つ以上の突然変異を含み、ここで、SpCas9タンパク質によって2つ以上のDIG、E762、H840、N854、N863、もしくはD986またはいずれかの対応するオーソログまたはSaCas9タンパク質に従うN580が突然変異しているか、あるいは、CRISPR酵素は、少なくとも1つの突然変異を含み、例えば、ここで、少なくともH840が突然変異している。本開示はさらに、本明細書に開示されるような誘導性遺伝子編集システムをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0480】

さらに、本明細書において、誘導性二量体の第1半分または部分または断片と結合され、1つまたは複数の核局在化シグナルと作動可能に連結された第1CRISPR酵素融合構築物の送達のためのベクターも開示される。一態様では、本明細書には、誘導性二量体の第2半分または部分または断片と結合され、1つまたは複数の核輸出シグナルと作動可能に連結された第2CRISPR酵素融合構築物の送達のためのベクターも開示される。

【0481】

Cas9機能

特定の実施形態では、C a s 9 分子またはC a s 9 ポリペプチドは、標的核酸分子を切断する能力がある。典型的に野性型C a s 9 分子は、標的核酸分子の双方の鎖を切断する。C a s 9 分子およびC a s 9 ポリペプチドを遺伝子操作して、ヌクレアーゼ切断（またはその他の性質）を改変して、例えば、ニッカーゼである、または標的核酸を切断する能力を欠く、C a s 9 分子またはC a s 9 ポリペプチドを提供し得る。標的核酸分子を切断する能力があるC a s 9 分子またはC a s 9 ポリペプチドは、本明細書でe a C a s 9 分子（酵素的に活性なC a s 9）またはe a C a s 9 ポリペプチドと称される。

【0482】

特定の実施形態では、e a C a s 9 分子またはe a C a s 9 ポリペプチドは、以下の機能の1つまたは複数を含む：

ニッカーゼ活性、すなわち、例えば、核酸分子の非相補鎖または相補鎖などの一本鎖を切断する能力；

特定の実施形態では2つのニッカーゼ活性の存在である、二本鎖ヌクレアーゼ活性、すなわち、二本鎖核酸の双方の鎖を切断して、二本鎖切断を生成する能力；

エンドヌクレアーゼ活性；

エキソヌクレアーゼ活性；および

ヘリカーゼ活性、すなわち、二本鎖核酸のらせん構造を巻き戻す能力。

【0483】

特定の実施形態では、酵素的に活性またはe a C a s 9 分子またはe a C a s 9 ポリペプチドは、双方のDNA鎖を切断して、二本鎖切断をもたらす。特定の実施形態では、e a C a s 9 分子またはe a C a s 9 ポリペプチドは、例えば、それに対してgRNAがハイブリダイズする鎖、またはgRNAとハイブリダイズする鎖と相補的な鎖などの1本の鎖のみを切断する。一実施形態では、e a C a s 9 分子またはe a C a s 9 ポリペプチドは、HNHドメインに関連する切断活性を含む。一実施形態では、e a C a s 9 分子またはe a C a s 9 ポリペプチドは、RuvCドメインに関連する切断活性を含む。一実施形態では、e a C a s 9 分子またはe a C a s 9 ポリペプチドは、HNHドメインに関連する切断活性およびRuvCドメインに関連する切断活性を含む。一実施形態では、e a C a s 9 分子またはe a C a s 9 ポリペプチドは、活性のまたは切断能力があるHNHドメインと、不活性のまたは切断能力がないRuvCドメインとを含む一実施形態では、e a C a s 9 分子またはe a C a s 9 ポリペプチドは、不活性のまたは切断能力がないHNHドメインと、活性のまたは切断能力があるRuvCドメインとを含む。

【0484】

標的化およびPAM

C a s 9 分子またはC a s 9 ポリペプチドはgRNA分子と相互作用することができ、gRNA分子と協調して、標的ドメイン、および特定の実施形態では、aPAM配列を含む部位に局在する。

【0485】

特定の実施形態では、標的核酸と相互作用して切断するe a C a s 9 分子またはe a C a s 9 ポリペプチドの能力は、PAM配列依存性である。PAM配列は、標的核酸中の配列である。一実施形態では、標的核酸の切断は、PAM配列の上流で起こる。異なる細菌種からのe a C a s 9 分子は、異なる配列モチーフ（例えば、PAM配列）を認識し得る。一実施形態では、S. ピオゲネス（S. pyogenes）のe a C a s 9 分子は、配列モチーフNGG、NAG、NGAを認識して、その配列から、例えば、3～5bpなどの1～10bp上流で、標的核酸配列の切断を誘導する（例えば、Mali 2013を参照されたい）。一実施形態では、S. サーモフィルス（S. thermophilus）のe a C a s 9 分子は、配列モチーフNGGN（配列番号199）および／またはNNAAGAAW（W=AまたはT）（配列番号200）を認識して、これらの配列の例えば、3～5bpなどの1～10bp上流で、標的核酸配列の切断を誘導する（例えば、Horvath 2010；Deveau 2008を参照されたい）。一実施形態では、S. ミュータンス（S. mutans）のe a C a s 9 分子は、配列モチーフNGGおよび／ま

10

20

30

40

50

たはN A A R (R=AまたはG) (配列番号201))を認識して、この配列の例えば、3~5bpなど1~10bp上流で、標的核酸配列切断を誘導する(例えば、Dev ea u 2008を参照されたい)。一実施形態では、S. アウレウス (S. aureus) のC a s 9分子は、配列モチーフN N G R R (R=AまたはG) (配列番号202)を認識して、例えば、その配列から3~5bp上流などの1~10bpの標的核酸配列の切断を誘導する。一実施形態では、S. アウレウス (S. aureus) のC a s 9分子は、配列モチーフN N G R R N (R=AまたはG) (配列番号203)を認識して、例えば、その配列から3~5bpなどの1~10bp上流の標的核酸配列の切断を誘導する。一実施形態では、S. アウレウス (S. aureus) のC a s 9分子は、配列モチーフN N G R R T (R=AまたはG) (配列番号204)を認識して、例えば、その配列から3~5bpなどの1~10bp上流の標的核酸配列の切断を誘導する。一実施形態では、S. アウレウス (S. aureus) のe a C a s 9分子は、配列モチーフN N G R R V (R=AまたはG) (配列番号205)を認識して、例えば、その配列から3~5bp上流などの1~10bp上流の標的核酸配列の切断を誘導する。C a s 9分子が、P A M配列を認識する能力は、例えば、上記 (J i n e k 2012) に記載される形質転換アッセイを使用して判定され得る。前述の実施形態では、Nは、例えば、A、G、CまたはTのいずれかの任意のヌクレオチド残基であり得る。

【0486】

本明細書で考察されるように、C a s 9分子は遺伝子操作されて、C a s 9分子のP A M特異性が改変され得る。

【0487】

代表的な天然起源C a s 9分子は、上述されている(例えば、C h y l i n s k i 2013を参照されたい)。このようなC a s 9分子としては、クラスター1細菌科、クラスター2細菌科、クラスター3細菌科、クラスター4細菌科、クラスター5細菌科、クラスター6細菌科、クラスター7細菌科、クラスター8細菌科、クラスター9細菌科、クラスター10細菌科、クラスター11細菌科、クラスター12細菌科、クラスター13細菌科、クラスター14細菌科、クラスター15細菌科、クラスター16細菌科、クラスター17細菌科、クラスター18細菌科、クラスター19細菌科、クラスター20細菌科、クラスター21細菌科、クラスター22細菌科、クラスター23細菌科、クラスター24細菌科、クラスター25細菌科、クラスター26細菌科、クラスター27細菌科、クラスター28細菌科、クラスター29細菌科、クラスター30細菌科、クラスター31細菌科、クラスター32細菌科、クラスター33細菌科、クラスター34細菌科、クラスター35細菌科、クラスター36細菌科、クラスター37細菌科、クラスター38細菌科、クラスター39細菌科、クラスター40細菌科、クラスター41細菌科、クラスター42細菌科、クラスター43細菌科、クラスター44細菌科、クラスター45細菌科、クラスター46細菌科、クラスター47細菌科、クラスター48細菌科、クラスター49細菌科、クラスター50細菌科、クラスター51細菌科、クラスター52細菌科、クラスター53細菌科、クラスター54細菌科、クラスター55細菌科、クラスター56細菌科、クラスター57細菌科、クラスター58細菌科、クラスター59細菌科、クラスター60細菌科、クラスター61細菌科、クラスター62細菌科、クラスター63細菌科、クラスター64細菌科、クラスター65細菌科、クラスター66細菌科、クラスター67細菌科、クラスター68細菌科、クラスター69細菌科、クラスター70細菌科、クラスター71細菌科、クラスター72細菌科、クラスター73細菌科、クラスター74細菌科、クラスター75細菌科、クラスター76細菌科、クラスター77細菌科、またはクラスター78細菌科のC a s 9分子が挙げられる。

【0488】

代表的な天然起源C a s 9分子としては、クラスター1細菌科のC a s 9分子が挙げられる。例としては、S. アウレウス (S. aureus)、S. ピオゲネス (S. pyogenes) (例えば、S F 370、M G A S 10270、M G A S 10750、M G A S 2096、M G A S 315、M G A S 5005、M G A S 6180、M G A S 9429

10

20

30

40

50

、NZ131およびSSI-1株)、S.サーモフィルス(*S. thermophilus*) (例えば、LMD-9株)、S.シュードポルシヌス(*S. pseudoporcinus*) (例えば、SPIN 20026株)、S.ミュータンス(*S. mutans*) (例えば、UA159、NN2025株)、S.マカカエ(*S. macacae*) (例えば、NCTC11558株)、S.ガロリチカス(*S. gallolyticus*) (例えば、UCN34、ATCCBAA-2069株)、S.エクイヌス(*S. equine*) (例えば、ATCC9812、MGCS124株)、S.ディスガラクタエ(*S. dysdactiae*) (例えば、GGS124株)、S.ボビス(*S. bovis*) (例えば、ATCC700338株)、S.アンギノサス(*S. anginosus*) (例えば、F0211株)、S.アガラクタエ(*S. agalactiae*) (例えば、NEM316、A909株)、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*) (例えば、F6854株)、リステリア・イノキュア(*Listeria innocua*) (L.イノキュア(*L. innocua*))、例えば、Clip11262株)、エンテロコッカス・イタリクス(*Enterococcus italicus*) (例えば、DSM 15952株)、またはエンテロコッカス・フェシウム(*Enterococcus faecium*) (例えば、1, 231, 408株)のCas9分子が挙げられる。

【0489】

特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、配列番号1、2、4~6、または12と、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の相同性を有し；比較すると、2、5、10、15、20、30、または40%以下のアミノ酸残基が異なり；

少なくとも1、2、5、10または20個のアミノ酸であるが、100、80、70、60、50、40または30個以下のアミノ酸が異なり；または本明細書に記載される任意のCas9分子配列、または例えば、本明細書で列挙され、または生物種に由来するCas9分子などの天然Cas9分子配列と同一であるアミノ酸配列を含む(例えば、配列番号1~4あるいはChylinski 2013に記載される)。一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、以下の機能の1つまたは複数を含む：ニッカーゼ活性；二本鎖切断活性(例えば、エンドヌクレアーゼおよび／またはエキソヌクレアーゼ活性)；ヘリカーゼ活性；またはgRNA分子と一緒に、標的核酸に局在する能力。

【0490】

特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、図2A~2Gのコンセンサス配列のアミノ酸配列のいずれかを含んでなり、その中では、「*」は、S.ピオゲネス(*S. pyogenes*)、S.サーモフィルス(*S. thermophilus*)、S.ミュータンス(*S. mutans*)、またはL.イノキュア(*L. innocua*)のCas9分子のアミノ酸配列中の対応する位置に存在する任意のアミノ酸を示し、「-」は、非存在を示す。一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、図2A~2Gで開示されるコンセンサス配列の配列と、少なくとも1個、但し2、3、4、5、6、7、8、9、または10個以下のアミノ酸残基が異なる。特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、配列番号2の配列と、少なくとも1個、但し2、3、4、5、6、7、8、9、または10個以下のアミノ酸残基が異なる。

【0491】

いくつかのCas9分子の配列の比較は、特定領域が保存されていることを示唆する。これらは、次のように同定される。

領域1(残基1~180、または領域1の場合は残基120~180)

領域2(残基360~480)；

領域3（残基660～720）；
領域4（残基817～900）；および
領域5（残基900～960）。

【0492】

一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、領域1～6を含み、十分な追加的Cas9分子配列と共に、例えば、本明細書に記載される少なくとも1つの活性を有するCas9分子などの生物活性分子を提供する。一実施形態では、領域1～6のそれぞれは、独立して、例えば、図2A～2Gからの配列などの本明細書に記載されるCas9分子またはCas9ポリペプチドの対応する残基と、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の相同性を有する。

10

【0493】

一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、領域1と称されるアミノ酸配列を含んでなり：

S. ピオゲネス (S. pyogenes) のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸1～180と、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の相同性を有し（番号付与は図2のモチーフ配列に準拠する；図2A～2Gの4つのCas9配列中の残基の52%が保存されている）；

S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. サーモフィルス (S. thermophilus)、S. ミュータンス (S. mutans)、またはリステリア・イノキュア (Listeria innocua) のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸1～180と、少なくとも1、2、5、10または20個のアミノ酸、但し90、80、70、60、50、40または30個以下のアミノ酸が異なり；または

20

S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. サーモフィルス (S. thermophilus)、S. ミュータンス (S. mutans)、またはL. イノキュア (L. innocua) のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸1～180と同一である。

【0494】

一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、領域1'と称されるアミノ酸配列を含んでなり、この領域は、

S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. サーモフィルス (S. thermophilus)、S. ミュータンス (S. mutans)、またはL. イノキュア (L. innocua) のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸120～180と55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の相同性を有し（図2の4つのCas9配列中の残基の55%が保存されている）；

30

S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. サーモフィルス (S. thermophilus)、S. ミュータンス (S. mutans)、または、L. イノキュア (L. innocua) のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸120～180と、少なくとも1、2、または5個のアミノ酸、但し35、30、25、20または10個以下のアミノ酸が異なり；あるいは、

40

S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. サーモフィルス (S. thermophilus)、S. ミュータンス (S. mutans)、またはL. イノキュア (L. innocua) のCas9のアミノ酸配列の120～180と同一である。

【0495】

一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、領域2と称されるアミノ酸配列を含んでなり、この領域は、

S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. サーモフィルス (S. thermophilus)、S. ミュータンス (S. mutans)、またはL. イノキュア (L. innocua) のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸360～480と50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、

50

98%または99%の相同性を有し（図2の4つのCas9配列中の残基の52%が保存されている）；

S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）、S.サーモフィルス（*S. thermophilus*）、S.ミュータンス（*S. mutans*）、または、L.イノキュア（*L. innocua*）のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸360～480と、少なくとも1、2、または5個のアミノ酸、但し35、30、25、20または10個以下のアミノ酸が異なり；あるいは、

S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）、S.サーモフィルス（*S. thermophilus*）、S.ミュータンス（*S. mutans*）、またはL.イノキュア（*L. innocua*）のCas9のアミノ酸配列の360～480と同一である。

10

【0496】

一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、領域3と称されるアミノ酸配列を含んでなり、この領域は、

S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）、S.サーモフィルス（*S. thermophilus*）、S.ミュータンス（*S. mutans*）またはL.イノキュア（*L. innocua*）のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸660～720と55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の相同性を有し（図2の4つのCas9配列中の残基の56%が保存されている）；

20

S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）、S.サーモフィルス（*S. thermophilus*）、S.ミュータンス（*S. mutans*）または、L.イノキュア（*L. innocua*）のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸660～720と、少なくとも1、2、または5個のアミノ酸、但し35、30、25、20または10個以下のアミノ酸が異なり；あるいは、

S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）、S.サーモフィルス（*S. thermophilus*）、S.ミュータンス（*S. mutans*）またはL.イノキュア（*L. innocua*）のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸660～720と同一である。

【0497】

一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、領域4と称されるアミノ酸配列を含んでなり、この領域は、

30

S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）、S.サーモフィルス（*S. thermophilus*）、S.ミュータンス（*S. mutans*）、またはL.イノキュア（*L. innocua*）のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸817～900と50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の相同性を有し（図2A～2Gの4つのCas9配列中の残基の55%が保存されている）；

S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）、S.サーモフィルス（*S. thermophilus*）、S.ミュータンス（*S. mutans*）、または、L.イノキュア（*L. innocua*）のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸817～900と、少なくとも1、2、または5個のアミノ酸、但し35、30、25、20または10個以下のアミノ酸が異なり；あるいは、

40

S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）、S.サーモフィルス（*S. thermophilus*）、S.ミュータンス（*S. mutans*）、またはL.イノキュア（*L. innocua*）のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸817～900と同一である。

【0498】

一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、領域5と称されるアミノ酸配列を含んでなり、この領域は、

S.ピオゲネス（*S. pyogenes*）、S.サーモフィルス（*S. thermophilus*）、S.ミュータンス（*S. mutans*）、またはL.イノキュア（*L. innocua*）のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸900～960と50%、55%、

50

60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の相同性を有し（図2A～2Gの4つのCas9配列中の残基の60%が保存されている）；

S. ピオゲネス（*S. pyogenes*）、S. サーマフィルス（*S. thermophilus*）、S. ミュータンス（*S. mutans*）、またはL. イノキュア（*L. innocua*）のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸900～960と、少なくとも1、2、または5個のアミノ酸、但し35、30、25、20または10個以下のアミノ酸が異なり；あるいは、

S. ピオゲネス（*S. pyogenes*）、S. サーマフィルス（*S. thermophilus*）、S. ミュータンス（*S. mutans*）、またはL. イノキュア（*L. innocua*）のCas9のアミノ酸配列のアミノ酸900～960と同一である。

【0499】

遺伝子操作または改変Cas9分子およびCas9ポリペプチド

本明細書に記載されるCas9分子およびCas9ポリペプチドは、ヌクレアーゼ活性（例えば、エンドヌクレアーゼおよび／またはエキソヌクレアーゼ活性）；ヘリカーゼ活性；gRNA分子と機能的に結合する能力；および核酸上の部位を標的化する（またはそれに局在する）能力（例えば、PAM認識および特異性）をはじめとするいくつかの性質のいずれかを有し得る。特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、これらの性質の全てまたは一部を含み得る。典型的な実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、gRNA分子と相互作用し、gRNA分子と協調して核酸中の部位に局在する能力を有する。例えば、PAM特異性、切断活性、またはヘリカーゼ活性などのその他機能は、Cas9分子およびCas9ポリペプチド中でより幅広く変動し得る。

【0500】

Cas9分子は、遺伝子操作Cas9分子および遺伝子操作Cas9ポリペプチドを含む（遺伝子操作は、この文脈の用法では、単にCas9分子またはCas9ポリペプチドが参照配列と異なることを意味して、プロセスまたは起源制限を暗示しない）。遺伝子操作Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、例えば、（天然またはその他の標準Cas9分子と比較して）改変されたヌクレアーゼ活性、または改変されヘリカーゼ活性などの改変された酵素的性質を含み得る。本明細書で考察されるように、遺伝子操作Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、ニッカーゼ活性（二本鎖ヌクレアーゼ活性との対比で）を有し得る。一実施形態では、遺伝子操作Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、例えば、1つまたは複数のまたは任意のCas9活性に対する顕著な影響なしに、例えば、そのサイズを減少させるアミノ酸配列の欠失などの、そのサイズを変化させる改変を有し得る。一実施形態では、遺伝子操作Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、PAM認識に影響を及ぼす改変を含み得る。例えば、遺伝子操作Cas9分子は、内在性野生型PIDメインによって認識されるもの以外のPAM配列を認識するように改変され得る。一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、天然Cas9分子と、配列が異なり得るが、1つまたは複数のCas9機能に顕著な改変を有しない。

【0501】

所望の性質があるCas9分子またはCas9ポリペプチドは、例えば、天然Cas9分子またはCas9ポリペプチドなどの親ポリペプチドの改変などの、いくつかの様式で生成されて、所望の性質を有する改変Cas9分子またはCas9ポリペプチドが提供され得る。例えば、例えば、天然または遺伝子操作Cas9分子などの親Cas9分子との1つまたは複数の変異または差異が導入され得る。このような変異および差異としては、置換（例えば、非必須アミノ酸の保存的置換または置換）；挿入；または欠失が挙げられる。一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、例えば、親Cas9分子などの標準と比較して、少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20、30、40または50の変異であるが、200、100、または80未満の変異などの1つまたは複数の変異または差異を含み得る。

【0502】

特定の実施形態では、単数の変異または複数の変異は、例えば、本明細書に記載される Cas 9 活性などの Cas 9 活性に対する実質的效果を有しない。他の実施形態では、単数の変異または複数の変異は、例えば、本明細書に記載される Cas 9 活性などの Cas 9 活性に対する実質的效果を有する。

【0503】

非切断および修飾切断 Cas 9

一実施形態では、Cas 9 分子または Cas 9 ポリペプチドは、天然 Cas 9 分子と異なる切断特性を含み、例えば、それは最も近い相同性を有する天然 Cas 9 分子と異なる。例えば、Cas 9 分子または Cas 9 ポリペプチドは、S. ピオゲネス (S. pyogenes) Cas 9 分子などの天然 Cas 9 分子と、例えば、次のように異なり得る：例えば、天然 Cas 9 分子（例えば、S. ピオゲネス (S. pyogenes) の Cas 9 分子）と比較して二本鎖核酸切断（エンドヌクレアーゼおよび／またはエキソヌクレアーゼ活性）の低下または増大を調節するその能力；例えば、天然 Cas 9 分子（例えば、S. ピオゲネス (S. pyogenes) の Cas 9 分子）と比較して、核酸分子の非相補鎖または核酸分子の相補鎖などの核酸の一本鎖切断（ニックアーゼ活性）の低下または増大を調節するその能力；または例えば、二本鎖または一本鎖核酸分子などの核酸分子を切断する能力が、除去され得る。

【0504】

特定の実施形態では、eaCas 9 分子または eaCas 9 ポリペプチドは、以下の機能の1つまたは複数を含む：N末端 RuvC 様ドメインに関連する切断活性；HNH 様ドメインに関連する切断活性；HNH 様ドメインに関連する切断活性およびN末端 RuvC 様ドメインに関連する切断活性。

【0505】

特定の実施形態では、eaCas 9 分子または eaCas 9 ポリペプチドは、活性のまたは切断能力がある HNH 様ドメイン（例えば、本明細書に記載される HNH 様ドメイン、例えば、配列番号 24～28）と、不活性なまたは切断能力がない N末端 RuvC 様ドメインとを含む。代表的な不活性の、または切断能力がない N末端 RuvC 様ドメインは、N末端 RuvC 様ドメインにアスパラギン酸の突然変異を有してよく、例えば、図 2A～2G に開示されるコンセンサス配列の 9 位のアスパラギン酸、または配列番号 2 の 10 位のアスパラギン酸が、例えば、アラニンで置換され得る。一実施形態では、eaCas 9 分子または eaCas 9 ポリペプチドは、N末端 RuvC 様ドメインにおいて野性型とは異なり、標的核酸を切断しないか、または例えば、本明細書に記載されるアッセイによる測定で、参照 Cas 9 分子の切断活性の 20、10、5、1 もしくは、1%未満などの有意に低い効率で切断する。参照 Cas 9 分子は、例えば、S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. アウレリウス (S. aureus)、または S. サーモフィルス (S. thermophilus) の Cas 9 分子のような、天然 Cas 9 分子などの天然未修飾 Cas 9 分子であってよい。一実施形態では、参照 Cas 9 分子は、最も近い配列同一性または相同性を有する天然 Cas 9 分子である。

【0506】

一実施形態では、eaCas 9 分子または eaCas 9 ポリペプチドは、不活性の、または切断能力がない HNH 様ドメインと、活性の、または切断能力がある N末端 RuvC 様ドメインとを含んでなる（例えば、配列番号 15～23 などの本明細書に記載される RuvC 様ドメイン）。代表的な不活性の、または切断能力がない HNH 様ドメインは、以下の1つまたは複数の突然変異を有し得る：例えば、図 2A～2G に開示されるコンセンサス配列の位置 856 に示されるヒスチジンなどの HNH 様ドメインのヒスチジンが、例えば、アラニンで置換されてよく；例えば、図 2A～2G に開示されるコンセンサス配列の位置 870 および／または図 2A～2G に開示されるコンセンサス配列の位置 879 に示されるアスパラギンなどの HNH 様ドメイン内の1つまたは複数のアスパラギンが、例えば、アラニンで置換され得る。一実施形態では、eaCas 9 は、HNH 様ドメインにお

いて野性型とは異なり、標的核酸を切断しないか、または例えば、本明細書に記載されるアッセイによる測定で、参照 Cas 9 分子の切断活性の 20、10、5、1 もしくは 0.1% 未満などの有意に低い効率で切断する。参照 Cas 9 分子は、例えば、S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. アウレウス (S. aureus)、または S. サーモフィルス (S. thermophilus) の Cas 9 分子のような、天然 Cas 9 分子などの天然未修飾 Cas 9 分子であり得る。一実施形態では、参照 Cas 9 分子は、最も近い配列同一性または相同性を有する天然 Cas 9 分子である。

【0507】

特定の実施形態では、代表的な Cas 9 機能は、PAM 特異性、切断活性、およびヘリカーゼ活性の 9 つまたは複数を含む。変異は、例えば、例えば、N 末端 RuvC ドメインなどの 1 つまたは複数の RuvC ドメイン；HNH ドメイン；RuvC ドメインおよび HNH ドメイン外の領域に存在し得る。一実施形態では、変異は、RuvC ドメインに存在する。一実施形態では、変異 (s) は、HNH ドメインに存在する。一実施形態では、変異は、RuvC ドメインおよび HNH ドメインの双方に存在する。

【0508】

S. ピオゲネス (S. pyogenes) Cas 9 配列に関して RuvC ドメインまたは HNH ドメインに起きてもよい代表的変異としては、D10A、E762A、H840A、N854A、N863A および／または D986A が挙げられる。S. アウレウス (S. aureus) Cas 9 配列に関して RuvC ドメインに実施され得る例示的な突然変異として、N580A がある (例えば、配列番号 11 を参照)。

【0509】

例えば、置換などの特定の配列が、標的化活性、切断活性などの 1 つまたは複数の活性に影響を及ぼしてもよいかどうかは、例えば、変異が保存的であるかどうかを評価することで、評価または予測され得る。一実施形態では、Cas 9 分子の文脈で使用されるような「非必須」アミノ酸残基は、Cas 9 活性 (例えば、切断活性) を無効化することなく、またはより好ましくは、実質的に改変することなく、例えば、eaCas 9 分子のような天然起源 Cas 9 分子などの Cas 9 分子の野生型配列から改変され得る残基である一方で、「必須」アミノ酸残基の変更に、実質的な活性 (例えば、切断活性) 喪失をもたらす。

【0510】

一実施形態では、Cas 9 分子は、天然 Cas 9 分子と異なる切断特性を含み、例えば、それは最も近い相同性を有する天然 Cas 9 分子と異なる。例えば、Cas 9 分子は、例えば、S. アウレウス (S. aureus) または S. ピオゲネス (S. pyogenes) の Cas 9 分子などの天然 Cas 9 分子と、次のように異なり得る：例えば、天然 Cas 9 分子 (例えば、S. アウレウス (S. aureus) または S. ピオゲネス (S. pyogenes) の Cas 9 分子) と比較して二本鎖切断の切断 (cleavage of a double stranded break) (エンドヌクレアーゼおよび／またはエキソヌクレアーゼ活性) の低下または増大を調節するその能力；例えば、天然 Cas 9 分子 (例えば、S. アウレウス (S. aureus) または S. ピオゲネス (S. pyogenes) の Cas 9 分子) と比較して、核酸分子の非相補鎖または核酸分子の相補鎖などの核酸の一本鎖切断 (ニックアーゼ活性) の低下または増大を調節するその能力；または例えば、二本鎖または一本鎖核酸分子などの核酸分子を切断する能力が、除去され得る。特定の実施形態では、ニックアーゼは、配列番号 10 (D10A) または配列番号 11 (N580A) の配列を含む S. アウレウス (S. aureus) Cas 9 由来のニックアーゼである (Friedland 2015)。

【0511】

一実施形態では、改変 Cas 9 分子は、以下の機能の 1 つまたは複数を含む、eaCas 9 分子である：RuvC ドメインに関連する切断活性；HNH ドメインに関連する切断活性；HNH ドメインに関連する切断活性および RuvC ドメインに関連する切断活性。

【0512】

特定の実施形態では、改変 Cas 9 分子または Cas 9 ポリペプチドは、以下：

図 2 A～2 G に開示されるコンセンサス配列の固定配列に対応する配列が、図 2 A～2 G で開示されるコンセンサス配列中の固定残基と 1、2、3、4、5、10、15、または 20% 以下異なり；

図 2 A～2 G に開示されるコンセンサス配列中の「*」によって同定される残基に対応する配列が、例えば、S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. サーモフィルス (S. thermophilus)、S. ミュータンス (S. mutans)、または、L. イノキュア (L. innocua) Cas 9 分子などの天然 Cas 9 分子の対応する配列からの「*」残基と、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、または 40% 以下異なる、配列を含んでなる。

10

【0513】

一実施形態では、改変 Cas 9 分子または Cas 9 ポリペプチドは、図 2 A～2 G に開示される S. ピオゲネス (S. pyogenes) Cas 9 のアミノ酸配列を含んでなる、ea Cas 9 分子または ea Cas 9 ポリペプチドであり、1つまたは複数の残基（例えば、2、3、5、10、15、20、30、50、70、80、90、100、もしくは 200 アミノ酸残基）に、図 2 A～2 G に開示されるコンセンサス配列中の「*」によって表示される、S. ピオゲネス (S. pyogenes) の配列とは異なる、1つまたは複数のアミノ酸（例えば、置換）を有する。

【0514】

一実施形態では、改変 Cas 9 分子または Cas 9 ポリペプチドは、図 2 A～2 G に開示される S. サーモフィルス (S. thermophilus) Cas 9 のアミノ酸配列を含んでなる、ea Cas 9 分子または ea Cas 9 ポリペプチドであり、1つまたは複数の残基（例えば、2、3、5、10、15、20、30、50、70、80、90、100、もしくは 200 アミノ酸残基）に、図 2 A～2 G に開示されるコンセンサス配列中の「*」によって表示される、S. サーモフィルス (S. thermophilus) の配列とは異なる、1つまたは複数のアミノ酸（例えば、置換）を有する。

20

【0515】

一実施形態では、改変 Cas 9 分子または Cas 9 ポリペプチドは、図 2 A～2 G に開示される S. ミュータンス (S. mutans) Cas 9 のアミノ酸配列を含んでなる、ea Cas 9 分子または ea Cas 9 ポリペプチドであり、1つまたは複数の残基（例えば、2、3、5、10、15、20、30、50、70、80、90、100、もしくは 200 アミノ酸残基）に、図 2 A～2 G に開示されるコンセンサス配列中の「*」によって表示される、S. ミュータンス (S. mutans) の配列とは異なる、1つまたは複数のアミノ酸（例えば、置換）を有する。

30

【0516】

一実施形態では、改変 Cas 9 分子または Cas 9 ポリペプチドは、図 2 A～2 G に開示される L. イノキュア (L. innocua) Cas 9 のアミノ酸配列を含んでなる、ea Cas 9 分子または ea Cas 9 ポリペプチドであり、1つまたは複数の残基（例えば、2、3、5、10、15、20、30、50、70、80、90、100、もしくは 200 アミノ酸残基）に、図 2 A～2 G に開示されるコンセンサス配列中の「*」によって表示される、L. イノキュア (L. innocua) の配列とは異なる、1つまたは複数のアミノ酸（例えば、置換）を有する。

40

【0517】

特定の実施形態では、改変された Cas 9 分子または Cas 9 ポリペプチド、例えば、ea Cas 9 分子または ea Cas 9 ポリペプチドは、例えば、2つ以上の異なる Cas 9 分子、例えば、2つ以上の異なる種の天然起源の Cas 9 分子の融合物であってよい。例えば、1つの生物種の天然 Cas 9 分子断片が、第2の生物種の Cas 9 分子断片に融合され得る。一例として、N末端 RuvC 様ドメインを含む S. ピオゲネス (S. pyogenes) Cas 9 分子の断片が、HNH 様ドメインを含む S. ピオゲネス (S. pyogenes) 以外の生物種（例えば、S. サーモフィルス (S. thermophilus)

50

us) の Cas9 分子の断片に融合され得る。

【0518】

PAM認識が改変されたまたはPAM認識がないCas9

天然起源Cas9分子は、例えば、S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. サーマフィルス (S. thermophilus)、S. ミュータンス (S. mutans)、およびS. アウレウス (S. aureus) について、上に記載されるPAM認識配列などの特定のPAM配列を認識し得る。

【0519】

特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、天然Cas9分子と同一PAM特異性を有する。その他の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、それに最も近い配列相同性を有する天然Cas9分子に関連しないPAM特異性、または天然Cas9分子に関連しないPAM特異性を有する。例えば、天然Cas9分子は改変され得て、例えば、PAM認識が改変されて、例えば、Cas9分子またはCas9ポリペプチドが認識するPAM配列が改変されて、オフターゲット部位が減少されおおよび／または特異性が改善され；またはPAM認識要求が排除される。特定の実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドは、例えば、PAM認識配列の長さを増加する、おおよび／またはCas9特異性を高レベルの同一性（例えば、gRNAとPAM配列同士の98%、99%もしくは100%のマッチ）まで向上させる、例えば、オフターゲット部位を減少させる、おおよび／または特異性を増大するように、改変することができる。特定の実施形態では、PAM認識配列の長さは、少なくとも4、5、6、7、8、9、10または15アミノ酸長である。一実施形態では、Cas9特異性は、gRNAとPAM配列同士の少なくとも90%、95%、97%、98%、99%以上の相同性を要求する。異なるPAM配列を認識し、かつ／またはオフターゲット活性が低下したCas9分子またはCas9ポリペプチドは、指向性進化を使用して作製することができる。Cas9分子の指向性進化のために使用することができる例示的な方法およびシステムは、記載されている（例えば、Esvelt 2011を参照のこと）。候補Cas9分子は、例えば、以下に記載される方法によって評価され得る。

【0520】

サイズ最適化Cas9

本明細書に記載される遺伝子操作Cas9分子および遺伝子操作Cas9ポリペプチドとしては、例えば、本質的に天然立体配座、Cas9ヌクレアーゼ活性、おおよび／または標的核酸分子認識などの所望のCas9特性をなおも保つ一方で、分子サイズを低下させる欠失を含む、Cas9分子またはCas9ポリペプチドが挙げられる。本明細書で提供されるのは、1つまたは複数の欠失おおよび任意選択的に1つまたは複数のリンカーを含む、Cas9分子またはCas9ポリペプチドであり、リンカーは、欠失側面に位置するアミノ酸残基間に配置される。参照Cas9分子中の適切な欠失を同定する方法、欠失おおよびリンカーがあるCas9分子を生成する方法、おおよびこのようなCas9分子を使用する方法は、この文献を検討することにより当業者には明らかであろう。

【0521】

例えば、S. アウレウス (S. aureus) またはS. ピオゲネス (S. pyogenes) Cas9分子などの欠失があるCas9分子は、例えば、低下したアミノ酸数を有するなど、対応する天然Cas9分子よりも小型である。Cas9分子のより小さなサイズは、送達方法の融通性を増大させ、その結果ゲノム編集の有用性を高める。Cas9分子は、結果として生じる本明細書に記載されるCas9分子の活性に実質的に影響を及ぼさず、またはそれを低下させない、1つまたは複数の欠失を含み得る。本明細書に記載される欠失を含むCas9分子中で維持される機能としては、ニッカーゼ活性、すなわち、例えば、核酸分子の非相補鎖または相補鎖などの一本鎖を切断する能力；ニッカーゼ活性、すなわち、例えば、核酸分子の非相補鎖または相補鎖などの一本鎖を切断する能力；二本鎖ヌクレアーゼ活性、すなわち、二本鎖核酸の双方の鎖を切断して、二本鎖切断を生成する能力で、一実施形態では、2つのニッカーゼ活性の存在である；エン

ドヌクレアーゼ活性；エキソヌクレアーゼ活性；ヘリカーゼ活性、すなわち、二本鎖核酸のらせん構造を巻き戻す能力；ならびに例えば、標的核酸またはgRNAなどの核酸分子の認識活性。

【0522】

本明細書に記載されるCas9分子の活性は、本明細書または当該技術分野で記載される、活性アッセイを使用して評価することができる。

【0523】

欠失に適する領域を同定する

Cas9分子の欠失に適する領域は、多様な方法によって同定され得る。様々な細菌種に由来する天然オルソログCas9分子は、S.ピオゲネス(S. pyogenes) Cas9の結晶構造にモデル化され得て(Nishimasu 2014)、タンパク質の三次元立体構造と比較して、選択されたCas9オルソログ全域の保存レベルが調べられる。例えば、標的核酸分子および／またはgRNAとの境界面などのCas9活性に関与する領域から空間的に遠位に位置する、低保存または非保存領域は、Cas9活性に実質的に影響を及ぼさずまたは低下させない欠失の候補領域またはドメインに相当する。

【0524】

Cas9分子をコードする核酸

例えば、eacCas9分子またはeacCas9ポリペプチドなどのCas9分子またはCas9ポリペプチドをコードする核酸は、本明細書で提供される。代表的Cas9分子をコードする核酸またはCas9ポリペプチドは、上述されている(例えば、Cong 2013; Wang 2013; Mali 2013; Jinek 2012を参照されたい)。

【0525】

一実施形態では、Cas9分子またはCas9ポリペプチドをコードする核酸は、合成核酸配列であり得る。例えば、合成核酸分子は、例えば、本明細書に記載されるようにして、化学修飾され得る。一実施形態では、Cas9 mRNAは、(例えば、以下の全ての1つまたは複数の特性を有する：それは、キャッピングされ、ポリアデニル化され、5-メチルシチジンおよび／またはプソイドウリジンで置換される。

【0526】

それに加えてまたは代案としては、合成核酸配列は、コドン最適化され得て、例えば、少なくとも1つの一般的でないコドンあまり一般的でないコドンは、一般的コドンによって置換されている。例えば、合成核酸は、例えば、本明細書に記載される哺乳類発現系内での発現のために最適化された、最適化メッセンジャーmRNAの合成を誘導し得る。

【0527】

さらに、または代案としては、aCas9分子またはCas9ポリペプチドをコードする核酸は、核局在化配列(NLS)を含んでもよい。核局在化配列は、当該技術分野で公知である。

【0528】

S.ピオゲネス(S. pyogenes)のCas9分子をコードする例示的なコドン最適化核酸配列は、配列番号3に記載されている。S.ピオゲネス(S. pyogenes) Cas9分子の対応するアミノ酸配列は、配列番号2に記載されている。

【0529】

S.アウレウス(S. aureus)のCas9分子をコードする例示的なコドン最適化核酸配列は、配列番号7～9に記載されている。S.アウレウス(S. aureus) Cas9分子のアミノ酸配列は、配列番号6に記載される。

【0530】

N.メニンジチディス・アウレリウス(N. meningitidis aureus)のCas9分子をコードする例示的なコドン最適化核酸配列は、配列番号13に記載されている。N.メニンジチディス(N. meningitides) Cas9分子の対応するアミノ酸配列は、配列番号12に記載される。

【0531】

上記Cas9配列のいずれかが、C末端でペプチドまたはポリペプチドと融合する場合、停止コドンは除外されるものと理解される。

【0532】

その他のCas分子およびCasポリペプチド

本明細書で開示される方法を実施するために、様々なタイプのCas分子またはCasポリペプチドが使用され得る。いくつかの実施形態では、II型CasシステムのCas分子が使用される。その他の実施形態では、その他のCasシステムのCas分子が使用される。例えば、I型またはIII型Cas分子が使用されてもよい。代表的なCas分子（およびCasシステム）は、上述されている（例えば、Haft 2005およびMakarova 2011を参照されたい）。代表的なCas分子（およびCasシステム）は、表17にもまた示される。

【0533】

【表52】

表 17: Casシステム					
遺伝子名*	システム型または亜型	Haft 2005 ⁸ からの名称	コードされるタンパク質 (PDB登録) ⁹ の構造 ¹⁰	コードされるタンパク質のファミリー(およびスーパーファミリー) ¹¹	代表
<i>cas1</i>	• I 型 • II 型 • III 型	<i>cas1</i>	3GOD, 3LFX および 2YZS	COG1518	SERP2463, SPy1047 および <i>ygbT</i>
<i>cas2</i>	• I 型 • II 型 • III 型	<i>cas2</i>	2IVY, 2I8E および 3EXC	COG1343 および COG3512	SERP2462, SPy1048, SPy1723 (N 末端 ドメイン)および <i>ygbF</i>
<i>cas3'</i>	• I 型 ¹²	<i>cas3</i>	NA	COG1203	APE1232 および <i>ygcB</i>
<i>cas3''</i>	• I-A 亜型 • I-B 亜型	NA	NA	COG2254	APE1231 および BH0336
<i>cas4</i>	• I-A 亜型 • I-B 亜型 • I-C 亜型 • I-D 亜型 • II-B 亜型	<i>cas4</i> および <i>cas1</i>	NA	COG1468	APE1239 および BH0340
<i>cas5</i>	• I-A 亜型 • I-B 亜型 • I-C 亜型 • I-E 亜型	<i>cas5a</i> , <i>cas5d</i> , <i>cas5e</i> , <i>cas5h</i> , <i>cas5p</i> , <i>cas5t</i> および <i>cmx5</i>	3KG4	COG1688 (RAMP)	APE1234, BH0337, <i>devS</i> および <i>ygcI</i>
<i>cas6</i>	• I-A 亜型 • I-B 亜型 • I-D 亜型 • III-A 亜型 • III-B 亜型	<i>cas6</i> および <i>cmx6</i>	3I4H	COG1583 および COG5551 (RAMP)	PF1131 および slr7014

【0534】

10

20

30

40

50

【表 5 3】

表 17: Cas システム					
遺伝子名 [*]	システム型または亜型	Haft 2005 [§] からの名称	コードされるタンパク質 (PDB 登録)の構造 [¶]	コードされるタンパク質のファミリー(およびスーパーファミリー) ^{***}	代表
<i>cas6e</i>	• I-E 亜型	<i>cse3</i>	1WJ9	(RAMP)	<i>ygcH</i>
<i>cas6f</i>	• I-F 亜型	<i>csy4</i>	2XLJ	(RAMP)	<i>y1727</i>
<i>cas7</i>	• I-A 亜型 • I-B 亜型 • I-C 亜型 • I-E 亜型	<i>csa2, csd2, cse4, csh2, csp1</i> および <i>cst2</i>	NA	COG1857 および COG3649 (RAMP)	<i>devR</i> および <i>ygcJ</i>
<i>cas8a1</i>	• I-A 亜型 ^{**}	<i>cmx1, cst1, csx8, csx13</i> および CXXC-CXXC	NA	BH0338 様	LA3191 ^{ss} および PG2018 ^{ss}
<i>cas8a2</i>	• I-A 亜型 ^{**}	<i>csa4</i> および <i>csx9</i>	NA	PH0918	AF0070, AF1873, MJ0385, PF0637, PH0918 および SSO1401
<i>cas8b</i>	• I-B 亜型 ^{**}	<i>csh1</i> および TM1802	NA	BH0338 様	MTH1090 および TM1802
<i>cas8c</i>	• I-C 亜型 ^{**}	<i>csd1</i> および <i>csp2</i>	NA	BH0338 様	BH0338
<i>cas9</i>	• II 型 ^{**}	<i>csn1</i> および <i>csx12</i>	NA	COG3513	FTN_0757 および SPy1046
<i>cas10</i>	• III 型 ^{**}	<i>cmr2, csm1</i> および <i>csx11</i>	NA	COG1353	MTH326, Rv2823c ^{ss} および TM1794 ^{ss}
<i>cas10d</i>	• I-D 亜型 ^{**}	<i>csc3</i>	NA	COG1353	slr7011
<i>csy1</i>	• I-F 亜型 ^{**}	<i>csy1</i>	NA	y1724 様	y1724
<i>csy2</i>	• I-F 亜型	<i>csy2</i>	NA	(RAMP)	y1725

【 0 5 3 5 】

10

20

30

40

50

【表 5 4】

表 17: Cas システム					
遺伝子名 [*]	システム型または亜型	Haft 2005 ⁸ からの名称	コードされるタンパク質 (PDB 登録)の構造 [†]	コードされるタンパク質のファミリー(およびスーパーファミリー) ^{***}	代表
<i>csy3</i>	• I-F 亜型	<i>csy3</i>	NA	(RAMP)	y1726
<i>cse1</i>	• I-E 亜型 ^{**}	<i>cse1</i>	NA	YgcL 様	<i>ygcL</i>
<i>cse2</i>	• I-E 亜型	<i>cse2</i>	2ZCA	YgcK 様	<i>ygcK</i>
<i>csc1</i>	• I-D 亜型	<i>csc1</i>	NA	alr1563 様 (RAMP)	alr1563
<i>csc2</i>	• I-D 亜型	<i>csc1</i> および <i>csc2</i>	NA	COG1337 (RAMP)	slr7012
<i>csa5</i>	• I-A 亜型	<i>csa5</i>	NA	AF1870	AF1870, MJ0380, PF0643 および SSO1398
<i>csn2</i>	• II-A 亜型	<i>csn2</i>	NA	SPy1049 様	SPy1049
<i>csm2</i>	• III-A 亜型 ^{**}	<i>csm2</i>	NA	COG1421	MTH1081 および SERP2460
<i>csm3</i>	• III-A 亜型	<i>csc2</i> および <i>csm3</i>	NA	COG1337 (RAMP)	MTH1080 および SERP2459
<i>csm4</i>	• III-A 亜型	<i>csm4</i>	NA	COG1567 (RAMP)	MTH1079 および SERP2458
<i>csm5</i>	• III-A 亜型	<i>csm5</i>	NA	COG1332 (RAMP)	MTH1078 および SERP2457
<i>csm6</i>	• III-A 亜型	APE2256 および <i>csm6</i>	2WTE	COG1517	APE2256 および SSO1445
<i>cmr1</i>	• III-B 亜型	<i>cmr1</i>	NA	COG1367 (RAMP)	PF1130
<i>cmr3</i>	• III-B 亜型	<i>cmr3</i>	NA	COG1769 (RAMP)	PF1128
<i>cmr4</i>	• III-B 亜型	<i>cmr4</i>	NA	COG1336 (RAMP)	PF1126
<i>cmr5</i>	• III-B 亜型 ^{**}	<i>cmr5</i>	2ZOP および 2OEB	COG3337	MTH324 および PF1125
<i>cmr6</i>	• III-B 亜型	<i>cmr6</i>	NA	COG1604 (RAMP)	PF1124
<i>csb1</i>	• I-U 亜型	GSU0053	NA	(RAMP)	Balac_1306 および GSU0053

【 0 5 3 6 】

10

20

30

40

50

【表 5 5】

表 17: Cas システム					
遺伝子名 [‡]	システム型または亜型	Haft 2005 [§] からの名称	コードされるタンパク質 (PDB 登録) [¶] の構造	コードされるタンパク質のファミリー(およびスーパーファミリー) ^{***}	代表
<i>csb2</i>	• I-U 亜型 ^{§§}	NA	NA	(RAMP)	Balac_1305 および GSU0054
<i>csb3</i>	• I-U 亜型	NA	NA	(RAMP)	Balac_1303 ^{§§}
<i>csx17</i>	• I-U 亜型	NA	NA	NA	Btus_2683
<i>csx14</i>	• I-U 亜型	NA	NA	NA	GSU0052
<i>csx10</i>	• I-U 亜型	<i>csx10</i>	NA	(RAMP)	Caur_2274
<i>csx16</i>	• III-U 亜型	VVA1548	NA	NA	VVA1548
<i>csaX</i>	• III-U 亜型	<i>csaX</i>	NA	NA	SSO1438
<i>csx3</i>	• III-U 亜型	<i>csx3</i>	NA	NA	AF1864
<i>csx1</i>	• III-U 亜型	<i>csa3</i> , <i>csx1</i> , <i>csx2</i> , DXTHG, NE0113 および TIGR02710	1XMX および 2I71	COG1517 および COG4006	MJ1666, NE0113, PF112 および TM1812
<i>csx15</i>	• 不明	NA	NA	TTE2665	TTE2665
<i>csf1</i>	• U 型	<i>csf1</i>	NA	NA	AFE_1038
<i>csf2</i>	• U 型	<i>csf2</i>	NA	(RAMP)	AFE_1039
<i>csf3</i>	• U 型	<i>csf3</i>	NA	(RAMP)	AFE_1040
<i>csf4</i>	• U 型	<i>csf4</i>	NA	NA	AFE_1037

【0 5 3 7】

その他のヌクレアーゼ

本明細書に開示される教示内容を用いて当業者には理解されるように、gRNA 分子を選択し、デザインするための本明細書に記載の方法およびデータベーススキーマは、Cpf1 システム、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) システム、およびジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) システムなどの他のシステムのために使用することもできる。例えば、Cpf1 は、クラス 2 CRISPR-Cas システム (Zetsche et al., 2015, Cell 163, 1-13 を参照) の単一 RNA 誘導エンドヌクレアーゼである。転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) システムは、ザントモナス (Xanthomonas) 種由来の TALE と制限エンドヌクレアーゼ、FokI の融合物である。TALE のアミノ酸反復配列を修飾することにより、当業者は標的 DNA に特異的に結合して、TALE 結合部位の間に切断を導入するように、TALEN システムをカスタマイズすることができる。同様に、ジンクフィンガーヌクレアーゼシステムは、DNA 切断ドメインとして FokI ヌクレアーゼを使用し、特定のジンクフィンガーが、異なるヌクレオチドトリプレットを認識して、FokI ヌクレアーゼを二量体化することにより、2 つの異なるジンクフィンガー結合部位の間に二本鎖切断の導入を達成する。

【0 5 3 8】

IV. 候補分子の機能解析

候補 Cas9 分子、候補 gRNA 分子、候補 Cas9 分子 / gRNA 分子複合体は、当

該技術分野で周知の方法によって、または本明細書に記載されるように評価することができる。例えば、Cas9分子のエンドヌクレアーゼ活性を評価する代表的な方法は、例えば、Jinek et al., SCIENCE 2012, 337 (6096) : 816-821に記載されている。

【0539】

結合および切断アッセイ：Cas9分子のエンドヌクレアーゼ活性を試験する

Cas9分子/gRNA分子複合体が、標的核酸を結合および切断する能力は、プラスミド切断アッセイで評価され得る。このアッセイでは、合成または生体外転写gRNA分子が、95℃に加熱して緩慢に室温に冷却することで、反応に先だってプレアニールされる。天然または制限消化直線化プラスミドDNA (300ng (約8nM)) が、10mMのMgCl₂存在下または不在下において、Cas9プラスミド切断緩衝液 (20mMのHEPES pH7.5、150mMのKCl、0.5mMのDTT、0.1mMのEDTA) 中の精製Cas9タンパク質分子 (50~500nM) およびgRNA (50~500nM、1:1) と共に、37℃で60分間インキュベートされる。反応は、5×DNAローディングバッファー (30%グリセロール、1.2%SDS、250mMのEDTA) によって停止され、0.8または1%アガロースゲル電気泳動法によって分離され、臭化エチジウム染色によって視覚化される。得られた分解産物は、Cas9分子が、双方のDNA鎖を切断するか、または二本鎖の1本のみを切断するかどうかを示す。例えば、直鎖DNA生成物は、双方のDNA鎖の切断を示す。ニックの入った開環状生成物は、二本鎖の1本のみが切断されていることを示す。

【0540】

代案としては、Cas9分子/gRNA分子複合体が、標的核酸に結合して切断する能力は、オリゴヌクレオチドDNA切断アッセイで評価され得る。このアッセイでは、DNAオリゴヌクレオチド (10pmol) が、1×T4ポリヌクレオチドキナーゼ反応緩衝液中の5単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼおよび約3~6pmol (約20~40mCi) の[γ-32P]-ATPと、50μLの反応物中で37℃で30分間インキュベートすることで、放射性標識される。加熱不活性化 (65℃で20分間) 後、カラムに通して反応物が精製され、組み込まれていない標識が除去される。標識オリゴヌクレオチドと、等モル量の未標識相補的オリゴヌクレオチドとの95℃で3分間のアニーリングによって、二本鎖基質 (100nM) が生成され、室温への緩慢な冷却がそれに続く。切断アッセイでは、95℃で30秒間加熱することでgRNA分子がアニールされ、室温への緩慢な冷却がそれに続く。Cas9 (500nM最終濃度) が、切断アッセイ緩衝液 (20mMのHEPES pH7.5、100mMのKCl、5mMのMgCl₂、1mMのDTT、5%グリセロール) 中のアニールされたgRNA分子 (500nM) と共に、総容積9μLでプレインキュベートされる。1μLの標的DNA (10nM) の添加によって反応が開始され、37℃で1時間インキュベートされる。20μLのローディング色素 (ホルムアミド中の5mMのEDTA、0.025%SDS、5%グリセロール) の添加によって反応物がクエンチされ、95℃で5分間加熱される。分解産物は、7M尿素を含有する12%変性ポリアクリルアミドゲル上で分離され、ホスホロイメージングによって視覚化される。得られた分解産物は、相補鎖、非相補鎖、またはその双方が切断されたかどうかを示す。

【0541】

これらのアッセイの片方または双方を使用して、候補gRNA分子または候補Cas9分子の適合性が評価され得る。

【0542】

結合アッセイ：Cas9分子の標的DNAへの結合を試験する

Cas9分子の標的DNAへの結合を評価する代表的な方法は、例えば、Jinek et al., Science 2012; 337 (6096) : 816-821に記載されている。

【0543】

10

20

30

40

50

例えば、電気泳動移動度シフト解析では、脱イオン水中で各鎖（10 nmol）を混合して、95℃で3分間加熱し、室温に緩慢に冷却することで、標的DNA二本鎖が形成される。全てのDNAは、1×TBEを含有する8%天然ゲル上で精製される。DNAバンドは、UVシャドーイングによって視覚化され、切除されて、ゲル小片をDEPC処理H₂Oに浸漬することで溶出される。溶出されDNAは、エタノール沈殿されて、DEPC処理H₂Oに溶解される。DNAサンプルは、[γ-32P]-ATPを使用して、T4ポリヌクレオチドキナーゼで37℃で30分間にわたり5'末端標識される。ポリヌクレオチドキナーゼは、65℃で20分間加熱変性され、カラムを使用して、組み込まれていない放射性標識が除去される。結合アッセイは、20 mMのHEPES pH 7.5、100 mMのKCl、5 mMのMgCl₂、1 mMのDTT、および10%グリセロールを含有する緩衝液中で、総容積10 μlで実施される。Cas9タンパク質分子は、等モル量のプレアニールgRNA分子でプログラムされて、100 pMから1 μMに滴定される。放射性標識DNAが、20 pMの最終濃度に添加される。サンプルは、37℃で1時間インキュベートされ、1×TBEおよび5 mMのMgCl₂を含有する8%天然ポリアクリルアミドゲル上で、4℃で分離される。ゲルは乾燥されて、DNAはホスホロイメージングによって視覚化される。

【0544】

Cas9/gRNA複合体の熱安定性を測定する技術

Cas9-gRNAリボ核タンパク質（RNP）複合体の熱安定性は、示差走査型蛍光定量法（DSF）およびその他の技術によって検知することができる。タンパク質の熱安定性は、例えば、gRNAなどの結合RNA分子の添加などの好ましい条件下で増大され得る。従って、Cas9/gRNA複合体の熱安定性に関する情報は、複合体が安定しているかどうかを決定する上で有用である。

【0545】

示差走査型蛍光定量法（DSF）

DSFは、タンパク質の熱安定性を測定するために用いることができる技術である。このアッセイは、いくつかの方法で適用することができる。例示的なプロトコルとして、限定はしないが、RNP形成のための所望の溶液条件を判定するプロトコル（アッセイ1、以下を参照）、gRNA:Cas9タンパク質の最良の化学量論比を試験するプロトコル（アッセイ2、以下を参照）、Cas9分子、例えば、野生型もしくは突然変異型Cas9分子について有効なgRNA分子をスクリーニングするプロトコル（アッセイ3、以下を参照）、ならびに標的DNAの存在下でRNP形成を調べるプロトコル（アッセイ4）が挙げられる。

【0546】

アッセイ1

RNP複合体を形成するための最良の溶液を判定するために、Cas9の2 μM水溶液と10×SYPRO Orange（登録商標）（Life Technologiesカタログ番号S-6650）が384ウェルプレート内に分注される。次に、様々なpHの溶液中で希釈された等モル量のgRNA、および塩が添加される。室温で10分間インキュベートし、2000 rpmで遠心分離してあらゆる気泡を除去した後、Bio-Rad CFX Manager ソフトウェアと共に、Bio-Rad CFX384（商標）Real-Time System C1000 Touch（商標）サーマルサイクラーを使用して、10秒毎に1℃の温度増大で20℃から90℃への勾配が実行される。

【0547】

アッセイ2

第2のアッセイは、上記アッセイ1からの最適緩衝液中で、様々な濃度のgRNA分子と2 μM Cas9を混合して、384ウェルプレート内で、室温で10分間インキュベートすることを含む。等容積の最適緩衝液と10×SYPRO Orange（登録商標）（Life Technologiesカタログ番号S-6650）が添加され、プレートはMicroseal（登録商標）B粘着剤（MSB-1001）で密封される。

あらゆる気泡を除去するための2000rpmでの遠心分離に続いて、Bio-Rad CFX Managerソフトウェアと共に、Bio-Rad CFX384（商標）Real-Time System C1000 Touch（商標）サーマルサイクラーを使用して、10秒毎に1℃の温度増大で20℃から90℃への勾配が実行される。

【0548】

アッセイ3

第3のアッセイでは、対象Cas9分子（例えば、Cas9タンパク質、例えば、Cas9変異タンパク質）を精製する。変異gRNA分子のライブラリーを合成し、20μMの濃度まで再懸濁させる。5×SYPRO Orange（登録商標）（Life Technologiesカタログ番号S-6650）の存在下で予定緩衝液中に各々1μMの最終濃度で、Cas9分子をgRNA分子と一緒にインキュベートする。室温で10分間インキュベートしてから、2000rpmで2分間の遠心分離により気泡を全て除去した後、Bio-Rad CFX Managerソフトウェアと共に、Bio-Rad CFX384（商標）Real-Time System C1000 Touch（商標）サーマルサイクラーを使用して、10秒毎に1℃ずつ昇温しながら、20℃から90℃への勾配を実行する。

【0549】

アッセイ4

第4のアッセイでは、次のサンプル：Cas9タンパク質単独、Cas9タンパク質とgRNA、Cas9タンパク質とgRNAおよび標的DNA、ならびにCas9タンパク質と標的DNAを用いて、DSF実験を実施する。構成要素を混合する順序は、反応溶液、Cas9タンパク質、gRNA、DNA、およびSYPRO Orangeの順である。反応溶液は、MgCl₂の非存在または存在下で、10mM HEPES pH7.5、100mM NaClを含有する。2000rpmで2分間の遠心分離により気泡を全て除去した後、Bio-Rad CFX Managerソフトウェアと共に、Bio-Rad CFX384（商標）Real-Time System C1000 Touch（商標）サーマルサイクラーを使用して、10秒毎に1℃ずつ昇温しながら、20℃から90℃への勾配を実行する。

【0550】

V. ゲノム編集アプローチ

例えば、本明細書に記載される遺伝子などの遺伝子の突然変異は、本明細書で考察されるアプローチの1つを用いて修正することができる。一実施形態では、遺伝子中の突然変異は、細胞外供給テンプレート核酸を用いた相同組換え修復（HDR）により修正される（以下を参照）。別の実施形態では、遺伝子中の突然変異は、細胞外供給テンプレート核酸を用いずに、相同組換え修復（HDR）により修正される（以下を参照）。

【0551】

さらに、NHEJを用いた遺伝子の1つまたは両方の対立遺伝子の標的化破壊（例えば、ノックアウト）方法も本明細書に記載される。別の実施形態では、遺伝子の標的化ノックダウンのための方法が提供される（以下を参照）。

【0552】

HDR修復、HDR媒介性ノックインおよびテンプレート核酸

本明細書に記載されるように、ヌクレアーゼ誘導相同組換え修復（HDR）を使用して、ゲノム中の標的配列を改変し、突然変異を修正（例えば、修復もしくは編集）することができる。標的配列の改変は、細胞外供給ドナーテンプレートまたはテンプレート核酸を用いた相同組換え修復（HDR）によって起こる。例えば、供与体テンプレートまたはテンプレート核酸は、標的配列の改変を可能にする。プラスミド供与体は、相同組換えのためのテンプレートとして使用できると考えられる。さらに、一本鎖供与体テンプレートは、標的配列と供与体テンプレートとの間の相同組換え修復の代替（alternate）方法（例えば、一本鎖アニーリング）による標的配列の改変のためのテンプレートとして使用できることも考えられる。供与体テンプレートを用いて実施される標的配列の改変は

10

20

30

40

50

、Cas9分子による切断に依存する。Cas9による切断は、二本鎖切断または2つの一本鎖切断を含み得る。本明細書に記載されるように、ヌクレアーゼ誘導相同組換え修復（HDR）を使用して、細胞外供給ドナーテンプレートまたはテンプレート核酸なしで、標的配列を改変し、ゲノム中の突然変異を修正（例えば、修復もしくは編集）することができる。標的配列の改変は、細胞外供給ドナー配列を用いた相同組換え修復（HDR）によって起こる。例えば、内在性ゲノム供与体配列は、標的配列の改変を可能にする。一実施形態では、内在性ゲノム供与体配列を、標的配列と同じ染色体上に位置させることが検討される。さらに、別の実施形態では、内在性ゲノム供与体配列は、標的配列とは異なる染色体上に位置させることが検討される。内在性ゲノム供与体配列による標的配列の改変は、Cas9分子による切断に依存する。Cas9による切断は、二本鎖切断または2つの一本鎖切断を含み得る。

10

【0553】

テンプレート核酸を用いた、もしくは内在性ゲノムドナー配列を用いたHDRにより修正することができる突然変異として点突然変異がある。一実施形態では、点突然変異は、1つの二本鎖切断または2つの一本鎖切断のいずれかによって修正することができる。一実施形態では、点突然変異は、以下のものによって修正することができる：（1）1つの二本鎖切断、（2）2つの一本鎖切断、（3）標的位置の両側でそれぞれ起こる切断を含む2つの二本鎖切断、（4）標的位置の両側で起こる二本鎖切断と2つの一本鎖切断を含む、1つの二本鎖切断と2つの二本鎖切断、（5）標的位置の両側でそれぞれ起こる1対の一本鎖切断を含む、4つの一本鎖切断、または（6）1つの一本鎖切断。

20

【0554】

一本鎖テンプレート核酸が用いられる一実施形態では、標的位置は、代替HDRによって改変することができる。

【0555】

標的位置の供与体テンプレートを用いて実施される改変は、Cas9分子による切断に依存する。Cas9による切断は、ニック、二本鎖切断、または2つの一本鎖切断、例えば、標的核酸の各鎖に1つずつを含み得る。標的核酸への切断の導入後、切断末端に切除が起こり、これによってDNA領域にオーバーラップする一本鎖が生じる。

【0556】

標準HDRでは、標的核酸に対する相同配列を含む二本鎖供与体テンプレートを導入するが、これは、標的核酸に直接組み込むか、または標的核酸の配列を修正するためのテンプレートとして使用する。切断における切除後、修復は、様々な経路、例えば、ダブルホリデイジャンクションモデル（double Holliday junction model）（もしくは二本鎖切断修復、DSBR、経路）または合成依存性鎖アニリング（SDSA）経路によって進行し得る。ダブルホリデイジャンクションモデルでは、供与体テンプレート中の相同配列に対する標的核酸の2つの一本鎖オーバーハングによる鎖浸潤が起こり、これによって、2つのホリデイジャンクションを含む中間体が形成される。これらのジャンクションは、新たなDNAが、浸潤鎖の末端から合成されているため、移動して、切除によって生じた間隙を充填する。新たに合成されたDNAの末端は、切除された末端と連結し、ジャンクションは分解されて、標的核酸の修正、例えば、対応する標的位置での供与体テンプレートの修正配列の組み込みが起こる。供与体テンプレート核酸との交差が、ジャンクションの分解時に起こり得る。SDSA経路では、唯一の一本鎖オーバーハングが供与体テンプレートを浸潤し、新たなDNAが浸潤鎖の末端から合成されて、切除によって生じた間隙を充填する。新たに合成されたDNAは、次に、残る一本鎖オーバーハングとアニールし、新たなDNAが合成されて間隙を充填した後、鎖が連結されて、修正DNA二重鎖を生成する。

30

40

【0557】

代替HDRでは、一本鎖供与体テンプレート、例えば、テンプレート核酸を導入する。所望の標的位置を改変するための標的核酸でのニック、一本鎖切断、または二本鎖切断は、例えば、本明細書に記載されるものなどのCas9分子によって媒介され、切断におけ

50

る切除が起こって、一本鎖オーバーハングが露出する。標的核酸の標的位置を修正または改変するためのテンプレート核酸の配列の組み込みは、典型的に、前述した通り、S D S A経路によって起こる。

【0558】

H D R経路、例えば、標準H D Rもしくはa l t e r H D Rを促進する方法は、本明細書のセクションV Iに記載される。

【0559】

テンプレート核酸についてのさらに詳細は、国際出願P C T / U S 2 0 1 4 / 0 5 7 9 0 5号の「テンプレート核酸(T e m p l a t e n u c l e i c a c i d s)」と題するセクションI Vに記載されている。

【0560】

テンプレート核酸を用いた、もしくは内在性ゲノムドナー配列を用いたH D Rにより修正(例えば、改変)することができる、特定の遺伝子座、例えば、H L A - A、H L A - B、H L A - C、H L A - D R B 1、H L A - D R B 3 / 4 / 5、もしくはH L A - D Q B 1の対立遺伝子変異体配列の配列中の突然変異が含まれる。また、テンプレート核酸、例えば、本明細書に記載されるテンプレート核酸を用いたH D Rによって、特定の遺伝子座、例えば、H L A - A、H L A - B、H L A - C、H L A - D R B 1、H L A - D R B 3 / 4 / 5、もしくはH L A - D Q B 1の対立遺伝子変異体配列の配列にA 1 A T配列を挿入することもできる。

【0561】

二本鎖切断媒介性修復またはノックイン

一実施形態では、二本鎖切断は、H N H様ドメインに関連する切断活性と、R u v C様ドメイン、例えば、N末端R u v C様ドメインに関連する切断活性を有するC a s 9分子、例えば、野生型C a s 9によって実施される。このような実施形態は、単一のg R N Aを必要とする。

【0562】

一本鎖切断媒介性修復またはノックイン

いくつかの実施形態では、1つの一本鎖切断、またはニックは、ニッカーゼ活性を有するC a s 9分子、例えば、本明細書に記載されるようなC a s 9ニッカーゼによって実施される。ニック標的核酸は、a l t e r H D R用の基質となり得る。

【0563】

他の実施形態では、2つの一本鎖切断、またはニックは、例えば、H N H様ドメインに関連する切断活性、またはN末端R u v C様ドメインに関連する切断活性などのニッカーゼ活性を有するC a s 9分子によって実施される。このような実施形態は、通常、2つのg R N Aを、すなわち各一本鎖切断の配置に1つずつ必要とする。一実施形態では、ニッカーゼ活性を有するC a s 9分子は、g R N Aがハイブリダイズする鎖を切断するが、g R N Aがハイブリダイズする鎖と相補的な鎖は切断しない。一実施形態では、ニッカーゼ活性を有するC a s 9分子は、g R N Aがハイブリダイズする鎖を切断しないが、その代わり、g R N Aがハイブリダイズする鎖と相補的な鎖は切断する。

【0564】

一実施形態では、ニッカーゼは、不活性化されたR u v C活性を有するC a s 9分子、例えば、D 1 0に突然変異を有するC a s 9分子、例えば、D 1 0 A突然変異などH N H活性を有する。D 1 0 Aは、R u v Cを不活性化し；従って、C a s 9ニッカーゼは、H N H活性(のみ)を有し、g R N Aがハイブリダイズする鎖(例えば、その上にN G G P A Mを有していない相補鎖)上で切断する。他の実施形態では、H 8 4 0、例えばH 8 4 0 A、突然変異を有するC a s 9分子をニッカーゼとして用いることができる。H 8 4 0 Aは、H N Hを不活性化し；従って、C a s 9ニッカーゼは、R u v C活性(のみ)を有し、非相補鎖(例えば、N G G P A Mを有し、その配列が、g R N Aと同一である鎖)上で切断する。他の実施形態では、N 8 6 3、例えば、N 8 6 3 A突然変異、突然変異を有するC a s 9分子をニッカーゼとして使用することができる。N 8 6 3 Aは、H N H

10

20

30

40

50

を不活性化することから、Cas9ニッカーゼは、RuvC活性（のみ）を有し、非相補鎖（NGG PAMを有し、かつその配列がgRNAと同一である鎖）上で切断する。他の実施形態では、N580突然変異、例えば、N580A突然変異を有するCas9分子をニッカーゼとして使用することができる。N580Aは、HNHを不活性化することから、Cas9ニッカーゼは、RuvC活性（のみ）を有し、非相補鎖（NGG PAMを有し、かつその配列がgRNAと同一である鎖）上で切断する。ニッカーゼおよび2つのgRNAを用いて、2つの一本鎖ニックを配置する一実施形態では、1つのニックは、標的核酸の+鎖上にあり、1つのニックは、その-鎖上にある。PAMは、外側を向いてもよい。これらのgRNAは、gRNA同士が、約0～50、0～100、または0～200ヌクレオチドによって隔てられるように選択することができる。一実施形態では、2つのgRNAの標的化ドメインと相補的な標的配列の間にオーバーラップはない。一実施形態では、gRNAは、オーバーラップせずに、50、100、または200ヌクレオチド程によって隔てられている。一実施形態では、2つのgRNAの使用は、例えば、オフターゲット結合を低減することによって、特異性を増大することができる（Ran et al., Cell 2013; 154(6): 1380-1389）。

【0565】

一実施形態では、単一のニックを用いて、HDR、例えば、alt-HDRを誘導することができる。本明細書では、単一のニックを用いて、所与の切断部位でのHRとNHEJの比を増加し得ることが検討される。一実施形態では、前記gRNAの標的化ドメインが相補的である標的核酸の鎖中に一本鎖切断を形成する。他の実施形態では、前記gRNAの標的化ドメインが相補的である鎖以外の標的核酸の鎖中に一本鎖切断を形成する。

【0566】

標的位置に対する二本鎖または一本鎖切断の配置

鎖の一方における二本鎖切断または一本鎖切断は、改変が所望の領域内で生じる、例えば、突然変異の修正が起こるように、標的位置に十分接近させるべきである。一実施形態では、距離は、50、100、200、300、350もしくは400ヌクレオチド以下である。標的位置が、末端切除中にエキソヌクレアーゼ媒介性除去を受ける領域内にあるように、切除は標的位置に十分接近させるべきであると考えられる。標的位置と切断の間の距離が大きすぎると、改変しようとする突然変異体または他の配列が末端切除に含まれず、従って、修正されない場合がある。というのは、供与体配列（細胞外供給供与体配列または内在性ゲノム供与体配列のいずれも）は、いくつかの実施形態では、末端切除領域内の配列を修正するためだけに使用されるからである。

【0567】

一実施形態では、標的化ドメインは、切断事象、例えば、二本鎖もしくは一本鎖切断が、改変しようとする領域、例えば、突然変異から1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150もしくは200ヌクレオチド以内に位置するように構成される。切断、例えば、二本鎖切断または一本鎖切断は、改変しようとする領域、例えば、突然変異の上流または下流に配置することができる。いくつかの実施形態では、切断は、改変しようとする領域、少なくとも2つの突然変異ヌクレオチドにより画定される領域内に配置される。いくつかの実施形態では、切断は、改変しようとする領域に直接隣接して、例えば、突然変異のすぐ上流または下流に位置する。

【0568】

一実施形態では、一本鎖切断には、下で考察されるように、第2のgRNA分子によって配置される追加的一本鎖切断が伴う。例えば、標的化ドメインは、例えば、2つの一本鎖切断などの切断事象が、標的位置の1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、150または200ヌクレオチド内に位置するように構成される。一実施形態では、第1および第2のgRNA分子は、Cas9ニッカーゼを誘導すると、一本鎖切断が、前記第2のgRNAによって配置される互いに十分に近い追加的一本鎖切断を伴い、所望する領域の改変をもたらすよ

うに構成される。一実施形態では、第1および第2のgRNA分子は、例えば、Cas9がニッカーゼである場合、第2のgRNAによって配置される一本鎖切断が、前記第1のgRNA分子によって配置される切断の10、20、30、40、または50ヌクレオチド内であるように構成される。一実施形態では、2つのgRNA分子は、異なる鎖上の同一位置に、または互いに少数のヌクレオチド内に、切断を配置させるように設計されて、例えば、二本鎖切断を本質的に模倣する。

【0569】

HDR媒介性修正を誘導するために、gRNA（単分子（もしくはキメラ）またはモジュラーgRNA）およびCas9ヌクレアーゼが、二本鎖切断を誘導する一実施形態では、切断部位は、標的位置から0~200塩基対（例えば、0~175、0~150、0~125、0~100、0~75、0~50、0~25、25~200、25~175、25~150、25~125、25~100、25~75、25~50、50~200、50~175、50~150、50~125、50~100、50~75、75~200、75~175、75~150、75~125、75~100塩基対）離れている。一実施形態では、切断部位は、標的位置から0~100塩基対（例えば、0~75、0~50、0~25、25~100、25~75、25~50、50~100、50~75、または75~100塩基対）離れている。

【0570】

複数の実施形態では、ニッカーゼを用いることでHDRを促進して、オーバーハングを含む切断を生成することができる。オーバーハングの一本鎖性質は、例えば、NHEJとは反対に、HDRによって切断を修復する細胞の可能性を増大することができる。特に、いくつかの実施形態では、第1のニッカーゼを第1の標的配列に標的化する第1のgRNAと、第1の標的配列とは反対側のDNA鎖上にあり、しかも第1のニックからずれている第2の標的配列に第2のニッカーゼを標的化する第2のgRNAとを選択することによって、HDRを促進する。

【0571】

一実施形態では、gRNA分子の標的化ドメインは、ヌクレオチドが改変されないように、予め選択したヌクレオチド、例えば、コード領域のヌクレオチドから十分遠くに、切断事象が位置するように設計される。一実施形態では、gRNA分子の標的化ドメインは、エキソン配列の改変または不要なスプライシング事象を回避するために、イントロン切断事象が、イントロン／エキソン境界または天然起源のスプライスシグナルから十分遠くに位置するように設計される。gRNA分子は、以下に記載するように、第1、第2、第3および／または第4のgRNA分子であってよい。

【0572】

第1の切断および第2の切断同士の配置

一実施形態では、二本鎖切断は、下で考察されるように、第2のgRNA分子によって配置される追加的二本鎖切断を伴い得る。

【0573】

一実施形態では、二本鎖切断は、第2のgRNA分子および第3のgRNA分子によって配置される2つの追加的二本鎖切断を伴い得る。

【0574】

一実施形態では、第1および第2の一本鎖切断は、第3のgRNA分子および第4のgRNA分子によって配置される2つの追加的二本鎖切断を伴い得る。

【0575】

2つ以上のgRNAを用いて、標的核酸内に2つ以上の切断事象、例えば、二本鎖または一本鎖切断を配置する場合、同じまたは異なるCas9タンパク質によって2つ以上の切断事象を実施し得ることが検討される。例えば、2つのgRNAを用いて、2つの二本鎖切断を配置する場合、単一のCas9ヌクレアーゼを用いて、双方の二本鎖切断を生成することができる。2つ以上のgRNAを用いて、2つ以上の一本鎖切断（ニック）を配置する場合、単一のCas9ニッカーゼを用いて、2つ以上のニックを生成することがで

きる。2つ以上のgRNAを用いて、少なくとも1つの二本鎖切断と少なくとも1つの一本鎖切断を配置する場合、2つのCas9タンパク質、例えば、1つのCas9ヌクレアーゼと1つのCas9ニッカーゼを用いることができる。2つ以上のCas9タンパク質を用いる場合、2つ以上のCas9タンパク質を順次送達することにより、標的核酸の所望の位置で、一本鎖切断に対して二本鎖の特異性を制御し得ることが検討される。

【0576】

いくつかの実施形態では、第1のgRNA分子の標的化ドメインおよび第2のgRNA分子の標的化ドメインは、標的核酸分子の対向鎖と相補的である。いくつかの実施形態では、gRNA分子および第2のgRNA分子は、PAMが外側に向くように設計される。

【0577】

特定の実施形態では、互いに予め選択した距離にある2つの位置のCas9媒介性切断を指令するように、2つのgRNAを選択する。複数の実施形態では、2つの切断点は、標的核酸の対向鎖上にある。いくつかの実施形態では、2つの切断点は、平滑末端切断を形成し、他の実施形態では、これらは、DNA末端が、1つまたは2つのオーバーハング（例えば、1つまたは複数の5'オーバーハングおよび／または1つまたは複数の3'オーバーハング）を含むようにずれている。複数の実施形態では、各切断事象は、ニックである。いくつかの実施形態では、ニックは、二本鎖切断機構により認識される切断を形成するように、互いに十分接近している（例えば、SSB機構により認識されるのとは反対に）。複数の実施形態では、ニックは、それらが、HDRの基質であるオーバーハングを生成する、すなわち、切断の配置が、いくつかの切除を被ったDNA基質を模倣するように、十分離れている。例えば、いくつかの実施形態では、ニックは、プロセッサ切除のための基質であるオーバーハングを生成するように隔てられている。いくつかの実施形態では、2つの切断は、互いに25～65ヌクレオチド以内で隔てられている。2つの切断は、例えば、互いに約25、30、35、40、45、50、55、60または65ヌクレオチドであってよい。2つの切断は、例えば、互いに少なくとも約25、30、35、40、45、50、55、60または65ヌクレオチドであってよい。2つの切断は、例えば、互いに多くとも約30、35、40、45、50、55、60または65ヌクレオチドであってよい。いくつかの実施形態では、2つの切断は、互いに約25～30、30～35、35～40、40～45、45～50、50～55、55～60、または60～65ヌクレオチドであってよい。

【0578】

いくつかの実施形態では、切除された切断を模倣する切断は、3'末端オーバーハング（例えば、DSBおよびニックによって生成され、ここで、ニックは3'オーバーハングを残す）、5'オーバーハング（例えば、DSBおよびニックによって生成され、ここで、ニックは5'オーバーハングを残す）、3'および5'オーバーハング（例えば、3つの切断によって生成される）、2つの3'オーバーハング（例えば、互いにずれている2つのニックによって生成される）、または2つの5'オーバーハング（例えば、互いにずれている2つのニックによって生成される）を含む。

【0579】

Cas9ニッカーゼと複合体化する2つのgRNA（独立して、単分子（もしくはキメラ）またはモジュラーgRNA）が、HDR媒介性修正を誘導する目的で、2つの一本鎖切断を誘導する一実施形態では、より近傍のニックは、標的位置から互いに0～200塩基対（例えば、0～175、0～150、0～125、0～100、0～75、0～50、0～25、25～200、25～175、25～150、25～125、25～100、25～75、25～50、50～200、50～175、50～150、50～125、50～100、50～75、75～200、75～175、75～150、75～125、75～100塩基対）離れており、2つのニックは、理想的には互いに25～65塩基対（例えば、25～50、25～45、25～40、25～35、25～30、30～55、30～50、30～45、30～40、30～35、35～55、35～50、35～45、35～40、40～55、40～50、40～45塩基対、45～50塩基対

10

20

30

40

50

、50～55塩基対、55～60塩基対、60～65塩基対)以内にあり、ならびに互いから100塩基対以下(例えば、互いから90、80、70、60、50、40、30、20、10、または5塩基対)離れている。一実施形態では、切断部位は、標的位置から0～100塩基対(例えば、0～75、0～50、0～25、25～100、25～75、25～50、50～100、50～75または75～100塩基対)離れている。

【0580】

一実施形態では、2つのgRNA、例えば、独立して、単分子(もしくはキメラ)またはモジュラーgRNAは、標的位置の両側に二本鎖切断を配置するように設計される。代替の実施形態では、3つのgRNA、例えば、独立して、単分子(もしくはキメラ)またはモジュラーgRNAは、標的位置の両側に、二本鎖切断(すなわち、cas9ヌクレアーゼと1つのgRNAの複合体)と2つの一本鎖切断または対合一本鎖切断(すなわち、Cas9ニッカーゼと2つのgRNAの複合体)を配置するように設計される。別の実施形態では、4つのgRNA、例えば、独立して、単分子(もしくはキメラ)またはモジュラーgRNAは、標的位置の両側に2対の一本鎖切断(すなわち、Cas9ニッカーゼと2対の2つのgRNAの複合体)を生成するように設計される。二本鎖切断または1対において2つの一本鎖ニックの近い方は、理想的には標的位置の0～500塩基対以内(標的位置から、例えば、450、400、350、300、250、200、150、100、50または25bp以下)にある。ニッカーゼを使用する場合、1対の2つのニックは、複数の実施形態では、互いに25～65塩基対(例えば、25～55、25～50、25～45、25～40、25～35、25～30、50～55、45～55、40～55、35～55、30～55、30～50、35～50、40～50、45～50、35～45、40～45塩基対、45～50塩基対、50～55塩基対、55～60塩基対、または60～65塩基対)以内にあり、ならびに互いから100塩基対以下(例えば、90、80、70、60、50、40、30、20または10塩基対以下)離れている。

【0581】

2つのgRNA分子を用いて、Cas9分子を切断に標的化する場合、Cas9分子の様々な組み合わせが考えられる。いくつかの実施形態では、第1のgRNAを用いて、第1のCas9分子を第1の標的位置に標的化し、第2のgRNAを用いて、第2のCas9分子を第2の標的位置に標的化する。いくつかの実施形態では、第1のCas9分子は、標的核酸の第1鎖にニックを生成し、第2のCas9分子は、対向鎖上にニックを生成し、これによって、二本鎖切断(例えば、平滑末端切断またはオーバーハングを含む切断)が生じる。

【0582】

1つの一本鎖切断を一方の鎖に、また第2の一本鎖切断を対向鎖に標的化するために、ニッカーゼの様々な組み合わせを選択することができる。組み合わせを選択する際、1つの活性RuvC様ドメインを有するニッカーゼと、1つの活性HNHドメインを有するニッカーゼがあることを考慮に入れることができる。一実施形態では、RuvC様ドメインは、標的核酸分子の非相補的鎖を切断する。一実施形態では、HNH様ドメインは、一本鎖相補的ドメイン、例えば、二本鎖核酸分子の相補鎖を切断する。一般的に、双方のCas9分子は、同じ活性ドメインを有し(例えば、双方が活性RuvCドメインを有するか、または双方が活性HNHドメインを有する)、標的の対向鎖に2つの結合するgRNAを選択することになる。さらに詳細には、いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、標的核酸の第1鎖と相補的であり、活性RuvC様ドメインを有するニッカーゼに結合して、第1のgRNAと非相補的な鎖、すなわち、標的核酸の第2鎖をニッカーゼに切断させ;第2のgRNAは、標的核酸の第2鎖と相補的であり、活性RuvC様ドメインを有するニッカーゼに結合して、第2のgRNAと非相補的な鎖、すなわち、標的核酸の第1鎖をニッカーゼに切断させる。反対に、いくつかの実施形態では、第1のgRNAは、標的核酸の第1鎖と相補的であり、活性HNHドメインを有するニッカーゼに結合して、第1のgRNAと相補的な鎖、すなわち、標的核酸の第1鎖をニッカーゼに切断させ;第2のgRNAは、標的核酸の第2鎖と相補的であり、活性HNHドメインを有するニッカー

ぜに結合して、第2のgRNAと相補的な鎖、すなわち、標的核酸の第2鎖をニッカーゼに切断させる。別の実施形態では、1つのCas9分子が活性RuvC様ドメインを有し、他方のCas9分子が活性HNHドメインを有する場合、双方のCas9分子のgRNAは、標的核酸の同じ鎖と相補的であり得るため、活性RuvC様ドメインを有するCas9分子は、非相補鎖を切断し、HNHドメインを有するCas9分子は、相補鎖を切断することになり、これによって二本鎖切断が生じる。

【0583】

供与体テンプレートの相同性アームの長さ

相同性アームは、例えば、切除された一本鎖オーバーハングが、供与体テンプレート内の相補的領域を見出すことができるように、末端切除が起こり得る領域と少なくとも同じくらい遠くまで延在すべきである。その全長は、プラスミドサイズまたはウイルスパッケージング限界などのパラメーターによって限定され得る。一実施形態では、相同性アームは、反復エレメント、例えば、Alu反復配列またはLINE反復配列中に延在しない。

【0584】

例示的な相同性アーム長さとしては、少なくとも50、100、250、500、750、1000、2000、3000、4000、または5000ヌクレオチドが挙げられる。いくつかの実施形態では、相同性アーム長さは、50~100、100~250、250~500、500~750、750~1000、1000~2000、2000~3000、3000~4000、または4000~5000ヌクレオチドである。

【0585】

標的位置は、本明細書の用法では、Cas9分子依存的プロセスにより修飾される標的核酸（例えば、染色体）上の部位を指す。例えば、標的位置は、標的核酸の修飾Cas9分子切断および標的位置のテンプレート核酸指向性修飾、例えば、修正であり得る。一実施形態では、標的位置は、1つまたは複数のヌクレオチドが付加される標的核酸上の2つのヌクレオチド、例えば、隣接ヌクレオチド間の部位であってよい。標的位置は、テンプレート核酸により改変、例えば修正される1つまたは複数のヌクレオチドを含んでもよい。一実施形態では、標的位置は、標的配列（例えば、gRNAが結合する配列）内にある。一実施形態では、標的位置は、標的配列（例えば、gRNAが結合する配列）の上流または下流である。

【0586】

テンプレート核酸は、この用語が本明細書で使用される場合、標的位置の構造を改変するために、Cas9分子およびgRNA分子と一緒に使用することができる核酸配列を指す。一実施形態では、標準核酸は、典型的に、切断部位またはその付近で、テンプレート核酸の配列の一部もしくは全部を有するように、改変される。一実施形態では、テンプレート核酸は、一本鎖である。一実施形態では、テンプレート核酸は、二本鎖である。一実施形態では、テンプレート核酸は、DNA、例えば、二本鎖DNAである。他の実施形態では、テンプレート核酸は、一本鎖DNAである。一実施形態では、テンプレート核酸は、Cas9およびgRNAと同じベクター骨格、例えば、AAVゲノム、プラスミドDNA上にコードされる。一実施形態では、テンプレート核酸は、生体内でベクター骨格から切除され、例えば、これは、gRNA認識配列によりフランキングされる。一実施形態では、テンプレート核酸は、内在性ゲノム配列を含む。

【0587】

一実施形態では、テンプレート核酸は、相同組換え修復事象に参加することによって、標的位置の構造を改変する。一実施形態では、テンプレート核酸は、標的位置の配列を改変する。一実施形態では、テンプレート核酸は、標的核酸への修飾、または非天然塩基の組み込みをもたらす。

【0588】

典型的に、テンプレート配列は、標的配列による切断媒介性または触媒組換えを受ける。一実施形態では、テンプレート核酸は、eCas9媒介切断事象によって切断される標的配列上の1部位に対応する配列を含む。特定の実施形態では、テンプレート核酸は、

10

20

30

40

50

第1のCas9媒介性事象で切断される標的配列上の第1部位と、第2のCas9媒介性事象で切断される標的配列上の第2部位の両方に対応する配列を含む。

【0589】

一実施形態では、テンプレート核酸は、翻訳配列のコード配列に改変をもたらす配列、例えば、突然変異対立遺伝子を野生型対立遺伝子に形質転換する、野生型対立遺伝子を突然変異対立遺伝子に形質転換する、および／もしくは停止コドンの導入、アミノ酸残基の挿入、アミノ酸残基の欠失、またはナンセンス突然変異などの、例えば、タンパク質産物中の1アミノ酸の別のアミノ酸による置換をもたらす配列を含み得る。

【0590】

他の実施形態では、テンプレート核酸は、非コード配列の改変、例えば、エキソンあるいは5'もしくは3'非翻訳または非転写領域での改変をもたらす配列を含み得る。このような改変として、制御エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサーの改変、およびシス作用もしくはトランス作用制御エレメントの改変が挙げられる。

10

【0591】

例えば、本明細書に記載される遺伝子などの遺伝子中の標的位置との相同性を有するテンプレート核酸を用いて、標的配列の構造を改変することができる。テンプレート配列を用いて、不要な構造、例えば、不要なまたは突然変異ヌクレオチドを改変することができる。

【0592】

テンプレート核酸は、典型的に、以下の構成要素：

20

〔5'相同性アーム〕－〔置換配列〕－〔3'相同性アーム〕を含む。

【0593】

相同性アームは、染色体への組換え、従って、置換配列による、望ましくないエレメント、例えば、突然変異またはシグネチャの置換を提供する。一実施形態では、相同性アームは、最も遠位の切断部位とフランキングする。

【0594】

一実施形態では、5'相同性アームの3'末端は、置換配列の5'末端に隣接する位置である。一実施形態では、5'相同性アームは、置換配列の5'末端から少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、3000、4000、または5000ヌクレオチド5'側に延在し得る。

30

【0595】

一実施形態では、3'相同性アームの5'末端は、置換配列の3'末端に隣接する位置である。一実施形態では、3'相同性アームは、置換配列の3'末端から少なくとも10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、3000、4000、または5000ヌクレオチド3'側に延在し得る。

【0596】

一実施形態では、突然変異を修正するために、相同性アーム、例えば、5'および3'相同性アームは、各々、最も遠位のgRNA（例えば、突然変異の両側の1000塩基対（bp）の配列にフランキングする約1000bpの配列）を含み得る。

40

【0597】

本明細書では、特定の配列反復エレメント、例えば、Alu反復エレメントまたはLINEエレメントの含有を回避するために、一方または双方の相同性アームを短縮し得ることが考慮される。例えば、配列反復エレメントを回避するために、5'相同性アームを短縮してよい。他の実施形態では、配列反復エレメントを回避するために、3'相同性アームを短縮してもよい。いくつかの実施形態では、特定の配列反復エレメントの含有を回避するために、5'および3'相同性アームの双方を短縮してもよい。

【0598】

50

本明細書では、突然変異を修正するためのテンプレート核酸は、一本鎖オリゴヌクレオチド、例えば、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) として使用するためにデザインされ得ることが検討される。ssODNを使用する場合、5' および 3' 相溶性アームは、約 200 塩基対 (bp) 長、例えば、少なくとも 25、50、75、100、125、150、175、または 200 塩基対長の範囲であってよい。オリゴヌクレオチド合成の改善が継続して実施されるため、より長い相溶性アームも ssODN に検討される。いくつかの実施形態では、より長い相溶性アームは、化学合成以外の方法、例えば、長い二本鎖核酸を変性させた後、例えば、固体支持体に固定させた鎖特異的配列に対するアフィニティにより鎖の一方を精製することによって実施される。

【0599】

いくつかの実施形態では、alt-HDR は、テンプレート核酸が、ニックの 5' 側に (すなわち、ニック鎖の 5' 方向に) 延在する相溶性を有するとき、より効率的に進行する。従って、いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、長い相溶性アームと短い相溶性アームを有し、ここで、長い方の相溶性アームが、ニックの 5' 側にアニールすることができる。いくつかの実施形態では、ニックの 5' 側にアニールすることができるアームは、ニックから、または置換配列の 5' もしくは 3' 末端から、少なくとも 25、50、75、100、125、150、175、または 200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、3000、4000、または 5000 ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ニックの 5' 側にアニールすることができるアームは、ニックの 3' 側にアニールすることができるアームより、少なくとも 10%、20%、30%、40%、または 50% 長い。いくつかの実施形態では、ニックの 5' 側にアニールすることができるアームは、ニックの 3' 側にアニールすることができるアームより、少なくとも 2 倍、3 倍、4 倍、または 5 倍長い。ssDNA テンプレートが、インタクトな鎖または切断鎖にアニールすることができるか否かに応じて、ニックの 5' 側にアニールする相溶性アームは、それぞれ ssDNA テンプレートの 5' 末端または ssDNA テンプレートの 3' 末端に位置し得る。

【0600】

同様に、いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、テンプレート核酸が、ニックの 5' 側に延在する相溶性を有するように、5' 相溶性アーム、置換配列、および 3' 相溶性アームを有する。例えば、5' 相溶性アームと 3' 相溶性アームは、実質的に同じ長さであってよいが、置換配列は、ニックの 3' 側よりもニックの 5' 側で、より遠くに延在し得る。いくつかの実施形態では、置換配列は、ニックの 3' 末端よりもニックの 5' 末端側に、少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、2 倍、3 倍、4 倍、または 5 倍遠くに延在する。

【0601】

いくつかの実施形態では、alt-HDR は、テンプレート核酸がニックの中心に位置するとき、より効率的に進行する。従って、いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、ほぼ同じサイズである 2 つの相溶性アームを有する。例えば、テンプレート核酸の第 1 の相溶性アームは、テンプレート核酸の第 2 の相溶性アームの 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または 1% 以内の長さを有し得る。

【0602】

同様に、いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、テンプレート核酸が、ニックの両側でほぼ同じ距離だけ延在するように、5' 相溶性アーム、置換配列、および 3' 相溶性アームを有する。例えば、相溶性アームは、異なる長さを有してよいが、置換配列は、これを補償するように選択され得る。例えば、置換配列は、ニックの 3' 側よりもニックの 5' 側で、より遠く延在し得るが、ニックの 5' 側の相溶性アームは、これを補償するために、ニックの 3' 側の相溶性アームより短い。その逆も可能であり、例えば、置換配列は、ニックの 5' 側よりもニックの 3' 側で、より遠くに延在し得るが、ニックの 3' 側の相溶性アームは、これを補償するために、ニックの 5' 側の相溶性アームより短い。

【0603】

10

20

30

40

50

線状核酸テンプレート系の例示的な配置

一実施形態では、核酸テンプレート系は、二本鎖である。一実施形態では、核酸テンプレート系は、一本鎖である。一実施形態では、核酸テンプレート系は、一本鎖部分と二本鎖部分を含む。一実施形態では、テンプレート核酸は、ニックおよび／または置換配列の両側に、約50～100、例えば、55～95、60～90、65～85、または70～80塩基対の相同性を含む。一実施形態では、テンプレート核酸は、ニックもしくは置換配列の5'側、ニックもしくは置換配列の3'側、またはニックもしくは置換配列の5'および3'側の双方に約50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100塩基対の相同性を含む。

【0604】

一実施形態では、テンプレート核酸は、ニックおよび／または置換配列の3'側に約150～200塩基対、例えば、155～195、160～190、165～185、もしくは170～180塩基対の相同性を含む。一実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の3'側に約150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、もしくは200塩基対の相同性を含む。一実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の5'側に約100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、もしくは10塩基対未満の相同性を含む。

【0605】

一実施形態では、テンプレート核酸は、ニックおよび／または置換配列の5'側に約150～200塩基対、例えば、155～195、160～190、165～185、もしくは170～180塩基対の相同性を含む。一実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の5'側に約150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、もしくは200塩基対の相同性を含む。一実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の3'側に約100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、もしくは10塩基対未満の相同性を含む。

【0606】

例示的なテンプレート核酸

一実施形態では、テンプレート核酸は、一本鎖核酸である。別の実施形態では、テンプレート核酸は、二本鎖核酸である。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、1つまたは複数のヌクレオチドのヌクレオチド配列を含み、これは、標的核酸に付加されるか、または標的核酸中の変化をテンプレートする。他の実施形態では、テンプレート核酸は、標的位置を改変するのに用いられ得るヌクレオチド配列を含む。他の実施形態では、テンプレート核酸は、例えば標的位置などの標的核酸の野生型配列に対応する、例えば1つまたは複数のヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む。

【0607】

テンプレート核酸は、置換配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、5'相同性アームを含む。他の実施形態では、テンプレート核酸は、3'相同性アームを含む。

【0608】

複数の実施形態では、テンプレート核酸は、直鎖二本鎖DNAである。長さは、例えば、約150～200塩基対、例えば、約150、160、170、180、190、または200塩基対であってよい。長さは、例えば、少なくとも150、160、170、180、190、または200塩基対であってよい。いくつかの実施形態では、長さは、150、160、170、180、190、または200塩基対以下である。いくつかの実施形態では、二本鎖テンプレート核酸は、約160、例えば、155～165、150～170、140～180、130～190、120～200、110～210、100～220、90～230、または80～240塩基対の長さを有する。

【0609】

テンプレート核酸は、直鎖一本鎖DNAであり得る。複数の実施形態では、テンプレート核酸は、(i) 標的核酸の切断鎖にアニールすることができる直鎖一本鎖DNA、(i

10

20

30

40

50

i) 標的核酸のインタクトな鎖にアニールすることができる直鎖一本鎖DNA、(iii) 標的核酸の転写鎖にアニールすることができる直鎖一本鎖DNA、(iv) 標的核酸の非転写鎖にアニールすることができる直鎖一本鎖DNA、またはこれらの2つ以上である。長さは、例えば、約150~200ヌクレオチド、例えば、約150、160、170、180、190、または200ヌクレオチドであってよい。長さは、例えば、少なくとも150、160、170、180、190、または200ヌクレオチドであってよい。いくつかの実施形態では、長さは、150、160、170、180、190、または200ヌクレオチド以下である。いくつかの実施形態では、一本鎖テンプレート核酸は、約160ヌクレオチド、例えば、約155~165、150~170、140~180、130~190、120~200、110~210、100~220、90~230、または80~240ヌクレオチドの長さを有する。

10

【0610】

いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、環状二本鎖DNA、例えば、プラスミドである。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、置換配列および／またはニックの両側に、約500~1000塩基対の相同性を含む。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の5'側、ニックまたは置換配列の3'側、あるいはニックまたは置換配列の5'および3'側の双方に、約300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、または2000塩基対の相同性を含む。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の5'側、ニックまたは置換配列の3'側、あるいはニックまたは置換配列の5'および3'側の双方に、少なくとも300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、または2000塩基対の相同性を含む。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の5'側、ニックまたは置換配列の3'側、あるいは、ニックまたは置換配列の5'および3'側の双方に、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、または2000塩基対以下の相同性を含む。

20

【0611】

いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、アデノウイルスベクター、例えば、AAVベクター、例えば、AAVキャプシドにパッケージングされることを可能にする長さおよび配列のssDNA分子である。ベクターは、例えば、5kb未満であってよく、キャプシド中へのパッケージングを促進するITR配列を含んでもよい。ベクターは、組み込み欠陥であってもよい。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、置換配列および／またはニックの両側に、約150~1000ヌクレオチドの相同性を含む。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の5'側、ニックまたは置換配列の3'側、あるいはニックまたは置換配列の5'および3'側の双方に、約100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、または2000ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の5'側、ニックまたは置換配列の3'側、あるいはニックまたは置換配列の5'および3'側の双方に、少なくとも100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、または2000ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の5'側、ニックまたは置換配列の3'側、あるいはニックまたは置換配列の5'および3'側の双方に、多くとも100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、または2000ヌクレオチドを含む。

30

40

【0612】

いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、レンチウイルスベクター、例えば、IDLV（組み込み欠陥レンチウイルス）である。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、置換配列および／またはニックの両側に、約500~1000塩基対の相同性を含む。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の5'側、ニックまたは置換配列の3'側、あるいはニックまたは置換配列の5'および3'側の双方に、約300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、ま

50

たは2000塩基対の相同性を含む。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の5'側、ニックまたは置換配列の3'側、あるいはニックまたは置換配列の5'および3'側の双方に、少なくとも300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、または2000塩基対の相同性を含む。いくつかの実施形態では、テンプレート核酸は、ニックまたは置換配列の5'側、ニックまたは置換配列の3'側、あるいは、ニックまたは置換配列の5'および3'側の双方に、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、または2000塩基対以下の相同性を含む。

【0613】

一実施形態では、テンプレート核酸は、Cas9がテンプレート核酸を認識してこれを切断するのを妨げる1つまたは複数の突然変異、例えば、サイレント突然変異を含む。テンプレート核酸は、改変しようとする細胞のゲノム中の対応する配列に対して例えば、少なくとも1、2、3、4、5、10、20、または30のサイレント突然変異を含んでもよい。複数の実施形態では、テンプレート核酸は、改変しようとする細胞のゲノム中の対応する配列に対して、多くとも2、3、4、5、10、20、30、または50のサイレント突然変異を含む。一実施形態では、cDNAは、Cas9がテンプレート核酸を認識してこれを切断するのを妨げる1つまたは複数の突然変異、例えば、サイレント突然変異を含む。テンプレート核酸は、改変しようとする細胞のゲノム中の対応する配列に対して、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、10、20、または30のサイレント突然変異を含んでもよい。複数の実施形態では、テンプレート核酸は、改変しようとする細胞のゲノム中の対応する配列に対して、多くとも2、3、4、5、10、20、30、または50のサイレント突然変異を含む。

【0614】

一実施形態では、テンプレート核酸は、相同組換え修復事象に参加することによって標的位置の構造を改変する。一実施形態では、テンプレート核酸は、標的位置の配列を改変する。一実施形態では、テンプレート核酸は、標的核酸への修飾または非天然塩基の組み込みをもたらす。

【0615】

典型的に、テンプレート配列は、標的配列による切断媒介性または触媒による組換えを受ける。一実施形態では、テンプレート核酸は、eCas9媒介性切断事象によって切断される標的配列上の1部位に対応する配列を含む。一実施形態では、テンプレート核酸は、第1のCas9媒介性事象で切断される標的配列上の第1部位と、第2のCas9媒介性事象で切断される標的配列上の第2部位の両方に対応する配列を含む。

【0616】

一実施形態では、テンプレート核酸は、翻訳配列のコード配列に改変をもたらす配列、例えば、突然変異対立遺伝子を野生型対立遺伝子に形質転換する、野生型対立遺伝子を突然変異対立遺伝子に形質転換する、および／もしくは停止コドンの導入、アミノ酸残基の挿入、アミノ酸残基の欠失、またはナンセンス突然変異などの、例えば、タンパク質産物中の1アミノ酸の別のアミノ酸による置換をもたらす配列を含み得る。

【0617】

他の実施形態では、テンプレート核酸は、非コード配列の改変、例えば、エキソンあるいは5'もしくは3'非翻訳または非転写領域に改変をもたらす配列を含み得る。このような改変として、制御エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサーの改変、およびシス作用もしくはトランス作用制御エレメントの改変が挙げられる。標的位置の相同性を有するテンプレート核酸を用いて、標的配列の構造を改変することができる。テンプレート配列を用いて、不要な構造、例えば、不要なまたは突然変異ヌクレオチドを改変することができる。

【0618】

下の表18は、例示的なテンプレート核酸を記載する。一実施形態では、テンプレート核酸は、表18の1列の5'相同性アームおよび3'相同性アームを含む。別の実施形態で

は、第 1 列からの 5' 相同性アームを表 18 の 3' 相同性アームと組み合わせることができる。各実施形態において、5' および 3' 相同性アームの組合せは、置換配列を含む。

【0619】

【表 56】

表 18

5' 相同性アーム (配列番号 5'H の 3' 末端で開始する配列番号 5'H からのヌクレオチドの数)	置換配列: 本明細書に記載される通り、本明細書に記載の G, A, C もしくは T, または cDNA 配列、任意選択的にプロモーター、さらにまた任意選択的にポリ A シグナル	3' 相同性アーム (配列番号 3'H の 5' 末端で開始する配列番号 3'H からのヌクレオチドの数)
10 以上		10 以上
20 以上		20 以上
50 以上		50 以上
100 以上		100 以上
150 以上		150 以上
200 以上		200 以上
250 以上		250 以上
300 以上		300 以上
350 以上		350 以上
400 以上		400 以上
450 以上		450 以上
500 以上		500 以上
550 以上		550 以上
600 以上		600 以上
650 以上		650 以上
700 以上		700 以上
750 以上		750 以上
800 以上		800 以上
850 以上		850 以上
900 以上		900 以上
1000 以上		1000 以上
1100 以上		1100 以上
1200 以上		1200 以上
1300 以上		1300 以上
1400 以上		1400 以上
1500 以上		1500 以上
1600 以上		1600 以上
1700 以上		1700 以上
1800 以上		1800 以上

【0620】

10

20

30

40

50

【表 5 7】

1900 以上		1900 以上
1200 以上		1200 以上
少なくとも 50、但し、反復要素を含むのに十分ではない長さ。		少なくとも 50、但し、反復要素を含むのに十分ではない長さ。
少なくとも 100、但し、反復要素を含むのに十分ではない長さ。		少なくとも 100、但し、反復要素を含むのに十分ではない長さ。
少なくとも 150、但し、反復要素を含むのに十分ではない長さ。		少なくとも 150、但し、反復要素を含むのに十分ではない長さ。
5~100 ヌクレオチド		5~ 100 ヌクレオチド
10~150 ヌクレオチド		10~150 ヌクレオチド
20~150 ヌクレオチド		20~150 ヌクレオチド
テンプレート構築物		

【0621】

遺伝子ターゲティングのための N H E J アプローチ

本明細書に記載されるように、ヌクレアーゼ誘導非相同末端結合（N H E J）を使用して、標的遺伝子特異的破壊（例えば、ノックアウト）を標的化することができる。ヌクレアーゼ誘導 N H E J はまた、対象遺伝子中の配列を除去する（例えば、欠失させる）のにも使用することができる。

【0622】

一実施形態では、本明細書に記載される方法に関連するゲノムの改変は、ヌクレアーゼ誘導 N H E J と、N H E J 修復経路の誤りがちな性質とに依存すると考えられる。N H E J は、2つの末端を共に連結することで、DNA 中の二本鎖切断を修復する；しかし、通常、元の配列は、それらが二本鎖切断によって形成された真にその通りの2つの適合性末端が、完璧にライゲートされた場合に限り、復元される。二本鎖切断の DNA 末端は、しばしば酵素的プロセッシングの対象であり、末端の再結合に先だって、片方または双方の鎖に、ヌクレオチドの付加または除去がもたらされる。これは、N H E J 修復部位における DNA 配列の挿入および／または欠失（インデル）変異の存在をもたらす。これらの変異の3分の2は、典型的に、読み枠を改変し、したがって、非機能性タンパク質が生じる。それに加えて、読み枠を維持するが、顕著な量の配列を挿入または欠失させる変異は、タンパク質の機能性を破壊し得る。タンパク質の重要な機能ドメインの変異は、重要でない領域の変異よりもおそらく許容性が低いので、これは遺伝子座依存性である。

【0623】

N H E J によって生成されるインデル変異は、自然界では予測不可能である；しかし、所与の切断部位では、おそらく小規模なマイクロホモロジー領域のために、特定のインデル配列が好まれ、母集団中で大きな比率を占める。欠失物の長さは、幅広く変動し得て；最も一般的には、1~50bp の範囲であるが、それらは100~200bp を超える範囲に達し得る。挿入物はより短い傾向があり、多くの場合、切断部位に隣接して取り囲む配列の短い重複を含む。しかし、大きな挿入物を得ることが可能であり、こうした場合、挿入配列は、ゲノムのその他の領域に、または細胞内に存在するプラスミド DNA にトランスされていることが多い。

【0624】

N H E J は、変異原性過程であるので、特定の最終配列の生成が要求されない限り、こ

れは、小規模な配列モチーフ（例えば、長さ50ヌクレオチド以下のモチーフ）を欠失させるのにも使用することができる。二本鎖切断が、標的配列の近くで標的化される場合、NHEJ修復によって引き起こされる欠失変異は、不要のヌクレオチドに及ぶことから、それらを除く。より大型のDNAセグメントの欠失の場合には、配列の両側に1つずつ2つの二本鎖切断を導入することにより、介在配列全体が除去され、末端同士の間でNHEJがもたらされ得る。このようにして、数百キロベースという大型のDNAセグメントを切断することができる。これらのアプローチの双方を使用して、特定のDNA配列が欠失され得る；しかし、NHEJの誤りがちな性質は、修復部位に依然としてインデル変異を生成し得る。

【0625】

二本鎖切断eCas9分子と、一本鎖、またはニッカーゼ、eCas9分子との双方を本明細書に記載される方法および組成物で使用する、NHEJ媒介インデルが生成され得る。例えば、対象遺伝子の早期コード領域のようなコード領域などの遺伝子に標的化されるNHEJ媒介インデルを使用して、対象遺伝子がノックアウト（すなわち発現排除）され得る。例えば、対象遺伝子の早期コード領域は、コード配列の第1のエクソン内の、または開始コドンの500bp以内（例えば、500、450、400、350、300、250、200、150、100または50bp未満）の開始コドン直後の配列を含む。

【0626】

標的位置に対する二本鎖または一本鎖切断の配置

NHEJ媒介インデルを誘導する目的で、gRNAおよびCas9ヌクレアーゼが二本鎖切断を生じる一実施形態では、例えば、単分子（またはキメラ）またはモジュラーgRNA分子などのgRNAが、1つの二本鎖切断を標的位置のヌクレオチド近傍に配置させるように構成される。一実施形態では、切断部位は、標的位置から0～30bp（例えば、標的位置から30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1bp未満）離れている。

【0627】

NHEJ媒介インデルを誘導する目的でCas9ニッカーゼと複合体形成する2つのgRNAが、2つの一本鎖切断を誘導する一実施形態では、例えば、独立して、単分子（またはキメラ）またはモジュラーgRNAである2つのgRNAが、標的位置のヌクレオチドにNHEJ修復を提供するように、2つの一本鎖切断を配置させるように構成される。一実施形態では、gRNAは、切断を異なる鎖上の同一位置に、または互いに少数のヌクレオチド以内に、配置させるように構成されて、二本鎖切断が本質的に模倣される。特定の実施形態では、より近いニックは、標的位置から0～30bp（例えば、標的位置から30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1bp未満）離れており、2つのニックは、互いに25～55bp以内（例えば、25～50、25～45、25～40、25～35、25～30、50～55、45～55、40～55、35～55、30～55、30～50、35～50、40～50、45～50、35～45、または40～45bp）であり、互いに100bp以下（例えば、90、80、70、60、50、40、30、20または10bp以下）離れている。一実施形態では、gRNAは、一本鎖切断を標的位置のヌクレオチドのどちらかの側に配置させるように構成される。

【0628】

二本鎖切断eCas9分子と、一本鎖、またはニッカーゼ、eCas9分子との双方を本明細書に記載される方法および組成物で使用する、標的位置の両側に切断が生成され得る。二本鎖または対形成一本鎖切断は、標的位置の両側に生成されて、2つの切断で核酸配列が除去されてもよい（例えば、2つの切断間の領域が欠失される）。一実施形態では、例えば、独立して、単分子（またはキメラ）またはモジュラーgRNAである2つのgRNAは、二本鎖切断を標的位置の両側に配置させるように構成される。代替の実施形態では、例えば、独立して、単分子（またはキメラ）またはモジュラーgRNAである

10

20

30

40

50

3つのgRNAは、二本鎖切断（すなわち、1つのgRNAがCas9ヌクレアーゼと複合体形成する）と、2つの一本鎖切断または対の一本鎖切断（すなわち、2つのgRNAがCas9ニッカーゼと複合体形成する）とが、標的位置の両側に配置されるように構成される。別の実施形態では、例えば、独立して、単分子（またはキメラ）またはモジュラーgRNAである4つのgRNAは、2対の一本鎖切断（すなわち、2対の2つのgRNAがCas9ニッカーゼと複合体形成する）が、標的位置の両側に生じるように構成される。二本鎖切断、または対の2つの一本鎖ニックのより近い方は、理想的には、標的位置の0～500bp以内（例えば、標的位置から450、400、350、300、250、200、150、100、50または25bp以下）にある。ニッカーゼが使用される場合、対の2つのニックは、互いに25～55bp以内（例えば、25～50、25～45、25～40、25～35、25～30、50～55、45～55、40～55、35～55、30～55、30～50、35～50、40～50、45～50、35～45、または40～45bpの間）であり、互いに100bp以下（例えば、90、80、70、60、50、40、30、20または10bp以下）離れている。

【0629】

標的化ノックダウン

遺伝子をDNAレベルで変異させることで発現を恒久的に排除するCRISPR/Cas媒介遺伝子ノックアウトとは異なり、CRISPR/Casノックダウンは、人工転写因子の使用を通じて、一時的な遺伝子発現低下を可能にする。Cas9タンパク質の双方のDNA切断ドメインで重要な残基を変異させることは（例えば、D10AおよびH840A変異）、触媒能のないCas9（死滅Cas9またはdCas9分子としてもまた知られているeCas9）の生成をもたらす。触媒能のないCas9はgRNAと複合体形成して、gRNAの標的化ドメインによって特定化されたDNA配列に局在するが、それは標的DNAを切断しない。dCas9と、例えば、転写抑制ドメインなどのエフェクタードメインとの融合は、gRNAによって特定化された任意のDNA部位へのエフェクターの動員を可能にする。酵素的に活性な（eCas9）Cas9分子それ自体は、コード配列中の早期領域に動員された場合に、転写をブロックすることができるが、より堅固な抑制は、転写抑制ドメイン（例えばKRAB、SIDまたはERD）をCas9に融合させて、転写抑制ドメインを、標的ノックダウン位置、例えば、開始コドンの配列3'の1000塩基対または遺伝子の開始コドンのプロモーター領域5'の500塩基対内に動員することによって達成され得る。プロモーターのDNase I高感受性領域（DHS）は、Cas9タンパク質にアクセスできる可能性が高く、また内在性転写因子のための部位を保有する可能性も高いので、これらの領域を標的化することで、恐らくより効率的な遺伝子抑制または活性化がもたらされ得る。特に遺伝子抑制については、内在性転写因子の結合部位をブロックすることで、遺伝子発現の下方制御を助けることが、本明細書で検討される。一実施形態では、1つまたは複数の内在性転写因子の結合をブロックするために、1つまたは複数のeCas9分子を用いてもよい。別の実施形態では、eCas9分子をクロマチン改変タンパク質に融合させてもよい。改変クロマチン状態は、標的遺伝子の発現低下をもたらす得る。クロマチン状態を改変するために、1つまたは複数のクロマチン改変タンパク質に融合した1つまたは複数のeCas9分子を用いてもよい。

【0630】

一実施形態では、gRNA分子は、既知の転写応答要素（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）に、既知の上流活性化配列（UAS）に、および／または標的DNAの発現を調節できることが疑われる未知のまたは既知の機能がある配列に、標的化され得る。

【0631】

CRISPR/Cas媒介遺伝子ノックダウンを使用して、望まれない対立遺伝子または転写物の発現を低下させ得る。本明細書で検討されるのは、遺伝子の恒久的な破壊が、理想的でない筋書きである。これらの筋書きでは、部位特異的抑制を使用して、発現が一時的に低下または排除されてもよい。ヌクレアーゼが任意のDNA配列を切断して変異を引き起こし得るのに対し、Casリプレッサーは、活発に転写される遺伝子のプロモータ

一領域に標的化された場合にのみ効果を有してもよいので、C a s リプレッサーのオフターゲット効果が、C a s ヌクレアーゼのものよりも重篤性が低いこともまた本明細書で検討される。しかし、ヌクレアーゼ媒介ノックアウトが恒久的である一方で、抑制は、C a s リプレッサーが細胞内に存在する場合に限り持続してもよい。リプレッサーがもはや存在しなくなると、内在性転写因子および遺伝子制御要素は、発現をその天然状態に復元する可能性が高い。

【0632】

一本鎖アニーリング

一本鎖アニーリング (SSA) は、標的核酸中に存在する2つの反復配列間の二本鎖切断を修復する、別のDNA修復プロセスである。SSA経路によって使用される反復配列は、一般に30ヌクレオチド長を超える。切断末端に切除が生じて、標的核酸の双方の鎖上の反復配列が示される。切除後、反復配列を含有する一本鎖オーバーハングをRPAタンパク質で被覆して、反復配列が、例えばそれ自体などと不適切にアニーリングするのを妨げる。RAD52は、オーバーハング上の反復配列のそれぞれと結合し、配列を整列させて、相補的反復配列のアニーリングを可能にする。アニーリング後、オーバーハングの一本鎖フラップは切断される。新しいDNA合成があらゆるギャップを充填し、ライゲーションがDNA二本鎖を回復させる。プロセッシングの結果として、2つの反復間のDNA配列が欠失する。欠失の長さは、使用される2つの反復の位置、および切除の経路または処理能力をはじめとする、多くの要素に左右され得る。

【0633】

HDR経路とは対照的に、SSAは、標的核酸配列を改変または修正するのにテンプレート核酸を必要としない。それに代えて、相補的反復配列が使用される。

【0634】

その他のDNA修復経路

SSBR (一本鎖切断修復)

ゲノム内の一本鎖切断 (SSB) は、上で論じたDSB修復機序とは別個の機序であるSSBR経路によって修復される。SSBR経路は、SSB検出、DNA末端プロセッシング、DNAギャップ充填、およびDNAライゲーションの4つの主要な段階を有する。より詳細な説明は、Caldecott, Nature Reviews Genetics 9, 619-631 (August 2008)に記載され、概要は本明細書に記載される。

【0635】

SSBが形成する第1段階では、PARP1および／またはPARP2は、切断を認識して修復機構を動員する。DNA切断におけるPARP1の結合および活性は一過性であり、損傷におけるSSBRタンパク質複合体の巢状滞留または安定性を促進することで、SSBRを加速するようである。議論の余地はあるが、これらのSSBRタンパク質中で最重要であるのはXRCC1であり、これは、DNAの3'および5'末端のクリーニングに参与するタンパク質をはじめとする、SSBRプロセスの複数の酵素的構成要素と相互作用して、安定化し刺激する分子スキャフォールドとして機能する。例えば、XRCC1は、末端プロセッシングを促進するいくつかのタンパク質 (DNAポリメラーゼβ、PNK、および3つのヌクレアーゼ、APE1、APTX、およびAPLF) と相互作用する。APE1は、エンドヌクレアーゼ活性を有する。APLFは、エンドヌクレアーゼおよび3'から5'方向エキソヌクレアーゼ機能を示す。APTXは、エンドヌクレアーゼおよび3'から5'方向エキソヌクレアーゼ活性を有する。

【0636】

全部ではないとしても大多数のSSBの3'および／または5'末端は損傷を受けているため、この末端プロセッシングはSSBRの重要な段階である。末端プロセッシングは、一般に、末端がライゲーションできるように、損傷を受けた3'末端をヒドロキシル化状態に回復させ、および／または損傷を受けた5'末端をリン酸部分に、回復させることを伴う。損傷を受けた3'末端をプロセスできる酵素としては、PNKP、APE1、およ

10

20

30

40

50

びTDP1が挙げられる。損傷を受けた5'末端をプロセスできる酵素としては、PNKP、DNAポリメラーゼβ、およびAPTXが挙げられる。LIG3（DNAリガーゼIII）はまた、末端プロセッシングにも関与する。ひとたび末端がクリーニングされたら、ギャップ充填が起こり得る。

【0637】

DNAギャップ充填段階では、典型的に存在するタンパク質は、PARP1、DNAポリメラーゼβ、XRCC1、FEN1（フラップエンドヌクレアーゼ（endonuclease）1）、DNAポリメラーゼδ/ε、PCNA、およびLIG1である。短いパッチ修復および長いパッチ修復の2つのギャップ充填様式がある。短いパッチ修復は、欠損している単一ヌクレオチドを挿入することを伴う。いくつかのSSBでは、「ギャップ充填」は、2つ以上のヌクレオチドを転置し続けるかもしれない（最高12塩基の転置が報告されている）。FEN1は、転置された5'残基を除去するエンドヌクレアーゼである。Polβをはじめとする複数のDNAポリメラーゼは、SSBの修復に関与し、DNAポリメラーゼの選択は、SSBの起源とタイプによって影響を受ける。

【0638】

第4段階では、LIG1（リガーゼI）またはLIG3（リガーゼIII）などのDNAリガーゼが、末端の連結を触媒する。短いパッチ修復はリガーゼIIIを利用して、長いパッチ修復はリガーゼIを利用する。

【0639】

時に、SSBRは、複製に共役する。この経路には、CtIP、MRN、XRCC1、およびFEN1の1つまたは複数に関与し得る。SSBRを促進してもよい追加的要素としては、aPARP、PARP1、PARP2、PARG、XRCC1、DNAポリメラーゼb、DNAポリメラーゼd、DNAポリメラーゼe、PCNA、LIG1、PNK、PNKP、APE1、APTX、APLF、TDP1、LIG3、FEN1、CtIP、MRN、およびXRCC1が挙げられる。

【0640】

MMR（ミスマッチ修復）

細胞は、MMR、BER、およびNERの3つの切除修復経路を包含する：切除修復経路は、典型的に、DNAの1本鎖上の損傷を認識して、次にエキソ/エンドヌクレアーゼが損傷を除去し、DNAポリメラーゼによって順次充填され、最終的にリガーゼによってシールされる、1〜30ヌクレオチドのギャップを残すという共通の特徴を有する。より詳細な全体像は、Li, Cell Research (2008) 18:85-98に記載され、概要は、本明細書で提供される。

【0641】

ミスマッチ修復（MMR）は、誤対合DNA塩基上で機能する。

【0642】

MSH2/6またはMSH2/3複合体は、どちらもミスマッチ認識および修復開始に重要な役割を果たすATPアーゼ活性を有する。MSH2/6が、塩基-塩基ミスマッチを優先的に認識して、1または2ヌクレオチドの誤対合を同定する一方で、MSH2/3は、より大型のID誤対合を優先的に認識する。

【0643】

hMLH1は、hPMS2とヘテロ二量体化して、ATPアーゼ活性を有しMMRの複数の段階で重要であるhMutLαを形成する。これは、EXO1が関与する3'ニック誘導MMRにおいて重要な役割を果たす、PCNA/複製因子C（RFC）依存性エンドヌクレアーゼ活性を有する。（EXO1は、HRおよびMMRの双方に参加する。）これは、ミスマッチが誘発する切除の終了を制御する。リガーゼIは、この経路の関連リガーゼである。MMRを促進してもよい追加的要素としては、EXO1、MSH2、MSH3、MSH6、MLH1、PMS2、MLH3、DNA Pol δ、RPA、HMGB1、RFC、およびDNAリガーゼIが挙げられる。

【0644】

10

20

30

40

50

塩基切除修復 (BER)

塩基切除修復 (BER) 経路は、細胞周期全体を通じて活性であり；それは、ゲノムからの小型非らせん歪み塩基損傷を除去する主な原因となる。対照的に、関連ヌクレオチド切除修復経路 (次のセクションで考察される) は、嵩高いらせん歪み損傷を修復する。より詳細な説明は、Caldecott, Nature Reviews Genetics 9, 619–631 (August 2008) に記載され、概要は本明細書に記載される。

【0645】

DNA 塩基損傷に際して、塩基切除修復 (BER) が開始されて、プロセスは、5つの主要な段階に簡略化され得る：(a) 損傷を受けたDNA塩基の除去；(b) 後続の塩基部位の切開；(c) DNA末端のクリーンアップ；(d) 修復ギャップ内への修正ヌクレオチド挿入；および(e) DNA骨格内の残りのニックのライゲーション。これらの最終段階は、SSBRと類似する。

【0646】

第1段階では、損傷特異的DNAグリコシラーゼが、塩基を糖リン酸骨格に結合するNグリコシド連結の切断を通じて、損傷を受けた塩基を切除する。次に、関連リアーゼ活性があるAPE1ヌクレアーゼー1 (APE1) または二機能性DNAグリコシラーゼがリン酸ジエステル骨格を切開して、DNA一本鎖切断 (SSB) を生じた。BERの第3段階は、DNA末端のクリーンアップを伴う。BERの第4段階は、新規相補的ヌクレオチドを修復ギャップ内に付加するPol β によって実施され、最終段階で、XRCC1 / リガーゼIIIがDNA骨格内の残りのニックをシールする。これで、損傷を受けたDNA塩基の大部分 (約80%) が修復される、短いパッチBER経路が完了する。しかし、段階3の5'末端が、末端プロセッシング活性に対して抵抗性であれば、Pol β による1個のヌクレオチド挿入に続いて、ポリメラーゼは複製的DNAポリメラーゼであるPol δ / ϵ に切り替わり、次にそれは、DNA修復ギャップに約2~8個のヌクレオチドを付加する。これは、5'フラップ構造を作り出し、それは、処理能力要素である増殖性細胞核抗原 (PCNA) に結合する、フラップエンドヌクレアーゼー1 (FEN-1) によって認識され切除される。次にDNAリガーゼIが、DNA骨格内の残りのニックをシールして、長いパッチBERを完了する。BER経路を促進してもよい追加的要素としては、DNAグリコシラーゼ、APE1、Pol β 、Pol δ 、Pol ϵ 、XRCC1、リガーゼIII、FEN-1、PCNA、RECQL4、WRN、MYH、PNKP、およびAPTXが挙げられる。

【0647】

ヌクレオチド切除修復 (NER)

ヌクレオチド切除修復 (NER) は、DNAから嵩高いらせん歪み損傷を除去する重要な切除機序である。NERに関する加的な詳細は、Marteijn et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology 15, 465–481 (2014) にあり、概要は本明細書に記載される。広域経路NERは、2つのより小型の経路である、全ゲノムNER (GG-NER) と、転写と共役する修復NER (TC-NER) とを包含する。GG-NERおよびTC-NERは、DNA損傷を認識するために異なる要素を使用する。しかし、それらは、損傷切開、修復、およびライゲーションのための同一機構を利用する。

【0648】

ひとたび障害が認識されたら、細胞は、損傷を含有する短い一本鎖DNA断片を除去する。エンドヌクレアーゼXPF / ERCC1およびXPG (ERCC5によってコードされる) は、損傷のどちらかの側で損傷を受けた鎖を切断し、22~30ヌクレオチドの一本鎖ギャップを生成することで、損傷を除去する。次に、細胞は、DNAギャップ充填合成およびライゲーションを実行するこのプロセスに関与するのは、PCNA、RFC、DNA Pol δ 、DNA Pol ϵ またはDNA Pol κ 、およびDNAリガーゼIまたはXRCC1 / リガーゼIIIである。ライゲーションステップの実行のために、自己複

10

20

30

40

50

製細胞が、DNA Pol ϵ および DNA リガーゼ I を利用する傾向がある一方で、非自己複製細胞は、DNA Pol δ 、DNA Pol κ 、および the XRCC1 / リガーゼ III 複合体を利用する傾向がある。

【0649】

NER は、XPA-G、POLH、XPF、ERCC1、XPA-G、および LIG1 の要素を伴い得る。転写共役 NER (TC-NER) は、CSA、CSB、XPB、XPD、XPG、ERCC1、および TTDA の要素を伴い得る。NER 修復経路を促進してもよい追加的要素としては、XPA-G、POLH、XPF、ERCC1、XPA-G、LIG1、CSA、CSB、XPA、XPB、XPC、XPD、XPF、XPG、TTDA、UVSSA、USP7、CETN2、RAD23B、UV-DDB、CAK 部分複合体、RPA、および PCNA が挙げられる。

10

【0650】

鎖間架橋 (ICL)

ICL 修復経路と称される専用経路が、鎖間架橋を修復する。異なる DNA 鎖中の塩基間の鎖間架橋、または共有結合架橋が、複製または転写中に起こり得る。ICL 修復は、具体的には、核酸分解活性、損傷乗り越え合成 (TLS)、および HDR である、複数の修復プロセスの協調を伴う。ヌクレアーゼが、架橋塩基のどちらかの側の ICL を切除するように動員される一方で、TLS および HDR は、協調して切断された鎖を修復する。ICL 修復は、以下の要素を伴い得る：例えば、XPF および RAD51C などのエンドヌクレアーゼ、RAD51 などのエンドヌクレアーゼ、例えば、DNA ポリメラーゼ γ および Rev1 などの損傷乗り越えポリメラーゼ、および例えば、FancJ などのファンコーニ貧血 (FA) タンパク質。

20

【0651】

その他の経路

哺乳類には、いくつかのその他の DNA 修復経路が存在する。

【0652】

損傷乗り越え合成 (TLS) は、欠陥複製事象後に残される一本鎖切断の修復経路であり、例えば、DNA pol ζ および Rev1 などの損傷乗り越えポリメラーゼが関与する。

【0653】

誤りのない複製後修復 (PRR) は、欠陥複製事象後に残される一本鎖切断修復の別の経路である。

30

【0654】

VI. 標的細胞

Cas9 分子、gRNA 分子 (例えば、Cas9 分子 / gRNA 分子複合体など) および任意選択的にドナーテンプレート核酸を使用して、例えば、多種多様な細胞内で標的核酸を編集するなど、細胞を操作することができる。

【0655】

一実施形態では、細胞は、標的遺伝子を編集することによって、例えば、標的遺伝子のノックアウトにより、操作される。別の実施形態では、細胞は、標的遺伝子を編集することによって、例えば、標的遺伝子中の変異を修正することにより、操作される。また別の実施形態では、細胞は、標的遺伝子の発現を調節することによって、例えば、標的遺伝子のノックダウンまたは活性化により、操作される。さらにまた別の実施形態では、細胞は、遺伝子を導入することによって、例えば、遺伝子、例えば、標的化された遺伝子座のノックインにより、操作される。一実施形態では、細胞は、生体外で操作される。別の実施形態では、細胞は、生体内で操作される。

40

【0656】

本明細書に記載される Cas9、gRNA、および任意選択的にドナーテンプレート核酸分子は、標的細胞に送達することができる。一実施形態では、標的細胞は、循環血球、例えば、網状赤血球、骨髓系前駆細胞、リンパ球系前駆細胞、造血幹 / 前駆細胞、または

50

内皮細胞である。一実施形態では、標的細胞は、骨髓細胞（例えば、骨髓系前駆細胞、例えば、リンパ球系前駆細胞、例えば、赤血球系前駆細胞、例えば、造血幹／前駆細胞、例えば、内皮細胞、例えば、間葉系幹細胞）である。一実施形態では、標的細胞は、骨髓系前駆細胞（例えば、骨髓球性共通前駆細胞（CMP）または顆粒球マクロファージ前駆（GMP）細胞）である。一実施形態では、標的細胞は、リンパ球系前駆細胞、例えば、リンパ球系共通前駆細胞（CLP）である。一実施形態では、標的細胞は、赤血球系前駆細胞（例えば、巨核球・赤芽球前駆（MEP）細胞）である。一実施形態では、標的細胞は、造血幹／前駆細胞（例えば、長期造血幹／前駆細胞（LT-HSPC）、短期造血幹／前駆細胞（ST-HSPC）、複能性前駆（MPP）細胞、系列特異的前駆（LRP）細胞）である。一実施形態では、標的細胞は、CD34⁺細胞、CD34⁺CD90⁺細胞、CD34⁺CD38⁻細胞、CD34⁺CD90⁺CD49f⁺CD38⁻CD45RA⁻細胞、CD105⁺細胞、CD31⁺、またはCD133⁺細胞である。一実施形態では、標的細胞は、臍帯血CD34⁺HSPC、臍帯静脈内皮細胞、臍帯動脈内皮細胞、羊水CD34⁺細胞、羊水内皮細胞、胎盤内皮細胞または胎盤造血CD34⁺細胞である。一実施形態では、標的細胞は、動員末梢血造血CD34⁺細胞（動員剤、例えば、G-CSFまたはPlerixaforで患者が処置された後）である。一実施形態では、標的細胞は、末梢血内皮細胞である。

【0657】

一実施形態では、標的細胞は、生体外で操作された後、対象に投与される。生体外操作のための標的細胞の起源としては、例えば、対象の血液、対象の臍帯血、または対象の骨髓が挙げられる。さらに、生体外操作のための標的細胞の起源として、例えば、異種ドナー血液、臍帯血、または骨髓も挙げられる。

【0658】

一実施形態では、骨髓系前駆細胞が対象から採取され、前述のように生体外で操作された後、この骨髓系前駆細胞は対象に戻される。一実施形態では、赤血球系前駆細胞が対象から採取され、前述のように生体外で操作された後、この赤血球系前駆細胞は対象に戻される。一実施形態では、リンパ球系前駆細胞が対象から採取され、前述のように生体外で操作された後、このリンパ球系前駆細胞は対象に戻される。一実施形態では、複能性前駆細胞が対象から採取され、前述のように生体外で操作された後、この造血幹細胞は対象に戻される。一実施形態では、造血幹／前駆細胞が対象から採取され、前述のように生体外で操作された後、この造血幹／前駆細胞は対象に戻される。一実施形態では、CD34⁺造血幹細胞が対象から採取され、前述のように生体外で操作された後、このCD34⁺造血幹／前駆細胞は対象に戻される。

【0659】

好適な細胞としては、例えば、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、および間葉系幹細胞などの幹細胞が挙げられる。一実施形態では、細胞は、人工多能性幹（iPS）細胞またはiPS細胞由来の細胞、例えば、対象から作製されるiPS細胞であり、これらは、変異を誘導するために修飾されて、骨髓系前駆細胞、リンパ球系前駆細胞、赤血球系前駆細胞、複能性前駆細胞、または造血幹／前駆細胞などの臨床的に重要な細胞に分化される。また、好適な細胞には、造血幹細胞に分化される内皮細胞または羊膜細胞も含まれ得る。

【0660】

一実施形態では、ウイルスベクターを用いて、標的細胞に形質導入する。一実施形態では、AAV（例えば、AAV6およびAAVDJ）を標的細胞に形質導入する。一実施形態では、レンチウイルスベクターまたは組み込み欠陥レンチウイルスベクターを用いて、標的細胞に形質導入する。一実施形態では、リボ核酸（例えば、gRNA分子およびCas9分子をコードするmRNA）を用いて、標的細胞を形質移入する。一実施形態では、タンパク質（例えば、Cas9分子）およびリボ核酸（例えば、gRNA分子）を用いて、標的細胞を形質移入する。一実施形態では、リボ核酸タンパク質複合体（例えば、Cas9分子／gRNA分子複合体）を用いて、標的細胞を形質移入する。一実施形態では、デ

オキシリボ核酸（例えば、gRNA分子、Cas9分子、または双方をコードするDNA）を用いて、標的細胞を形質移入する。

【0661】

本明細書に記載される方法により生成される細胞は即座に使用してもよい。あるいは、細胞を凍結し（例えば、液体窒素で）、後の使用まで保存してもよい。細胞は、通常、10%ジメチルスルホキシド（DMSO）、50%血清、40%緩衝培地、またはそのような凍結温度で細胞を保存するために当該技術分野で一般に用いられている溶液などいずれか他の溶液中で凍結され、凍結培養細胞を解凍するために当該技術分野で公知の方法で解凍される。また、細胞は、長期保存のために熱安定化（例えば、4℃で）してもよい。

【0662】

VII. 送達、製剤化および投与経路

例えば、Cas9分子、gRNA分子（例えば、Cas9分子／gRNA分子複合体）などの構成要素、ならびに供与体テンプレート核酸、または3つ全ては、多様な形態で送達、製剤化、または投与することができ、例えば、表19および20を参照されたい。一実施形態では、1つのCas9分子と2つ以上（例えば、2、3、4、またはそれ以上）の異なるgRNA分子は、例えば、AAVベクターによって送達される。一実施形態では、Cas9分子をコードする配列と、2つ以上（例えば、2、3、4、またはそれ以上）の異なるgRNA分子をコードする配列は、同じ核酸分子、例えば、AAVベクター上に存在する。Cas9分子またはgRNA構成要素が送達され、DNAにコードされる場合、このDNAは、典型的に、発現を実施するための制御領域（例えば、プロモーターを含む）を含むであろう。Cas9分子配列に有用なプロモーターとしては、例えば、CMV、SFFV、EFS、EF-1a、PGK、CAG、およびCBHプロモーターが挙げられる。一実施形態では、プロモーターは、構成的プロモーターである。別の実施形態では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。gRNAの有用なプロモーターとしては、H1、EF-1a、U6、およびtRNAプロモーターが挙げられる。同様のまたは異なる強度を有するプロモーターを選択して、構成要素の発現を調整することができる。Cas9分子をコードする配列は、例えば、SV40NLSなどの核局在化シグナル（NLS）を含んでもよい。一実施形態では、Cas9分子をコードする配列は、少なくとも2つの核局在化シグナルを含む。一実施形態では、Cas9分子またはgRNA分子のプロモーターは、独立して、誘導性、組織特異的、または細胞特異的であってもよい。

【0663】

表19に、構成要素を製剤化、送達、または投与する方法の例を記載する。

【0664】

10

20

30

40

50

【表 5 8】

表 19

要素			
Cas9 分子	gRNA 分子	任意選択的 ドナー テンプレート 核酸	コメント
DNA	DNA	DNA	この実施形態では、典型的に eaCas9 分子である Cas9 分子、および gRNA が、DNA から転写される。この実施形態では、それらは別個の分子上でコードされる。この実施形態では、ドナーテンプレートは、別個の DNA 分子として提供される。
DNA	DNA		この実施形態では、典型的に eaCas9 分子である Cas9 分子、および gRNA が、DNA から転写される。この実施形態では、それらは別個の分子上でコードされる。この実施形態では、ドナーテンプレートは、gRNA をコードする同じ DNA 分子上に提供される。
DNA		DNA	この実施形態では、典型的に eaCas9 分子である Cas9 分子、および gRNA が、DNA から、ここでは、単一分子から転写される。この実施形態では、ドナーテンプレートは、別個の DNA 分子として提供される。

10

20

【 0 6 6 5 】

30

40

50

【表 5 9】

DNA	DNA	DNA	この実施形態では、典型的に eaCas9 分子である Cas9 分子、および gRNA が、DNA から転写される。この実施形態では、それらは別個の分子上でコードされる。この実施形態では、ドナーテンプレートは、Cas9 をコードする同じ DNA 分子上に提供される。
DNA	RNA	DNA	この実施形態では、典型的に eaCas9 分子である Cas9 分子が、DNA から転写され、gRNA が、インビトロ転写または合成 RNA として提供される。この実施形態では、ドナーテンプレートは、別個の DNA 分子として提供される。
DNA	RNA	DNA	この実施形態では、典型的に eaCas9 分子である Cas9 分子が、DNA から転写され、gRNA が、インビトロ転写または合成 RNA として提供される。この実施形態では、ドナーテンプレートは、Cas9 をコードする同じ DNA 分子上に提供される。
mRNA	RNA	DNA	この実施形態では、典型的に eaCas9 分子である Cas9 分子が、インビトロ転写 mRNA から翻訳され、gRNA が、インビトロ転写または合成 RNA として提供される。この実施形態では、ドナーテンプレートが、DNA 分子として提供される。
mRNA	DNA	DNA	この実施形態では、典型的に eaCas9 分子である Cas9 分子が、インビトロ転写 mRNA から翻訳され、gRNA が、DNA から転写される。この実施形態では、ドナーテンプレートは、別個の DNA 分子として提供される。
mRNA	DNA		この実施形態では、典型的に eaCas9 分子である Cas9 分子が、インビトロ転写 mRNA から翻訳され、gRNA が、DNA から転写される。この実施形態では、ドナーテンプレートは、gRNA をコードする同じ DNA 分子上に提供される。
タンパク質	DNA	DNA	この実施形態では、典型的に eaCas9 分子である Cas9 分子が、タンパク質として提供され、gRNA が、DNA から転写される。この実施形態では、ドナーテンプレートが、別個の DNA 分子として提供される。
タンパク質	DNA		この実施形態では、典型的に eaCas9 分子である Cas9 分子が、タンパク質として提供され、gRNA が、DNA から転写される。この実施形態では、ドナーテンプレートは、gRNA をコードする同じ DNA 分子上に提供される。
タンパク質	RNA	DNA	この実施形態では、eaCas9 分子が、タンパク質として提供され、gRNA が、転写または合成 RNA として提供される。この実施形態では、ドナーテンプレートは、DNA 分子として提供される。

【0666】

表 20 は、例えば、本明細書に記載されるような Cas9 分子構成要素および gRNA 分子構成要素などの Cas システム構成要素の様々な送達方法を要約する。

【0667】

10

20

30

40

50

【表 6 0】

表 20

送達ベクター/様式		非分裂細胞内への送達	発現持続期間	ゲノム組み込み	送達される分子タイプ
物理的(例えば、電気穿孔、粒子銃、リン酸カルシウム移入、細胞圧縮または圧搾)		あり	一過性	なし	核酸およびタンパク質
ウイルス	レトロウイルス	なし	安定	あり	RNA
	レンチウイルス	あり	安定	あり/なし、修飾あり	RNA
	アデノウイルス	あり	一過性	なし	DNA
	アデノ随伴ウイルス(AAV)	あり	安定	なし	DNA
	ワクシニアウイルス	あり	高度に一過性	なし	DNA
	単純ヘルペスウイルス	あり	安定	なし	DNA
非ウイルス	カチオン性リポソーム	あり	一過性	送達物次第	核酸およびタンパク質
	ポリマーナノ粒子	あり	一過性	送達物次第	核酸およびタンパク質
生物学的非ウイルス送達 ビヒクル	弱毒型細菌	あり	一過性	なし	核酸
	遺伝子操作バクテリオファージ	あり	一過性	なし	核酸
	哺乳類ウイルス様粒子	あり	一過性	なし	核酸
	生物学的リポソーム: 赤血球ゴーストおよびエキソソーム	あり	一過性	なし	核酸

【0668】

Cas9分子およびもしくは1つまたは複数のgRNA分子のDNAベースの送達

Cas9分子(例えば、easCas9分子)、gRNA分子をコードする核酸、供与体テンプレート核酸、またはそれら(例えば、2つもしくは全て)の任意の組み合わせは、当該技術分野で周知の方法によって、または本明細書に記載されるようにして、対象に、または細胞内に送達することができる。例えば、Cas9をコードするおよび／またはgRNAをコードするDNA、ならびに供与体テンプレート核酸は、例えば、ベクター(例えば、ウイルスまたは非ウイルスベクター)、非ベクターベースの方法(例えば、裸のDNAまたはDNA複合体を使用して)、またはそれらの組み合わせによって、送達することができる。

【0669】

Cas9分子(例えば、easCas9分子)および／またはgRNA分子をコードする核酸は、標的細胞(例えば、肝細胞)による取り込みを促進する分子(例えば、N-アセチルガラクトサミン)と共役させることができる。供与体テンプレート分子も、標的細胞(例えば、肝細胞)による取り込みを促進する分子(例えば、N-アセチルガラクトサミン)と共役させることができる。

【0670】

いくつかの実施形態では、C a s 9 および／または g R N A をコードする D N A は、ベクター（例えば、ウイルスベクター／ウイルスまたはプラスミド）によって送達される。

【0671】

ベクターは、C a s 9 分子および／もしくは g R N A 分子をコードする配列を含み得る。

【0672】

ベクターはまた、例えば、C a s 9 分子配列と融合した、（例えば、核局在化、核小体局在化、またはミトコンドリア局在化のための）シグナルペプチドをコードする配列を含んでもよい。例えば、ベクターは、C a s 9 分子をコードする配列に融合された、核局在化配列（例えば、S V 4 0 からの）を含み得る。

【0673】

例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、ポリアデニル化シグナル、コザックコンセンサス配列、内部リボソーム侵入部位（I R E S）などの1つまたは複数の調節的／制御要素が、ベクターに包含され得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、R N A ポリメラーゼ I I（例えば、C M V プロモーター）によって認識される。別の実施形態では、プロモーターは、R N A ポリメラーゼ I I I（例えば、U 6 プロモーター）によって認識される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、調節されるプロモーター（例えば、誘導性プロモーター）である。別の実施形態では、プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ウイルスプロモーターである。他の実施形態では、プロモーターは、非ウイルスプロモーターである。

【0674】

いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクター（例えば、組換えウイルス生成のための）である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、D N A ウイルス（例えば、d s D N A または s s D N A ウイルス）である。他の実施形態では、ウイルスは、R N A ウイルス（例えば、s s R N A ウイルス）である。いくつかの実施形態では、ウイルスは、分裂細胞に感染する。他の実施形態では、ウイルスは、非分裂細胞に感染する。代表的なウイルスベクター／ウイルスとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（A A V）、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、および単純ヘルペスウイルスが挙げられる。

【0675】

いくつかの実施形態では、ウイルスは、分裂および非分裂細胞の双方に感染する。いくつかの実施形態では、ウイルスは、宿主ゲノムに組み込まれ得る。いくつかの実施形態では、ウイルスは、例えば、ヒトにおいて免疫低下を有するように改変される。他の実施形態では、ウイルスは、複製能力がある。別の実施形態では、ウイルスは複製欠陥であり、例えば、ビリオン複製および／またはパッケージングの追加的なラウンドに必要な遺伝子のための1つまたは複数のコード領域が、その他の遺伝子で置換されまたは欠失される。いくつかの実施形態では、ウイルスは、C a s 9 分子および／または g R N A 分子の一過性の発現を引き起こす。他の実施形態では、ウイルスは、C a s 9 分子および／または g R N A 分子の例えば、少なくとも1週間、2週間、1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、6ヶ月間、9ヶ月間、1年間、2年間、または恒久的などの持続性の発現を引き起こす。ウイルスのパッケージング容量は、例えば、少なくとも約4 k b～少なくとも約30 k b、例えば、少なくとも約5 k b、10 k b、15 k b、20 k b、25 k b、30 k b、35 k b、40 k b、45 k b、または50 k bなどで変動してもよい。

【0676】

一実施形態では、ウイルスベクターは、特定の細胞型または組織を認識する。例えば、ウイルスベクターは、異なる／代替ウイルスエンベロープ糖タンパク質でシュードタイプ化され；細胞型特異的受容体で改変され（例えば、ペプチドリガンド、一本鎖抗体、もしくは成長因子などの標的化リガンドを組み込むための1つまたは複数のウイルスエンベロープ糖タンパク質の遺伝子修飾）；および／または一端がウイルス糖タンパク質を認識すると共に、他端が標的細胞表面の1部分（例えば、リガンドー受容体、モノクローナル抗

10

20

30

40

50

体、アビジン-ビオチンおよび化学共役)を認識する二重特異性を有する分子架橋を有するように改変され得る。

【0677】

代表的なウイルスベクター／ウイルスとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、および単純ヘルペスウイルスが挙げられる。

【0678】

代表的なウイルスベクター／ウイルスとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、および単純ヘルペスウイルスが挙げられる。

10

【0679】

一実施形態では、Cas9をコードする核酸配列および／またはgRNAをコードする核酸配列は、組換えレトロウイルスによって送達される。いくつかの実施形態では、レトロウイルス(例えば、モロニー(Mooney)マウス白血病ウイルス)は、例えば、宿主ゲノムへの組み込みを可能にするものなどの逆転写酵素を含む。いくつかの実施形態では、レトロウイルスは、複製能力がある。別の実施形態では、レトロウイルスは複製欠陥であり、例えば、ビリオン複製およびパッケージングの追加的なラウンドに必要な遺伝子のための1つまたは複数のコード領域が、その他の遺伝子で置換されるか、または欠失される。

【0680】

20

いくつかの実施形態では、Cas9をコードする核酸配列および／またはgRNAをコードする核酸配列は、組換えレンチウイルスによって送達される。一実施形態では、供与体テンプレート核酸は、組換えレンチウイルスによって送達される。例えば、レトロウイルスは、例えば、ウイルス複製に必要な1つまたは複数の遺伝子を含まないなど、複製欠陥である。

【0681】

一実施形態では、Cas9をコードする核酸配列および／またはgRNAをコードする核酸配列は、組換えレンチウイルスによって送達される。一実施形態では、ドナーテンプレート核酸は、組換えレンチウイルスによって送達される。例えば、レンチウイルスは、例えば、ウイルス複製に必要な1つまたは複数の遺伝子を含まないなど、複製欠陥である。

30

【0682】

一部の実施形態では、Cas9をコードする核酸配列および／またはgRNAをコードする核酸配列は、組換えアデノウイルスによって送達される。一実施形態では、ドナーテンプレート核酸は、組換えアデノウイルスによって送達される。一部の実施形態では、アデノウイルスは、ヒトにおける免疫を低下させるように改変される。

【0683】

一部の実施形態では、Cas9をコードする核酸配列および／またはgRNAをコードする核酸配列は、組換えAAVによって送達される。一実施形態では、供与体テンプレート核酸は、組換えAAVによって送達される。いくつかの実施形態では、AAVは、本明細書に記載されるような標的細胞などの宿主細胞のゲノムに、そのゲノムを組み込まない。いくつかの実施形態では、AAVは、そのゲノムを宿主細胞のゲノムに組み込み得る。いくつかの実施形態では、AAVは、例えば、共にアニールされて二本鎖DNAを形成する双方の鎖をパッケージするscAAVなどの、自己相補的アデノ随伴ウイルス(scAAV)である。

40

【0684】

一実施形態では、本明細書に記載される方法で用いることができるAAVキャプシドは、血清型:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh32/33、AAV.rh43、AAV.rh64R1、またはAAV7m8由来のキャプシド配列である。

50

【0685】

一実施形態では、Cas9をコードするDNAおよび／またはgRNAをコードするDNAは、例えば、血清型：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh32／33、AAV.rh43、またはAAV.rh64R1由来のキャプシド配列と50%以上、例えば、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、または95%以上の配列相同性を有する、再改変AAVキャプシドで送達される。

【0686】

一実施形態では、Cas9をコードするDNAおよび／またはgRNAをコードするDNAは、キメラAAVキャプシドによって送達される。一実施形態では、供与体テンプレート核酸は、キメラAAVキャプシドによって送達される。例示的なキメラAAVキャプシドとしては、限定はしないが、AAV9i1、AAV2i8、AAV-DJ、AAV2G9、AAV2i8G9、またはAAV8G9が挙げられる。

【0687】

一実施形態では、AAVは、例えば、共にアニールされて二本鎖DNAを形成する双方の鎖をパッケージするscAAVなどの、自己相補的アデノ随伴ウイルス（scAAV）である。

【0688】

一実施形態では、Cas9をコードするDNAおよび／またはgRNAをコードするDNAは、例えば、本明細書に記載されるウイルスの1つまたは複数のハイブリッドなどのハイブリッドウイルスによって送達される。一実施形態では、ハイブリッドウイルスは、ボカウイルス（Bocavirus）、B19ウイルス、ブタAAV、ガチョウAAV、ネコAAV、イヌAAV、またはMVMと、AAV（例えば、任意のAAV血清型の）とのハイブリッドである。

【0689】

パッケージング細胞が使用されて、標的細胞を感染させる能力があるウイルス粒子が形成される。このような細胞は、アデノウイルスをパッケージし得る293細胞、およびレトロウイルスをパッケージし得るψ2細胞またはPA317細胞が挙げられる。遺伝子治療で使用されるウイルスベクターは、通常は、核酸ベクターをウイルス粒子内にパッケージする産生細胞株によって生成される。ベクターは、典型的に、パッケージングと（適切な場合）引き続く宿主または標的細胞への組み込みに必要な最小のウイルス配列を含有し、その他のウイルス配列は、例えばCas9などの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。例えば、遺伝子治療で使用されるAAVベクターは、典型的に、パッケージングおよび宿主または標的細胞内の遺伝子発現に必要なAAVゲノムからの逆方向末端反復（ITR）配列のみを有する。欠損しているウイルス機能は、「Triple Transfection Protocol」に記載されているように、パッケージング細胞株および／またはアデノウイルス由来のE2A、E4、およびVA遺伝子を含有するプラスミド、ならびにAAV由来のRepおよびCap遺伝子をコードするプラスミドによってトランスで供給することができる。その後、ウイルスDNAは、他のAAV遺伝子、すなわちrepおよびcapをコードするが、ITR配列が欠如しているヘルパープラスミドを含有する、細胞株内にパッケージされる。実施形態では、ウイルスDNAは、アデノウイルス由来のE1Aおよび／またはE1B遺伝子を含有するプロドューサー細胞株にパッケージされる。細胞株はまた、ヘルパーとしてのアデノウイルスに感染する。ヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルスもしくはHSV）またはヘルパープラスミドは、AAVベクター複製と、ITRを有する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配列の欠如のために、顕著な量でパッケージされない。アデノウイルスの混入は、例えば、それに対してアデノウイルスがAAVよりも感受性が高い、加熱処理によって低下させ得る。

【0690】

一実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。一実施形態で

10

20

30

40

50

は、ウイルスベクターは、インテグラーゼ欠損型 S I N レンチウイルスである。一実施形態では、L V または I D L V を V S V - G エンベロープでシュードタイプ化する。遺伝子療法用の分裂および非分裂細胞を効率的に形質導入するための自己不活性化 (S I N) レンチウイルスベクター (L V) の使用は、例えば、S e g a l e t a l . , J B i o l C h e m . 2 0 0 4 ; 2 7 9 (1 5) : 1 4 5 0 9 - 1 4 5 1 9 に記載されている。H I V - 1 ベースのレンチウイルスベクターは、約 1 0 k b - 一本鎖陽性センス RNA ゲノムの 2 つのコピーを含む、複製能力のない包膜レトロウイルスである。様々なプラスミドの中からの構造タンパク質および酵素タンパク質をコードするウイルス遺伝子の分離、ならびに RNA ゲノムからの特定のアクセサリ遺伝子の排除によって、レンチウイルスベクターは、形質導入細胞内で複製することができなくなる (N a l d i n i e t a l . , C u r r . O p i n . B i o t e c h n o l . 1 9 9 8 ; 9 (5) : 4 5 7 - 4 6 3) 。一実施形態では、パッケージングシグナルは、トランスジーン発現カセットをコードする輸送ベクター (例えば、レシピエント内存性 H L A プロモーターにより調節されるレシピエント H L A 対立遺伝子) に制限され、これによって、L V 構造および酵素コード遺伝子のパッケージングを妨げる。ウイルスを産生するために、トランスジーンを含む輸送ベクターは、トランスジーン発現カセットとエンベロープタンパク質をパッケージするのに必要なウイルスタンパク質をコードする個別のプラスミドで共形質移入することができる。一実施形態では、ウイルスのトピズムを拡大するために、水胞性口炎ウイルス (V e s i c u l a r s t o m a t i t i s v i r u s) 糖タンパク質 - G [V S V - G] が使用されている。

【0691】

一実施形態では、S I N レンチウイルスベクターを用いて、トランスジーン (例えば、マッチ H L A 対立遺伝子) をドナー H S P C に輸送する。X 連鎖副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、およびウィスコット・オルドリッチ (W i s k o t t e - A l d r i c h) 症候群を治療するために、生体外で造血幹/前駆細胞 (H S P C) を遺伝子修飾するために用いられる組換えレンチウイルスの組み込みの使用については、例えば、C a r t i e r e t a l ; S c i e n c e . 2 0 0 9 N o v 6 ; 3 2 6 (5 9 5 4) : 8 1 8 - 2 3 ; B i f f i e t a l . , S c i e n c e . 2 0 1 3 ; 3 4 1 (6 1 4 8) : 1 2 3 3 1 5 8 - 1 2 3 3 1 5 8 ; A i u t i e t a l , S c i e n c e . 2 0 1 3 ; 3 4 1 (6 1 4 8) : 1 2 3 3 1 5 1 - 1 2 3 3 1 5 1 に記載されている。白血病および膠芽腫を治療することを目的とした、がん特異的キメラ抗原受容体 (C A R) 発現 T リンパ球生産のためのレンチウイルスベクターの臨床使用については、例えば、M a u d e e t a l , S L , N E n g l J M e d . 2 0 1 4 ; 3 7 1 (1 6) : 1 5 0 7 - 1 5 1 7 ; および J o h n s o n e t a l . , S c i e n c e T r a n s l a t i o n a l M e d i c i n e . 2 0 1 5 ; 7 (2 7 5) : 2 7 5 r a 2 2 - 2 7 5 r a 2 2 に記載されている。

【0692】

一実施形態では、インテグラーゼ欠損型レンチウイルス (I D L V) を用いて、例えば、本来の H L A 遺伝子座またはセーフ・ハーバー遺伝子座中に、レシピエントマッチ H L A トランスジーンの標的化組み込みおよび/もしくはノックインのために、トランスジーン (例えば、レシピエント同一 H L A 対立遺伝子) 送達用のドナー C a s 9、g R N A、および/もしくはドナー修復テンプレート DNA を送達する。I D L V は、一次ヒト細胞に形質導入することができるが、遺伝子カーゴを宿主細胞ゲノムに組み込むことはできない。レンチウイルスベクターのパッケージ容量 (約 1 0 k b) を考慮すると、I D L V は、相同組換え修復 (H D R) によるゲノム編集戦略用の C a s 9、g R N A、およびドナー修復テンプレートを送達するための有用なツールである (K u m a r e t a l , H u m a n G e n e T h e r a p y . 2 0 0 1 ; 1 2 (1 5) : 1 8 9 3 - 1 9 0 5) 。I D L V は、生体外および生体内での一次標的細胞の部位特異的修飾用のジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N)、T A L エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、メガヌクレアーゼ、およびドナー修復テンプレートを送達するために使用されている (L o m b a r

do et al, A, Nature Biotechnology. 2007; 25 (1) : 1298-1306; Joglekar et al, Mol Ther. 2013; 21 (9) : 1705-1717; Holkers et al, Nucleic Acids Res. 2013; 41 (5) : e63; Riviere et al. Gene Ther. 2014; 21 (5) : 529-532)。一実施形態では、細胞は、分裂細胞または高速分裂細胞である。別の実施形態では、細胞は、静止細胞または低速分裂細胞（例えば、長期HSPC、ニューロン、または肝細胞）である。

【0693】

一実施形態では、ウイルスベクターは、細胞型および／または組織タイプ認識能力を有する。例えば、ウイルスベクターは、異なる／代案のウイルス外被糖タンパク質による偽型であり得て；細胞型特異的受容体によって改変され（例えば、ペプチドリガンド、一本鎖抗体、成長因子などの標的化リガンドに組み込むためのウイルス外被糖タンパク質の遺伝子修飾）；および／または改変されて、一端がウイルス糖タンパク質を認識して、もう一方の末端が標的細胞表面部分を認識する、二重特異性がある分子ブリッジを有する（例えば、リガンド受容体、モノクローナル抗体、アビジン-ビオチン、および化学的結合）。

【0694】

一実施形態では、ウイルスベクターは、細胞型特異的発現を達成する。例えば、組織特異的プロモーターが構築されて、標的細胞のみで導入遺伝子（Cas9およびgRNA）の発現が制限され得る。ベクターの特異性はまた、導入遺伝子発現のマイクロRNA依存性調節によって媒介され得る。一実施形態では、ウイルスベクターは、ウイルスベクターと標的細胞膜との融合効率の増大を有する。例えば、融合能力がある赤血球凝集素（HA）などのが組み込まれて、細胞内へのウイルス取り込みが増大され得る。一実施形態では、ウイルスベクターは、核局在化能力を有する。例えば、（細胞分裂中に）核エンベロープの分解を要し、したがって非分裂細胞に感染しない特定のウイルスは、ウイルスのマトリックスタンパク質に核局在化ペプチドを組み込むように改変され得て、それによって非増殖性細胞への形質導入が可能になる。

【0695】

いくつかの実施形態では、Cas9をコードするDNAおよび／またはgRNAをコードするDNAは、（例えば、裸のDNAまたはDNA複合体を使用して）非ベクターベースの方法によって送達される。例えば、DNAは、例えば、有機修飾シリカまたはケイ酸塩（Ormosil）、電気穿孔、一過性細胞圧縮または圧搾（例えば、Lee, et al., Nano Lett 12: 6322-27に記載される通り）、遺伝子銃、ソノポレーション、マグネトフェクション、脂質媒介形質移入、デンドリマー、無機ナノ粒子、カルシウムリン酸塩、またはそれらの組み合わせによって送達され得る。

【0696】

一実施形態では、電気穿孔を通じた送達は、カートリッジ、チャンバーまたはキュベット内で、細胞をCas9および／またはgRNAをコードするDNAと混合し、規定の時間と振幅で1回または複数回の電気インパルスを適用するステップを含む。一実施形態では、電気穿孔を通じた送達は、カートリッジ、チャンバーまたはキュベットに混合物を供給する装置（例えばポンプ）と連結する容器内で、細胞がCas9および／またはgRNAをコードするDNAと混合され、カートリッジ、チャンバーまたはキュベット内では、規定の時間と振幅で1回または複数回の電気インパルスが適用され、その後、細胞が第2の容器に送達される、システムを使用して実施される。

【0697】

いくつかの実施形態では、Cas9をコードするDNAおよび／またはgRNAをコードするDNAは、ベクターおよび非ベクターベースの方法の組み合わせによって送達される。一実施形態では、供与体テンプレート核酸は、ベクターと非ベクターベースの方法の組み合わせによって送達される。例えば、ピロソームは、不活性化ウイルス（例えば、HIVまたはインフルエンザウイルス）とリポソームを結合させ、これによって、例えば、呼吸上皮細胞中に、ウイルスまたはリポソーム法単独のいずれよりも効率的な遺伝子移入

をもたらし得る。

【0698】

一実施形態では、送達ビヒクルは、非ウイルスベクターである。一実施形態では、非ウイルスベクターは、無機ナノ粒子である。例示的な無機ナノ粒子としては、例えば、磁性ナノ粒子（例えば、 Fe_3MnO_2 ）またはシリカが挙げられる。ナノ粒子の外面は、ペイロードの付着（例えば、コンジュゲーションまたは捕捉）を可能にする正荷電ポリマー（例えば、ポリエチレンイミン、ポリリジン、ポリセリン）にコンジュゲートされ得る。一実施形態では、非ウイルスベクターは、有機ナノ粒子である（例えば、ナノ粒子内のペイロードの捕捉）。代表的有機ナノ粒子としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）で被覆された中性ヘルパー脂質、および脂質コーティングで被覆されたプロタミン核および酸複合体に加えて、カチオン性脂質を含有するSNALPリポソームが挙げられる。

10

【0699】

遺伝子移入のための代表的脂質は、下で表21に示される。

【0700】

20

30

40

50

【表 6 1】

表 21:遺伝子移入のために使用される脂質

脂質	略称	特徴
1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン	DOPC	ヘルパー
1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン	DOPE	ヘルパー
コレステロール		ヘルパー
N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル(prophyl)]N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド	DOTMA	カチオン性
1,2-ジオレオイルオキシ-3-トリメチルアンモニウム-プロパン	DOTAP	カチオン性
ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン	DOGS	カチオン性
N-(3-アミノプロピル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(ドデシルオキシ)-1-プロパンアミニウム臭化物	GAP-DLRIE	カチオン性
臭化セチルトリメチルアンモニウム	CTAB	カチオン性
6-ラウロキシヘキシル オルニチネート	LHON	カチオン性
1-(2,3-ジオレオイルオキシプロピル)-2,4,6-トリメチルピリジニウム	2Oc	カチオン性
2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スベルミンカルボキサミド-エチル)-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロ酢酸塩]	DOSPA	カチオン性
1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン	DOPA	カチオン性
N-(2-ヒドロキシエチル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)-1-プロパンアミニウム臭化物	MDRIE	カチオン性
臭化アンモニウムジミリスチオキシプロピルジメチル ヒドロキシエチル	DMRI	カチオン性
3β-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロール	DC-Chol	カチオン性
ビス-グアニジウム-tren-コレステロール	BGTC	カチオン性
1,3-ジデオキシ(Diodeoxy)-2-(6-カルボキシ-スベルミル)-プロピルアミド	DOSPER	カチオン性
臭化ジメチルオクタデシルアンモニウム	DDAB	カチオン性
ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン	DSL	カチオン性
rac-[(2,3-ジオクタデシルオキシプロピル)(2-ヒドロキシエチル)]-ジメチルアンモニウム塩化物	CLIP-1	カチオン性
rac-[2(2,3-ジヘキサデシルオキシプロピル-オキシメチルオキシ)エチル]トリメチルアンモニウム臭化物	CLIP-6	カチオン性
エチルジミリスチルホスファチジルコリン	EDMPC	カチオン性
1,2-ジステアイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン	DSDMA	カチオン性
1,2-ジミリスチル-トリメチルアンモニウムプロパン	DMTAP	カチオン性
アスパラギン酸 O,O'-ジミリスチル-N-リシル	DMKE	カチオン性
1,2-ジステアイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン	DSEPC	カチオン性
N-パルミトイル D-エリスロ-スフィンゴシルカルバモイル-スベルミン	CCS	カチオン性
N-t-ブチル-N0-テトラデシル-3-テトラデシルアミノプロピオンアミジン	ジ C14-アミジン	カチオン性
オクタデセノイルオキシ(Octadecenolyoxy)[エチル-2-ヘプタデセニル-3-ヒドロキシエチル]イミダゾリニウム塩化物	DOTIM	カチオン性
N1-コレステリルオキシカルボニル-3,7-ジアザノナン-1,9-ジアミン	CDAN	カチオン性
2-(3-[ビス(3-アミノ-プロピル)-アミノ]プロピルアミノ)-N-ジテトラデシルカルバモイルメチル(ditetradecylcarbamoylme-ethyl)-アセトアミド	RPR209120	カチオン性
1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン	DLinDMA	カチオン性
2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン	DLin-KC2-DMA	カチオン性
ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミノ酪酸	DLin-MC3-DMA	カチオン性

【0701】

遺伝子移入のための代表的なポリマーは、下で表 2 2 に示される。

【0702】

10

20

30

40

50

【表 6 2】

表 22: 遺伝子移入のために使用されるポリマー

ポリマー	略称
ポリ(エチレン)グリコール	PEG
ポリエチレンイミン	PEI
ジチオビス(スクシンイミジルプロピオン酸)	DSP
ジメチル-3,3'-ジチオビスプロピオンイミド酸	DTBP
ポリ(エチレンイミン)ビスカルバメート	PEIC
ポリ(L-リジン)	PLL
ヒスチジン修飾 PLL	
ポリ(N-ビニルピロリドン)	PVP
ポリ(プロピレンイミン)	PPI
ポリ(アミドアミン)	PAMAM
ポリ(アミドエチレンイミン)	SS-PAEI
トリエチレンテトラミン	TETA
ポリ(β -アミノエステル)	
ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)	PHP
ポリ(アリルアミン)	
ポリ(α -[4-アミノブチル]-L-グリコール酸)	PAGA
ポリ(D,L-乳酸-コ-グリコール酸)	PLGA
ポリ(N-エチル-4-ビニルピリジニウム臭化物)	
ポリ(ホスファゼン)	PPZ
ポリ(リン酸エステル)	PPE
ポリ(ホスホロアミダート)	PPA
ポリ(N-2-ヒドロキシプロピルメタクリルアミド)	pHPMA
ポリ(2-(ジメチルアミノ)メタクリル酸エチル)	pDMAEMA
ポリ(リン酸プロピレン 2-アミノエチル)	PPE-EA
キトサン	
ガラクトシル化キトサン	
N-ドデシル化(Dodecylated)キトサン	
ヒストン	
コラーゲン	
デキストラン-スベルミン	D-SPM

【0703】

一実施形態では、ビヒクルは、標的化修飾を有して、例えば、細胞特異的抗原、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、アプタマー、ポリマー、糖（N-アセチルガラクトースアミン（GalNAc））、および細胞透過性ペプチドなどのナノ粒子およびリポソームの標的細胞アップデートが増大される。一実施形態では、ビヒクルは、融合性およびエンドソーム不安定化ペプチド／ポリマーを利用する。一実施形態では、ビヒクルは、酸誘発性立体構造変化を受ける（例えば、カーゴのエンドソーム漏出を加速するために）。一実施形態では、例えば、細胞区画内の放出のために、刺激切断可能ポリマーが使用される。例えば、還元性細胞環境内で切断されるジスルフィドベースのカチオン性ポリマーが、使用され得る。

【0704】

一実施形態では、送達ビヒクルは、生物学的非ウイルス送達ビヒクルである。一実施形態では、ビヒクルは、弱毒型細菌（例えば、侵入性であるが弱毒化されて発病を予防して導入遺伝子を発現するように、天然にまたは人工的に改変されている（例えば、リステリ

ア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、特定のサルモネラ属 (*Salmonella*) 株、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、および改変大腸菌 (*Escherichia coli*)；栄養および組織特異的親和性を有して特定組織を標的化する細菌；修飾表面タンパク質を有して標的組織特異性を改変する細菌)である。一実施形態では、ビヒクルは、遺伝子修飾されたバクテリオファージである(例えば、改変ファージは、大きなパッケージング容量を有し、免疫原性がより低く、哺乳類プラスミド維持配列を含有して、組み込まれた標的化リガンドを有する)。一実施形態では、ビヒクルは、哺乳類ウイルス様粒子である。例えば、修飾ウイルス粒子が生成され得る(例えば、「空の」粒子精製と、それに続く、所望のカーゴがあるウイルスの生体外構築によって)。ビヒクルはまた改変されて、標的化リガンドが組み込まれ、標的組織特異性が改変され得る。一実施形態では、ビヒクルは、生物学的リポソームである。例えば、生物学的リポソームは、ヒト細胞(例えば、対象に由来する球状構造に分解された赤血球である赤血球ゴーストに由来するリン脂質ベースの粒子(例えば、組織標的化が、様々な組織または細胞特異的リガンドの付着によって達成され得る)；またはエンドサイトーシス起源の分泌型エキソソーム-対象(すなわち、患者)由来膜結合ナノ小胞(30~100 nm)(例えば、様々な細胞型から生成され得て、したがってリガンド標的化の必要なしに細胞に取り込まれ得る)である。

【0705】

一実施形態では、例えば、本明細書に記載される Cas9 分子構成要素および／または gRNA 分子構成要素などの、Cas システムの構成要素以外の1つまたは複数の核酸分子(例えば、DNA 分子)が送達される。一実施形態では、核酸分子は、Cas システムの構成要素の1つまたは複数と同時に、送達される。一実施形態では、核酸分子は、Cas システムの構成要素の1つまたは複数が送達される(例えば、約30分間、1時間、2時間、3時間、6時間、9時間、12時間、1日、2日間、3日間、1週間、2週間、または4週間未満)前または後に送達される。一実施形態では、核酸分子は、例えば、Cas9 分子構成要素および／または gRNA 分子構成要素などの Cas システムの構成要素の1つまたは複数とは、異なる手段によって送達される。核酸分子は、本明細書に記載される送達方法のいずれかによって送達することができる。例えば、核酸分子は、例えば、組み込み欠陥レンチウイルスなどのウイルスベクターによって送達することができ、Cas9 分子構成要素および／または gRNA 分子構成要素は、例えば、核酸(例えば、DNA)によって引き起こされる毒性を低減することができるように、電気穿孔によって送達することができる。一実施形態では、核酸分子は、例えば、本明細書に記載されるタンパク質などの治療タンパク質をコードする。一実施形態では、核酸分子は、本明細書 RNA 分子などの RNA 分子をコードする。

【0706】

Cas9 分子をコードする RNA の送達

Cas9 分子(例えば、eaCas9 分子または eiCas9 分子)をコードする RNA および／または gRNA 分子は、当該技術分野で周知の方法によって、または本明細書に記載される通りに、例えば、本明細書に記載される標的細胞などの細胞内に送達することができる。例えば、Cas9 をコードするおよび／または gRNA をコードする RNA は、例えば、マイクロインジェクション、電気穿孔、一過性細胞圧縮または圧搾(例えば、Lee, et al., 2012, Nano Lett 12:6322-27に記載される通り)、脂質媒介形質移入、ペプチド媒介送達、またはそれらの組み合わせによって送達され得る。Cas9 をコードするおよび／または gRNA をコードする RNA は、標的細胞(例えば、本明細書に記載される標的細胞)による取り込みを促進する分子)と共役させることができる。

【0707】

一実施形態では、電気穿孔を通じた送達は、カートリッジ、チャンバーまたはキュベット内で、ドナーテンプレート核酸分子と一緒に、もしくはそれなしで、細胞を Cas9 分子(例えば、eaCas9 分子、eiCas9 分子または eiCas9 融合物タンパク質

10

20

30

40

50

）および／または gRNA 分子をコードする RNA と混合し、規定の時間および振幅で 1 回または複数回の電気インパルスを適用するステップを含んでなる。一実施形態では、電気穿孔を通じた送達は、カートリッジ、チャンバーまたはキュベットに混合物を供給する装置（例えばポンプ）と連結させた容器内で、ドナーテンプレート核酸分子と一緒に、もしくはそれなしで、細胞が Cas9 分子（例えば、e a Cas9 分子、e i Cas9 分子または e i Cas9 融合物タンパク質）および／または gRNA 分子をコードする RNA と混合され、カートリッジ、チャンバーまたはキュベット内では、規定の時間および振幅で 1 回または複数回の電気インパルスが適用され、その後、細胞が第 2 の容器に送達される、システムを使用して実施される。Cas9 をコードする RNA および／または gRNA をコードする RNA は、標的細胞（例えば、本明細書に記載される標的細胞）による取り込みを促進する分子と共役させることができる。

10

【0708】

Cas9 分子タンパク質の送達

Cas9 分子（例えば、e a Cas9 分子または e i Cas9 分子）は、当該技術分野で周知の方法によって、または本明細書に記載される通りに、細胞内に送達することができる。例えば、Cas9 タンパク質分子は、例えば、マイクロインジェクション、電気穿孔、一過性細胞圧縮または圧搾（例えば、Lee, et al., 2012; Nano Lett 12: 6322-27 に記載される通り）、脂質媒介形質移入、ペプチド媒介送達、またはそれらの組み合わせによって送達することができる。送達は、gRNA をコードする DNA、または gRNA を伴い得る。Cas9 タンパク質は、標的細胞（例えば、本明細書に記載される標的細胞）による取り込みを促進する分子と共役させることができる。

20

【0709】

一実施形態では、電気穿孔を通じた送達は、カートリッジ、チャンバーまたはキュベット内で、ドナー核酸と一緒に、もしくはそれなしで、細胞を Cas9 分子（例えば、e a Cas9 分子、e i Cas9 分子または e i Cas9 融合物タンパク質）および／または gRNA 分子と混合し、規定の時間および振幅で 1 回または複数回の電気インパルスを適用するステップを含んでなる。一実施形態では、電気穿孔を通じた送達は、カートリッジ、チャンバーまたはキュベットに混合物を供給する装置（例えば、ポンプ）と連結させた容器内で、ドナー核酸と一緒に、もしくはそれなしで、細胞が Cas9 分子（例えば、e a Cas9 分子、e i Cas9 分子または e i Cas9 融合物タンパク質）および／または gRNA 分子と混合され、カートリッジ、チャンバーまたはキュベット内では、規定の時間および振幅で 1 回または複数回の電気インパルスが適用され、その後、細胞が第 2 の容器に送達される、システムを使用して実施される。Cas9 をコードする RNA および／または gRNA をコードする RNA は、標的細胞（例えば、本明細書に記載される標的細胞）による取り込みを促進する分子と共役させることができる。

30

【0710】

Cas9 タンパク質を gRNA 分子と組み合わせて、当該技術分野で公知の方法により、もしくは本明細書に記載のように、対象に投与されるか、または細胞に送達されるリボ核タンパク質（RNP）複合体を形成することができる。Cas9/gRNA RNP 複合体を細胞に直接送達すれば、核酸からの発現（例えば、Cas9 および gRNA をコードするプラスミドの形質移入）の必要がなくなる。これはまた、核酸送達から生じる DNA セグメントの不要な組み込み（例えば、Cas9 および gRNA をコードするプラスミドの形質移入）も排除した。従って、これは、迅速な作用、高速ターンオーバー、高いオンターゲット修飾率、低いオフターゲット効果および細胞に対する低い毒性を提供する代替送達アプローチである。これは、細胞を形質移入するのが難しい（例えば、一次および多能性幹細胞を形質移入するのが難しい）Cas9/gRNA 複合体を送達するために使用することもできる。Cas9/gRNA リボ核タンパク質（RNP）複合体は、通常、投与前に形成される（すなわち、事前に形成される）。複数の（例えば、2 つ以上の）Cas9/gRNA リボ核タンパク質（RNP）複合体が必要とされる場合、これらは、同時または順次送達（例えば、投与）することができる。一実施形態では、Cas9/gRNA

40

50

NAリボ核タンパク質（RNP）複合体は、電気穿孔によって細胞に送達される。

【0711】

投与経路

全身投与方法としては、経口および非経口経路が挙げられる。非経口経路として、例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、皮下、鼻内、および腹腔内経路が挙げられる。全身投与される構成要素は、肝細胞、肝臓オーバル細胞、マクロファージまたは単球を標的化するように、修飾または製剤化することもできる。

【0712】

局所投与方法として、例えば、肝臓への実質内送達、肝臓内動脈注入および門脈への注入が挙げられる。一実施形態では、極めて少量の構成要素（全身アプローチと比較して）は、全身（例えば、静脈内）に投与する場合と比較して、局所（例えば、肝実質中に直接）投与すれば、効果を及ぼし得る。局所投与方法は、治療有効量の構成要素を全身投与する場合に起こり得る潜在的に毒性の副作用の発生を低減または排除することができる。

【0713】

投与は、定期的なボラス（例えば、静脈内）として、または内部レザバーもしくは外部レザバー（例えば、静脈内バッグもしくは埋め込みポンプ）からの連続的注入として提供してもよい。構成要素は、例えば、肝臓に埋め込まれた徐放性薬物送達装置からの連続的放出によって局所投与してもよい。

【0714】

さらに、構成要素は、長期間にわたる放出を可能にするように、製剤化してもよい。放出系は、生分解性材料、または組み込まれた構成要素を拡散によって放出する材料からなるマトリックスを含み得る。構成要素は、放出系内に均一または不均一に分布することができる。多様な放出系が有用であるが、適切な系の選択は、具体的な適用により要求される放出速度に応じて変わり得る。非分解性および分解性放出系の双方を用いることができる。好適な放出系として、ポリマーおよびポリマーマトリックス、非ポリマーマトリックス、または無機および有機賦形剤および希釈剤、例えば、限定はしないが、炭酸カルシウムおよび糖（例えば、トレハロース）などが挙げられる。放出系は、天然または合成のいずれであってもよい。しかしながら、一般的に、信頼性および再現性が高く、しかもより明確な放出プロフィールを生み出すことから、合成放出系が好ましい。放出系材料は、様々な分子量を有する構成要素が、上記材料を介した拡散、またはその分解により放出されるように選択することができる。

【0715】

代表的な合成生分解性ポリマーとして、例えば、以下のものが挙げられる：ポリ（アミノ酸）およびポリ（ペプチド）などのポリアミド；ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、乳酸グリコール酸共重合体、およびポリ（カプロラクトン）などのポリエステル；ポリ（無水物）；ポリオルトエステル；ポリカーボネート；ならびにこれらの化学誘導体（化学基、例えば、アルキル、アルキレンの置換、付加、ヒドロキシル化、酸化、および当業者により常用的に実施されるその他の修飾）、それらのコポリマーおよび混合物。代表的な合成非生分解性ポリマーとして、例えば、以下のものが挙げられる：ポリ（エチレンオキシド）、ポリ（エチレングリコール）、およびポリ（テトラメチレンオキシド）などのポリエーテル；メチル、エチル、その他のアリキル、ヒドロキシエチルメタクリレート、アクリル酸およびメタクリル酸などのビニルポリマー；ポリアクリレートおよびポリメタクリレート、ならびにポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、およびポリ（酢酸ビニル）などのその他；ポリ（ウレタン）；アルキル、ヒドロキシアリキル、エーテル、エステル、ニトロセルロース、および様々な酢酸セルロースなどのセルロースおよびその誘導体；ポリシロキサン；ならびにこれらの任意の化学誘導体（化学基、例えば、アルキル、アルキレンの置換、付加、ヒドロキシル化、酸化、および当業者により常用的に実施されるその他の修飾）、それらのコポリマーおよび混合物。

【0716】

また、ポリ（ラクチド-コ-グリコリド）ミクロスフェアも使用することができる。典

10

20

30

40

50

型的に、ミクロスフェアは、乳酸およびグリコール酸のポリマーからなり、中空のスフェアを形成するような構造をしている。スフェアは、直径が約15～30ミクロンであってよく、本明細書に記載される構成要素をロードすることができる。

【0717】

構成要素の2モードまたは差次的送達

Casシステムの構成要素、例えば、Cas9分子構成要素およびgRNA分子構成要素の個別の送達、より具体的には、差次的モードによる構成要素の送達は、例えば、組織特異性および安全性を改善することによって、性能を高めることができる。

【0718】

一実施形態では、Cas9分子およびgRNA分子は、異なるモード、または本明細書で差次的モードと呼ぶことがあるモードによって送達される。異なるまたは差次的モードは、本明細書の用法では、例えば、Cas9分子、gRNA分子、テンプレート核酸、またはペイロードなどの対象構成要素分子に、異なる薬力学または薬物動態特性を付与する送達モードを指す。例えば、これらの送達モードにより、例えば、選択したコンパートメント、組織、または臓器において、異なる組織分布、異なる半減期、または異なる時間的分布をもたらすことができる。

【0719】

例えば、細胞、または細胞の子孫において持続する核酸ベクターによる送達、例えば自立複製または細胞核酸への挿入による送達など、いくつかの送達モードは、構成要素のより持続的発現および存在をもたらす。例として、例えば、アデノ関連ウイルスまたはレンチウイルスなどのウイルスによる送達がある。

【0720】

例として、Cas9分子およびgRNA分子などの構成要素は、送達される構成要素の、身体、または特定のコンパートメント、組織もしくは臓器において達成される半減期または持続性に関して異なるモードによって送達することができる。Cas9分子構成要素は、身体、または特定のコンパートメントまたは組織もしくは臓器に対して、より低い持続性または曝露をもたらすモードによって送達することができる。

【0721】

より一般的には、一実施形態では、第1の送達モードを用いて、第1の構成要素を送達し、第2の送達モードを用いて、第2の構成要素を送達する。第1の送達モードは、第1の薬力学的または薬物動態特性を付与する。第1の薬力学的特性は、例えば、身体、コンパートメント、組織もしくは臓器における、構成要素、または構成要素をコードする核酸の分布、持続性、または曝露であってよい。第2の送達モードは、第2の薬力学的または薬物動態特性を付与する。第2の薬力学的特性は、例えば、身体、コンパートメント、組織もしくは臓器における、構成要素、または構成要素をコードする核酸の分布、持続性、または曝露であってよい。

【0722】

一実施形態では、例えば、分布、持続性、または曝露などの第1の薬力学的または薬物動態特性は、第2の薬力学的または薬物動態特性より限定されている。

【0723】

一実施形態では、第1の送達モードは、例えば、分布、持続性、または曝露などの薬力学的または薬物動態特性を例えば、最小にするなど、最適化するように選択される。

【0724】

一実施形態では、第2の送達モードは、例えば、分布、持続性、または曝露などの薬力学的または薬物動態特性を例えば、最大にするなど、最適化するように、選択される。

【0725】

一実施形態では、第1の送達モードは、例えば、核酸、例えば、プラスミドもしくはウイルスベクター、例えば、AAVもしくはレンチウイルスなどの比較的持続的な要素の使用を含む。このようなベクターは比較的持続的であるため、それらから転写された産物も比較的持続的となる。

10

20

30

40

50

【0726】

一実施形態では、第2の送達モードは、比較的一過性の要素、例えば、RNA分子またはタンパク質を含む。

【0727】

一実施形態では、第1の構成要素は、gRNAを含み、送達モードは、比較的持続的であり、例えば、gRNA分子は、プラスミドまたはウイルスベクター、例えば、AAVもしくはレンチウイルスから転写される。これらの遺伝子は、タンパク質産物をコードせず、gRNAは、単独で作用することができないため、これらの遺伝子の転写には生理学的結果がほとんどない。第2の構成要素であるCas9分子は、例えば、mRNAまたはタンパク質として、一過性様式で送達され、完全なCas9分子／gRNA分子複合体は、短い期間だけ存在し、活性である。

10

【0728】

さらに、構成要素は、互いに補完して、安全性および組織特異性を高める異なる分子形態で、または異なる送達ベクターを用いて送達することができる。

【0729】

差次的送達モードの使用によって、性能、安全性および効率を高めることができ、例えば、最終的なオフターゲット修飾の可能性を低減することができる。細菌由来のCas酵素からのペプチドは、MHC分子による細胞の表面に展示されるため、低持続性モードによる、例えばCas9分子などの免疫原性構成要素の送達は免疫原性を低減し得る。二部送達システムは、これらの問題を軽減し得る。

20

【0730】

差次的送達モードを用いて、異なっているが、オーバーラップする標的領域に構成要素を送達することができる。活性複合体の形成は、標的領域のオーバーラップの外側で最小にされる。従って、一実施形態では、例えば、gRNA分子などの第1の構成要素は、第1の空間的（例えば、組織など）分布をもたらす第1の送達モードによって送達される。例えば、Cas9分子などの第2の構成要素は、第2の空間的（例えば、組織など）分布をもたらす第2の送達モードによって送達される。一実施形態では、第1のモードは、リポソーム、例えばポリマーナノ粒子などのナノ粒子、および例えばウイルスベクターなどの核酸から選択される第1の要素を含む。第2のモードは、上記の群から選択される第2の要素を含む。一実施形態では、第1の送達モードは、例えば、細胞特異的受容体もしくは抗体などの第1の標的化要素を含み、第2の送達モードは、その要素を含まない。実施形態では、第2の送達モードは、例えば、第2の細胞特異的受容体もしくは第2の抗体などの第2の標的化要素を含む。

30

【0731】

Cas9分子をウイルス送達ベクター、リポソーム、またはポリマーナノ粒子で送達する場合、単一の組織を標的化することだけが望ましいと考えられるとき、複数の組織への送達および複数の組織での治療活性の可能性がある。二部送達系は、この課題を解決し、組織特異性を高めることができる。異なっているが、オーバーラップする組織屈性を有する別々の送達ビヒクル中にgRNA分子とCas9分子をパッケージする場合、双方のベクターによって標的化された組織には、完全に機能性の複合体だけが形成される。

40

【0732】

生体外送達

いくつかの実施形態では、表19に記載される構成要素を細胞に導入した後、これらの細胞を対象に導入する。構成要素を導入する方法は、表20に記載される送達方法のいずれかを含み得る。

【0733】

VIII. 修飾ヌクレオシド、ヌクレオチド、および核酸

修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、例えば、特にgRNAなどの核酸中に存在し得るが、例えば、mRNA、RNAi、またはsiRNAなどのその他の形態のRNAにもまた存在し得る。本明細書に記載される「ヌクレオシド」は、5つの炭素砂糖分子

50

(ペントースまたはリボース) またはその誘導体と、1つの有機塩基、プリンまたはピリミジン、またはその誘導体とを含有する化合物と定義される。本明細書に記載される「ヌクレオチド」は、リン酸基をさらに含むヌクレオシドと定義される。

【0734】

修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、以下の1つまたは複数を含み得る：

(i) 例えば、リン酸ジエステル骨格結合中の非結合リン酸酸素の片方または双方および／または結合リン酸酸素の1つまたは複数の置換などの改変；

(ii) 例えば、リボース糖上の2'ヒドロキシルなどのリボース糖の構成要素の置換などの改変；

(iii) リン酸部分の「デホスホ」リンカーによる徹底的な置換；

(iv) 天然起源核酸塩基の修飾または置換；

(v) リボースリン酸骨格の置換または修飾；

(vi) 例えば、末端リン酸基の除去、修飾または置換または部分のコンジュゲーションなどのオリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の修飾；および

(vii) 糖の修飾。

【0735】

上に列挙される修飾を混合して、2、3、4つ以上の修飾を有し得る、修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドが提供され得る。例えば、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、修飾糖および修飾核酸塩基を有し得る。一実施形態では、gRNAの各塩基は修飾され、例えば、全ての塩基が、例えば、全てホスホロチオエート基であるなど、修飾リン酸基を有する。一実施形態では、単分子またはモジュラーgRNA分子の全ての、または実質的に全てのリン酸基は、ホスホロチオエート基で置換される。

【0736】

一実施形態では、例えば、本明細書に記載されるような修飾を有するヌクレオチドなどの修飾ヌクレオチドが、例えば、「修飾核酸」などの核酸に組み込まれ得る。一実施形態では、修飾核酸は、1、2、3つ以上の修飾ヌクレオチドを含む。一実施形態では、修飾核酸内の位置の少なくとも5%（例えば、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%）は、修飾ヌクレオチドである。

【0737】

未修飾核酸は、例えば、細胞ヌクレアーゼによって分解され易くあり得る。例えば、ヌクレアーゼは、核酸リン酸ジエステル結合を加水分解し得る。したがって、一態様では、本明細書に記載される修飾核酸は、1つまたは複数の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含有し得て、例えば、ヌクレアーゼに安定性が導入される。

【0738】

一実施形態では、本明細書に記載される修飾ヌクレオシド、修飾ヌクレオチド、および修飾核酸は、生体内および生体外双方の細胞集団内に導入されると、先天性免疫応答の低下を示し得る。「先天性免疫応答」という用語は、一般にウイルス性または細菌起源である、一本鎖核酸をはじめとする外来性核酸に対する細胞性応答を含み、それは、具体的にはインターフェロンであるサイトカインの発現と放出の誘導、および細胞死を内包する。一実施形態では、本明細書に記載される修飾ヌクレオシド、修飾ヌクレオチド、および修飾核酸は、主溝相互作用パートナーの核酸との結合を妨害し得る。一実施形態では、本明細書に記載される修飾ヌクレオシド、修飾ヌクレオチド、および修飾核酸は、生体内および生体外双方の細胞集団内に導入されると、先天性免疫応答の低下を示して、そしてまた主溝相互作用パートナーの核酸との結合も妨害し得る。

【0739】

化学基の定義

10

20

30

40

50

本明細書の用法では、「アルキル」は、直鎖または分枝鎖の飽和炭化水素基を指すことが意図される。アルキル基の例としては、メチル（Me）、エチル（Et）、プロピル（例えば、n-プロピルおよびイソプロピル）、ブチル（例えば、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル）、ペンチル（例えば、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル）などが挙げられる。アルキル基は、1～約20個、2～約20個、1～約12個、1～約8個、1～約6個、1～約4個、または1～約3個の炭素原子を含有し得る。

【0740】

本明細書の用法では、「アリール」は、例えば、フェニル、ナフチル、アントラセニル、フェナントレニル、インダニル、インデニルなどの単環または多環（例えば、2、3または4つの融合環を有する）芳香族炭化水素を指す。一実施形態では、アリール基は、6～約20個の炭素原子を有する。

10

【0741】

本明細書の用法では、「アルケニル」は、少なくとも1つの二重結合を含有する脂肪族基を指す。

【0742】

本明細書の用法では、「アルキニル」は、2～12個の炭素原子を含有し、1つまたは複数の三重結合を有することで特徴付けられる、直鎖または分枝炭化水素鎖を指す。アルキニル基の例としては、エチニル、プロパルギル、および3-ヘキシニルが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0743】

本明細書の用法では、「アリールアルキル」または「アラルキル」は、アルキル水素原子がアリール基で置換された、アルキル部分を指す。アラルキルは、2つ以上の水素原子がアリール基で置換されている基を含む。「アリールアルキル」または「アラルキル」の例としては、ベンジル、2-フェニルエチル、3-フェニルプロピル、9-フルオレニル、ベンズヒドリル、およびトリチル基が挙げられる。

20

【0744】

本明細書の用法では、「シクロアルキル」は、3～12個の炭素を有する環式、二環式、三環式、または多環式非芳香族炭化水素基を指す。シクロアルキル部分の例としては、シクロプロピル、シクロペンチル、およびシクロヘキシルが挙げられるが、これに限定されるものではない。

30

【0745】

本明細書の用法では、「ヘテロシクリル」は、複素環系の一価の基を指す。典型的なヘテロシクリルとしては、制限なしに、テトラヒドロフランニル、テトラヒドロチエニル、ピロリジニル、ピロリドニル、ピペリジニル、ピロリニル、ピペラジニル、ジオキサニル、ジオキサソラニル、ジアゼピニル、オキサゼピニル、チアゼピニル、およびモルホリニルが挙げられる。

【0746】

本明細書の用法では、「ヘテロアリール」は、複素環式芳香族環系の一価の基を指す。ヘテロアリール部分の例としては、イミダゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、トリアゾリル、ピロリル、フラニル、インドリル、チオフェニルピラゾリル、ピリジニル、ピラジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、インドリジニル、プリニル、ナフチリジニル、キノリル、およびプテリジニルが挙げられる、が、これに限定されるものではない。

40

【0747】

リン酸塩骨格修飾

リン酸基

一実施形態では、修飾ヌクレオチドのリン酸基は、異なる置換基による、1つまたは複数の酸素の置換によって修飾され得る。さらに、例えば、内修飾核酸に存在する修飾ヌクレオチドなどの修飾ヌクレオチドは、本明細書に記載されるような修飾リン酸塩による、未修飾リン酸部分の徹底的な置換を含み得る。一実施形態では、リン酸骨格の修飾は、非荷電リンカーまたは非相称の電荷分布がある荷電リンカーのどちらかをもたらし改変を含

50

み得る。

【0748】

修飾リン酸基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロセネート、ボラノリン酸、ボラノリン酸エステル、ホスホン酸水素、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネートおよびホストリエステルが挙げられる。一実施形態では、リン酸骨格部分中の非架橋リン酸酸素原子の1つが、以下の基のいずれかによって置換され得る：イオウ（S）、セレン（Se）、 BR_3 （式中、Rは、例えば、水素、アルキル、またはアリールであり得る）、C（例えば、アルキル基、アリール基など）、H、 NR_2 （式中、Rは、例えば、水素、アルキル、またはアリールであり得る）、またはOR（式中、Rは、例えば、アルキルまたはアリールであり得る）。未修飾リン酸基中の亜リン酸原子は、アキラルである。しかし、上の原子または原子群の1つによる非架橋酸素の1つの置換は、亜リン酸原子をキラルにし得て；すなわち、このようにして修飾されたリン酸基中の亜リン酸原子が、立体中心である。ステレオジェン亜リン酸原子は、「R」構造（本明細書のRp）または「S」構造（本明細書のSp）のどちらかを有し得る。

10

【0749】

ホスホロジチオエートは、双方の非架橋酸素がイオウで置換されている。ホスホロジチオエートのリン中心はアキラルであり、それは、オリゴリボヌクレオチドジアステレオマーの形成を排除する。一実施形態では、非架橋酸素の片方または双方の修飾はまた、S、Se、B、C、H、N、およびOR（Rは、例えば、アルキルまたはアリールであり得る）から独立して選択される基による、非架橋酸素の置換も含み得る。

20

【0750】

リン酸塩リンカーはまた、窒素（架橋ホスホロアミデート）、イオウ（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）による、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素）の置換によって修飾され得る。置換は、どちらかの連結酸素で、または双方の連結酸素で起こり得る。

【0751】

リン酸基の置換

リン酸基は、リン非含有コネクターによって置換され得る。一実施形態では、荷電リン酸基は、中性部分によって置換され得る。

【0752】

リン酸基を置換し得る部分の例としては、制限なしに、例えば、メチルホスホネート、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、炭酸塩、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、酸化エチレンリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノが挙げられる。

30

【0753】

リボリン酸骨格の置換

核酸を模倣し得るスキュフォールドもまた構築され得て、その中では、リン酸リンカーおよびリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチドサロゲートによって置換される。一実施形態では、核酸塩基は、サロゲート骨格によって係留され得る。例としては、制限なしに、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸（PNA）ヌクレオシドサロゲートが挙げられる。

40

【0754】

糖修飾

修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、糖類に1つまたは複数の修飾を含み得る。例えば、2'ヒドロキシル基（OH）は、いくつかの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基で、修飾または置換され得る。一実施形態では、2'ヒドロキシル基の修飾は核酸の安定性を高め得るが、それは、ヒドロキシルが、もはや脱プロトン化して、2'-アルコキシドイオンを形成し得ないためである。2'-アルコキシドは、リンカーリン原子上の分

50

子内求核攻撃によって、分解を触媒し得る。

【0755】

「オキシ」-2'ヒドロキシル基修飾の例としては、アルコキシまたはアリアルオキシ（OR、式中、「R」は、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアルまたは糖であり得る）；ポリエチレングリコール（PEG）、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ （式中、Rは、例えば、Hまたは任意選択的に置換されたアルキルであり得る、nは、0~20（例えば、0~4、0~8、0~10、0~16、1~4、1~8、1~10、1~16、1~20、2~4、2~8、2~10、2~16、2~20、4~8、4~10、4~16、および4~20）の整数であり得る）が挙げられる。一実施形態では、「オキシ」-2'ヒドロキシル基修飾は、「ロックド」核酸（LNA）を含み得る、その中では、2'ヒドロキシルが、例えば、 G_{1-6} アルキレンまたは C_{1-6} ヘテロアルキレン架橋によって同一リボース糖の4'炭素に連結され得る、代表的な架橋としては、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋；O-アミノ（式中、アミノは、例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、またはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得る）、およびアミノアルコキシ、 $O(CH_2)_n$ -アミノ、（式中、アミノは、例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、またはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得る）が挙げられる。一実施形態では、「オキシ」-2'ヒドロキシル基修飾としては、メトキシエチル基（MOE）、 $(OCH_2CH_2OCH_3)$ 、例えば、PEG誘導体）が挙げられる。

【0756】

「デオキシ」修飾としては、水素（すなわち、例えば、部分的dsRNAのオーバーハング部分のデオキシリボース糖）；ハロ（例えば、ブromo、クロロ、フルオロ、またはヨード）；アミノ（式中、アミノは、例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、ジヘテロアリアルアミノ、またはアミノ酸であり得る）； $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -アミノ（式中、アミノは、例えば、本明細書に記載されるようであり得る）、 $-NH-C(O)R$ （式中、Rは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアルまたは糖であり得る）、シアノ；メルカプト；アルキルチオールアルキル；チオアルコキシ；および本明細書に記載されるようなアミノで任意選択的に置換されてもよい、アルキル、シクロアルキル、アリアル、アルケニル、およびアルキニルが挙げられる。

【0757】

糖類は、リボース中の対応する炭素と逆の立体化学的配置を有する、1つまたは複数の炭素もまた含有し得る。したがって、修飾核酸としては、例えば、糖としてアラビノースを含有するヌクレオチドが挙げられる。ヌクレオチド「単量体」は、例えば、 α ヌクレオシドなど、糖の1'位に α 結合を有し得る。修飾核酸としては、C-1'の核酸塩基を欠失している「脱塩基」糖もまた挙げられる。これらの脱塩基糖はまた、構成糖原子の1つまたは複数でさらに修飾され得る。修飾核酸としてはまた、例えばL-ヌクレオシドなどのL形態の1つまたは複数の糖も挙げられる。

【0758】

一般に、RNAは、酸素を有する5員環である糖類リボースを含む。代表的な修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドとしては、制限なしに、リボース中の酸素の置換（例えば、イオウ（S）、セレン（Se）、または例えば、メチレンまたはエチレンなどのアルキレンによる）；二重結合の付加（例えば、リボースをシクロペンテニルまたはシクロヘキセニルで置換する）；リボース環縮小（例えば、シクロブタンまたはオキセタンの4員環を形成する）；リボース環拡大（例えば、アンヒドロヘキシトール、アルトリトール、マンニトール、シクロヘキサニル、シクロヘキセニル、ホスホロアミダート骨格もまた有するモルホリノなどの追加的な炭素またはヘテロ原子を有する6または7員環を形成する

）が挙げられる。一実施形態では、修飾ヌクレオチドとしては、多環形態（例えば、トリシクロ；および（例えば、リボースがリン酸ジエステル結合に付着するグリコール単位で置換される R-GNA または S-GNA などの）グリコール核酸（GNA）などの「アンロックド」形態、トレオース核酸（TNA、リボースが α -L-トレオフラノシルー（3' → 2'）で置換される）が挙げられる。

【0759】

核酸塩基上の修飾

修飾核酸に組み込まれ得る、本明細書に記載される修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、修飾核酸塩基を含み得る。核酸塩基の例としては、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、およびウラシル（U）が挙げられるが、これに限定されるものではない。これらの核酸塩基は、修飾または完全に置換されて、修飾核酸に組み込まれ得る、修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドを提供し得る。ヌクレオチドの核酸塩基は、プリン、ピリミジン、プリンまたはピリミジンアナログから独立して選択され得る。一実施形態では、核酸塩基としては、例えば、天然に存在する塩基の合成誘導体が挙げられる。

【0760】

ウラシル

一実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾ウラシルである。修飾ウラシルを有する代表的な核酸塩基およびヌクレオシドとしては、制限なしに、プソイドウリジン（ ψ ）、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-アザウリジン、6-アザウリジン、2-チオ-5-アザウリジン、2-チオウリジン（ $s2U$ ）、4-チオウリジン（ $s4U$ ）、4-チオプソイドウリジン、2-チオプソイドウリジン、5-ヒドロキシウリジン（ ho^5U ）、5-アミノアリルウリジン、5-ハロウリジン（例えば、5-ヨードウリジンまたは5-ブロモウリジン）、3-メチルウリジン（ m^3U ）、5-メトキシウリジン（ mo^5U ）、ウリジン5-オキシ酢酸（ cmo^5U ）、ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル（ $mcmo^5U$ ）、5-カルボキシメチルウリジン（ cm^5U ）、1-カルボキシメチルプソイドウリジン、5-カルボキシヒドロキシメチルウリジン（ chm^5U ）、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（ $mchm^5U$ ）、5-メトキシカルボニルメチルウリジン（ mcm^5U ）、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン（ mcm^5s2U ）、5-アミノメチル-2-チオウリジン（ nm^5s2U ）、5-メチルアミノメチルウリジン（ mnm^5U ）、5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン（ mnm^5s2U ）、5-メチルアミノメチル-2-セレン含有ウリジン（ mnm^5se^2U ）、5-カルバモイルメチルウリジン（ ncm^5U ）、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン（ $cmnm^5U$ ）、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン（ $cmnm^5s2U$ ）、5-プロピニルウリジン、1-プロピニルプソイドウリジン、5-タウリノメチルウリジン（ τcm^5U ）、1-タウリノメチルプソイドウリジン、5-タウリノメチル-2-チオウリジン（ τm^5s2U ）、1-タウリノメチル-4-チオプソイドウリジン、5-メチルウリジン（ m^5U 、すなわち、核酸塩基デオキシチミジン（ $deoxythymine$ ）を有する）、1-メチルプソイドウリジン（ $m^1\psi$ ）、5-メチル-2-チオウリジン（ m^5s2U ）、1-メチル-4-チオプソイドウリジン（ $m^1s^4\psi$ ）、4-チオ-1-メチルプソイドウリジン、3-メチルプソイドウリジン（ $m^3\psi$ ）、2-チオ-1-メチルプソイドウリジン、1-メチル-1-デアザプソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザプソイドウリジン、ジヒドロウリジン（D）、ジヒドロプソイドウリジン、5,6-ジヒドロウリジン、5-メチルジヒドロウリジン（ m^5D ）、2-チオジヒドロウリジン、2-チオジヒドロプソイドウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオウリジン、4-メトキシプソイドウリジン、4-メトキシ-2-チオプソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、3-（3-アミノ-3-カルボキシプロピル）ウリジン（ acp^3U ）、1-メチル-3-（3-アミノ-3-カルボキシプロピル）プソイドウリジン（ $acp^3\psi$ ）、5-（イソペ

10

20

30

40

50

ンテニルアミノメチル) ウリジン ($i n m^5 U$)、5-(イソペンテニルアミノメチル)-2-チオ-ウリジン ($i n m^5 s 2 U$)、 α -チオ-ウリジン、2'-O-メチル-ウリジン ($U m$)、5, 2'-O-ジメチル-ウリジン ($n^5 U m$)、2'-O-メチル-プソイドウリジン (ψm)、2-チオ-2'-O-メチル-ウリジン ($s 2 U m$)、5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチル-ウリジン ($m c n^5 U m$)、5-カルバモイルメチル-2'-O-メチル-ウリジン ($n c n^5 U m$)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチル-ウリジン ($c m n n^5 U m$)、3, 2'-O-ジメチル-ウリジン ($n^5 U m$)、5-(イソペンテニルアミノメチル)-2'-O-メチル-ウリジン ($i n n^5 U m$)、1-チオ-ウリジン、デオキシチミジン、2'-F-アラ-ウリジン、2'-F-ウリジン、2'-OH-アラ-ウリジン、5-(2-カルボメトキシビニル)ウリジン、5-[3-(1-E-プロペニルアミノ)ウリジン、ピラゾロ[3, 4-d]ピリミジン、キサンチン、およびヒポキサンチンが挙げられる。

【0761】

シトシン

一実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾シトシンである。修飾シトシンを有する代表的な核酸塩基およびヌクレオシドとしては、制限なしに、5-アザ-シチジン、6-アザ-シチジン、プソイドイソシチジン、3-メチル-シチジン ($m^3 C$)、N4-アセチル-シチジン ($a c t$)、5-ホルミル-シチジン ($f^5 C$)、N4-メチル-シチジン ($m^4 C$)、5-メチル-シチジン ($m^5 C$)、5-ハロ-シチジン (例えば、5-ヨード-シチジン)、5-ヒドロキシメチル-シチジン ($h m^5 C$)、1-メチル-プソイドイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-プソイドイソシチジン、2-チオ-シチジン ($s 2 C$)、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオ-プソイドイソシチジン、4-チオ-1-メチル-プソイドイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチル-ゼブラリン、5-アザ-2-チオ-ゼブラリン、2-チオ-ゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-プソイドイソシチジン、4-メトキシ-1-メチル-プソイドイソシチジン、リシジン ($k^2 C$)、 α -チオ-シチジン、2'-O-メチル-シチジン ($C m$)、5, 2'-O-ジメチル-シチジン ($m^5 C m$)、N4-アセチル-2'-O-メチル-シチジン ($a c^4 C m$)、N4, 2'-O-ジメチル-シチジン ($n^5 C m$)、5-ホルミル-2'-O-メチル-シチジン ($f^5 C m$)、N4, N4, 2'-O-トリメチル-シチジン ($n^5_2 C m$)、1-チオ-シチジン、2'-F-アラ-シチジン、2'-F-シチジン、および2'-OH-アラ-シチジンが挙げられる。

【0762】

アデニン

一実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾アデニンである。修飾アデニンを有する代表的な核酸塩基およびヌクレオシドとしては、制限なしに、2-アミノ-プリン、2, 6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-ハロ-プリン (例えば、2-アミノ-6-クロロ-プリン)、6-ハロ-プリン (例えば、6-クロロ-プリン)、2-アミノ-6-メチル-プリン、8-アジド-アデノシン、7-デアザ-アデノシン、7-デアザ-8-アザ-アデノシン、7-デアザ-2-アミノ-プリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノ-プリン、7-デアザ-2, 6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2, 6-ジアミノプリン、1-メチル-アデノシン ($m^1 A$)、2-メチル-アデノシン ($m^2 A$)、N6-メチル-アデノシン ($m^6 A$)、2-メチルチオ-N6-メチル-アデノシン ($m s 2 m^6 A$)、N6-イソペンテニル-アデノシン ($i^6 A$)、2-メチルチオ-N6-イソペンテニル-アデノシン ($m s^2 i^6 A$)、N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン ($i o^6 A$)、2-メチルチオ-N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン ($m s^2 i o^6 A$)、N6-グリシジルカルバモイル ($g l y c i n y l c a r b a m o y l$)-アデノシン ($g^6 A$)、N6-スレオニルカルバモイル-アデノシン ($t^6 A$)、N6-メチル-N6-スレオニルカルバモイル-アデノシン ($m^6 t^6 A$)、2-

10

20

30

40

50

メチルチオ-N⁶-スレオニルカルバモイル-アデノシン ($m s^2 g^6 A$)、N⁶, N⁶-ジメチル-アデノシン ($m^6_2 A$)、N⁶-ヒドロキシノルバリルカルバモイル-アデノシン ($h n^6 A$)、2-メチルチオ-N⁶-ヒドロキシノルバリルカルバモイル-アデノシン ($m s^2 h n^6 A$)、N⁶-アセチル-アデノシン ($a c^6 A$)、7-メチル-アデノシン、2-メチルチオ-アデノシン、2-メトキシ-アデノシン、 α -チオ-アデノシン、2'-O-メチル-アデノシン ($A m$)、N⁶, 2'-O-ジメチル-アデノシン ($m^6 A m$)、N⁶-メチル-2'-デオキシアデノシン、N⁶, N⁶, 2'-O-トリメチル-アデノシン ($m^6_2 A m$)、1, 2'-O-ジメチル-アデノシン ($m^6 A m$)、2'-O-リボシルアデノシン (リン酸塩) ($A r (p)$)、2-アミノ-N⁶-メチル-プリン、1-チオ-アデノシン、8-アジド-アデノシン、2'-F-アラ-アデノシン、2'-F-アデノシン、2'-OH-アラ-アデノシン、およびN⁶-(19-アミノ-ペンタオキサノンアデシル)-アデノシンが挙げられる。

【0763】

グアニン

一実施形態では、修飾核酸塩基は、修飾グアニンである。修飾グアニンを有する代表的な核酸塩基およびヌクレオシドとしては、制限なしに、イノシン (I)、1-メチル-イノシン ($m^1 I$)、ワイオシン ($i m G$)、メチルワイオシン ($m i m G$)、4-デメチル-ワイオシン ($i m G-14$)、イソワイオシン ($i m G 2$)、ウィブトシン ($y W$)、ペルオキシウィブトシン ($o_2 y W$)、ヒドロキシウィブトシン ($O H y W$)、低修飾ヒドロキシウィブトシン ($O H y W^*$)、7-デアザ-グアノシン、クエオシン (Q)、エポキシクエオシン ($o Q$)、ガラクトシル-クエオシン ($g a l Q$)、マンノシル-クエオシン ($m a n Q$)、7-シアノ-7-デアザ-グアノシン ($p r e Q_0$)、7-アミノメチル-7-デアザ-グアノシン ($p r e Q_1$)、アルカエオシン (G^+)、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン ($m^7 G$)、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチル-イノシン、6-メトキシ-グアノシン、1-メチル-グアノシン ($m^1 G$)、N²-メチル-グアノシン ($m^2 G$)、N², N²-ジメチル-グアノシン ($m^2_2 G$)、N², 7-ジメチル-グアノシン ($m^2, 7 G$)、N², N², 7-ジメチル-グアノシン ($m^2, 2, 7 G$)、8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシン、1-メチル-6-チオ-グアノシン、N²-メチル-6-チオ-グアノシン、N², N²-ジメチル-6-チオ-グアノシン、 α -チオ-グアノシン、2'-O-メチル-グアノシン ($G m$)、N²-メチル-2'-O-メチル-グアノシン ($m^2 G m$)、N², N²-ジメチル-2'-O-メチル-グアノシン ($m^2_2 G m$)、1-メチル-2'-O-メチル-グアノシン ($m^1 G m$)、N², 7-ジメチル-2'-O-メチル-グアノシン ($m^2, 7 G m$)、2'-O-メチル-イノシン ($I m$)、1, 2'-O-ジメチル-イノシン ($m^1 I m$)、⁶O-フェニル-2'-デオキシイノシン、2'-O-リボシルグアノシン (リン酸塩) ($G r (p)$)、1-チオ-グアノシン、 ϕ -メチル-グアノシン、O⁶-メチル-2'-デオキシグアノシン、2'-F-アラ-グアノシン、および2'-F-グアノシンが挙げられる。

【0764】

代表的修飾 gRNA

いくつかの実施形態では、修飾核酸は修飾 gRNA であり得る。本明細書に記載される gRNA のいずれでも、このセクションに従って修飾され得るものと理解される。本明細書で考察されるように、一過性発現核酸または送達された核酸は、例えば、細胞ヌクレアーゼによる分解を被りやすい。従って、一態様では、本明細書に記載される修飾 gRNA は、ヌクレアーゼに対する安定性を導入する1つまたは複数の修飾ヌクレオシドもしくはヌクレオチドを含んでもよい。本明細書に記載されるこれらの、またはその他の修飾 gRNA は、特定の細胞型 (例えば、T細胞などの循環細胞) について増強された安定性を呈示し、それが、認められる改善の原因ではないかと考えられる。

【0765】

例えば、本明細書で考察されるように、gRNAの5'末端が、真核細胞mRNAキャップ構造またはキャップアナログの含有により修飾されると、特定の細胞型（例えば、T細胞）における遺伝子の生体外編集の改善が認められた。本開示は、5'キャッピングgRNAで観察された改善が、その他の様式で修飾されたgRNAに拡張されて、同一タイプの構造的または機能的結果が達成され得るという認識を包含する（例えば、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドの組み入れによって、または生体外転写gRNAが仔ウシ腸管アルカリホスファターゼなどのホスファターゼによる処理によって修飾され、5'三リン酸基が除去される場合など）。本明細書に記載される修飾gRNAは、ヌクレアーゼに対する安定性を導入する（例えば、修飾ヌクレオシドもしくはヌクレオチドおよび／または3'ポリAテールの含有により）1つまたは複数の修飾（例えば、修飾ヌクレオシドもしくはヌクレオチド）を含有してもよい。

10

【0766】

従って、一態様では、本明細書で考察される方法および組成物は、その5'末端またはその付近（例えば、それらの5'末端の1~10、1~5、または1~2ヌクレオチド以内）で修飾されているgRNAを用いることによって特定の細胞の遺伝子編集（例えば、生体外遺伝子編集）するための方法および組成物を提供する。いくつかの実施形態では、gRNA分子の5'末端は、5'三リン酸基が欠失している。いくつかの実施形態では、標的化ドメインの5'末端は、5'三リン酸基が欠失している。いくつかの実施形態では、gRNA分子の5'末端は、5'キャップを含む。いくつかの実施形態では、標的化ドメインの5'末端は、5'キャップを含む。いくつかの実施形態では、gRNA分子は、5'三リン酸基が欠失している。いくつかの実施形態では、gRNA分子は、標的化ドメインを含み、標的化ドメインの5'末端は、5'三リン酸基が欠失している。いくつかの実施形態では、gRNA分子は、5'キャップを含む。いくつかの実施形態では、gRNA分子は、標的化ドメインを含み、標的化ドメインの5'末端は、5'キャップを含む。

20

【0767】

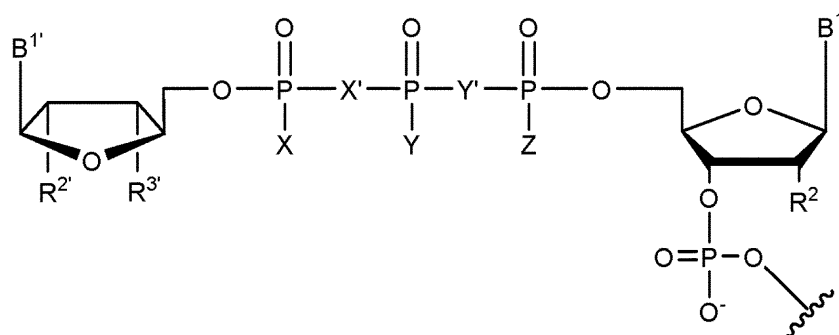
一実施形態では、gRNAの5'末端は、真核生物mRNAキャップ構造またはキャップアナログ（例えば、限定はしないが、G(5')ppp(5')Gキャップアナログ、m7G(5')ppp(5')Gキャップアナログ、または3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')Gアンチリバースキャップアナログ（ARCA））の含有により修飾される。特定の

30

の実施形態では、5'キャップは、修飾グアニンヌクレオチドを含み、これは、5'-5'三リン酸結合を介してgRNA分子の残りと連結されている。いくつかの実施形態では、5'キャップは、2つの任意選択的に修飾されたグアニンヌクレオチドを含み、これらは、5'-5'三リン酸結合を介して連結されている。いくつかの実施形態では、gRNA分子の5'末端は、化学式：

【0768】

【化7】



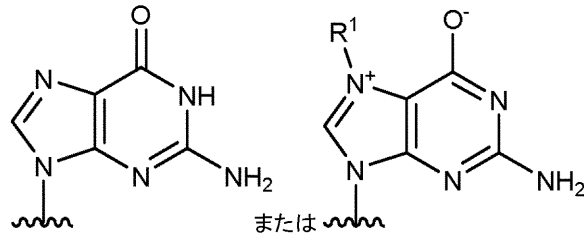
40

（式中、

B¹およびB¹'の各々は、独立して

50

【化 8】



であり、

各 R^1 は、独立して、任意選択的にフェニルもしくは 6 員ヘテロアリールにより置換された $C_{1\sim 4}$ アルキルであり；

R^2 、 $R^{2'}$ 、および R^3 の各々は、独立して、H、F、OH、もしくは $O-C_{1\sim 4}$ アルキルであり；

X、Y および Z の各々は、独立して、O または S であり；

X' および Y' の各々は、独立して、O または $C_{1\sim 4}$ である）

を有する。

【0769】

一実施形態では、各 R^1 は、独立して、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、または $-CH_2C_6H_5$ である。

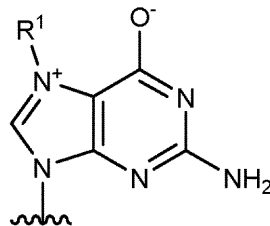
【0770】

一実施形態では、 R^1 は、 $-CH_3$ である。

【0771】

一実施形態では、 B^1 は、

【化 9】



である。

【0772】

一実施形態では、 R^2 、 $R^{2'}$ 、および R^3 の各々は、独立して、H、OH、または $O-CH_3$ である。

【0773】

一実施形態では、X、Y、および Z の各々は、O である。

【0774】

一実施形態では、X' および Y' は、O である。

【0775】

一実施形態では、gRNA 分子の 5' 末端は、化学式：

10

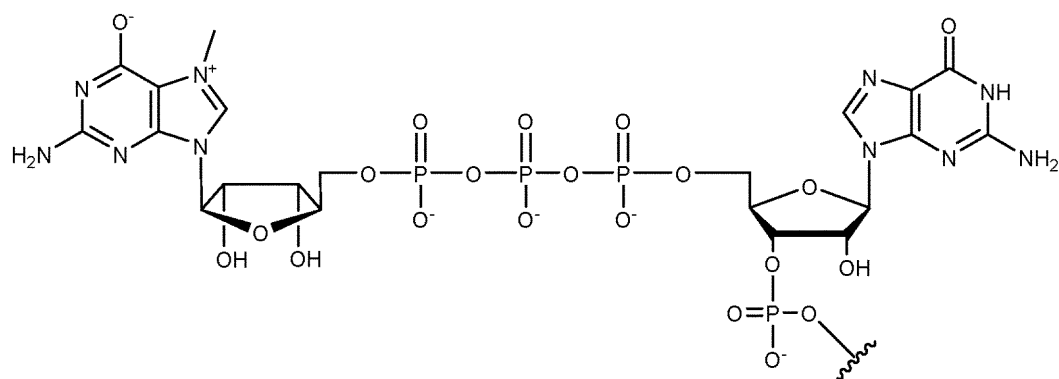
20

30

40

50

【化 10】



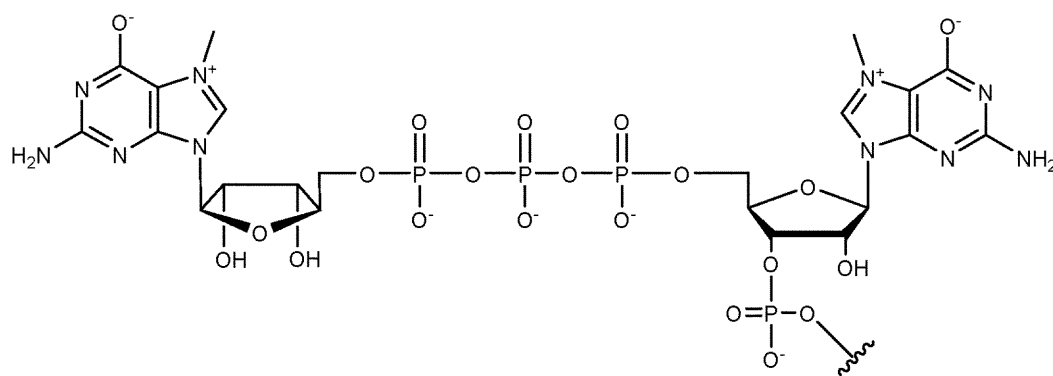
10

を有する。

【0776】

一実施形態では、gRNA分子の5'末端は、化学式：

【化 11】



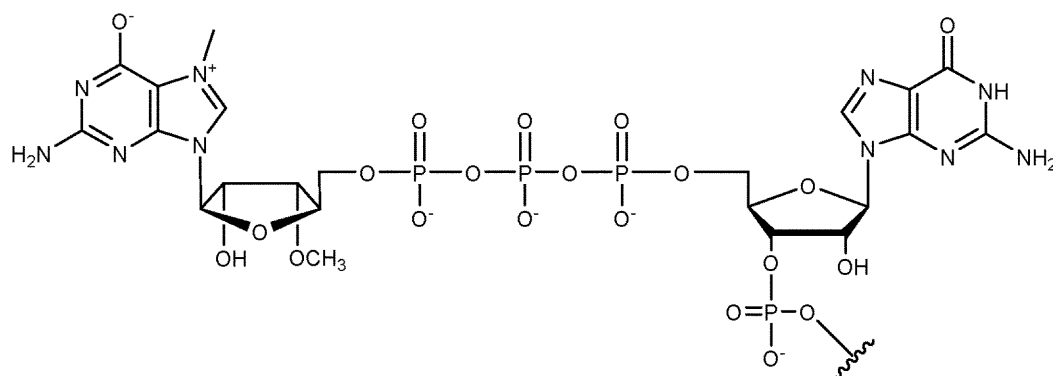
20

を有する。

【0777】

一実施形態では、gRNA分子の5'末端は、化学式：

【化 12】



40

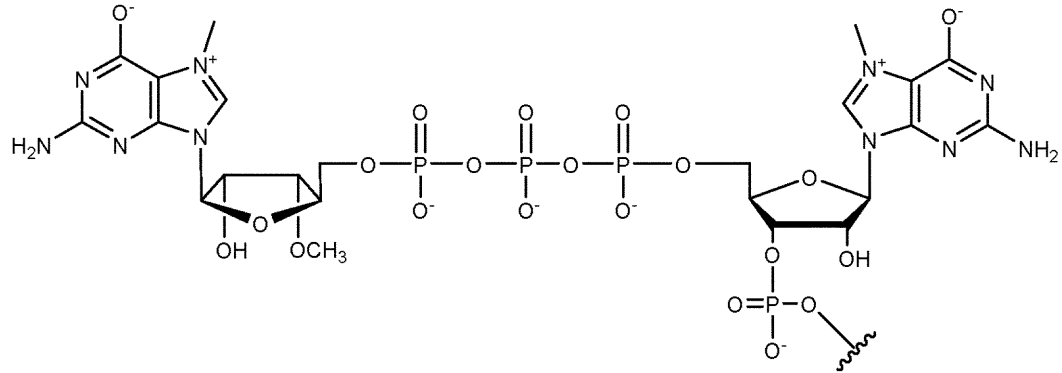
を有する。

【0778】

一実施形態では、gRNA分子の5'末端は、化学式：

50

【化 1 3】



10

を有する。

【0779】

一実施形態では、Xは、Sであり、YおよびZは、Oである。

【0780】

一実施形態では、Yは、Sであり、XおよびZは、Oである。

【0781】

一実施形態では、Zは、Sであり、XおよびYは、Oである。

20

【0782】

一実施形態では、ホスホロチオエートは、Spジアステレオマーである。

【0783】

一実施形態では、X'は、CH₂であり、Y'は、Oである。

【0784】

一実施形態では、X'は、Oであり、Y'は、CH₂である。

【0785】

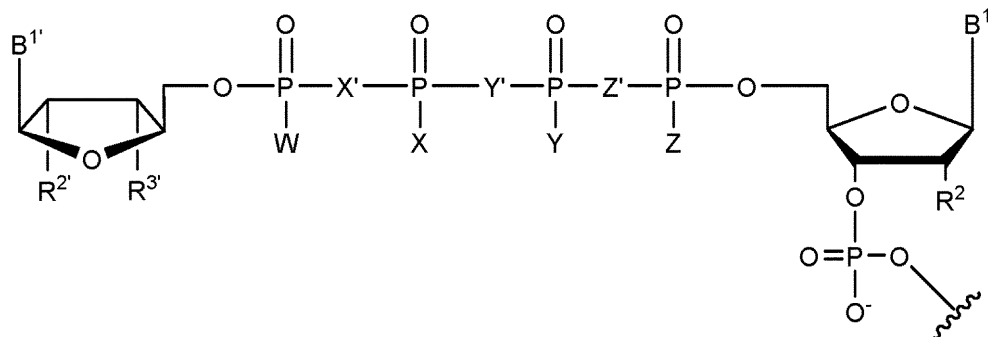
一実施形態では、5'キャップは、任意選択的に修飾された5'-5'四リン酸結合を介して連結される、2つの任意選択的に修飾されたグアニンヌクレオチドを含む。

【0786】

一実施形態では、gRNA分子の5'末端は、化学式：

30

【化 1 4】



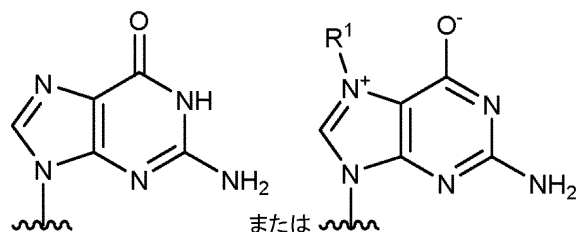
40

(式中、

B¹およびB¹'の各々は、独立して

50

【化 15】



であり、

各 R^1 は、独立して、任意選択的にフェニルもしくは 6 員ヘテロアリールにより置換された $C_{1\sim 4}$ アルキルであり；

R^2 、 $R^{2'}$ 、および R^3 の各々は、独立して、H、F、OH、もしくは $O-C_{1\sim 4}$ アルキルであり；

W、X、Y、および Z の各々は、独立して、O または S であり；

X' 、 Y' 、および Z' の各々は、独立して、O または S である）

を有する。

【0787】

一実施形態では、各 R^1 は、独立して、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、または $-CH_2C_6H_5$ である。

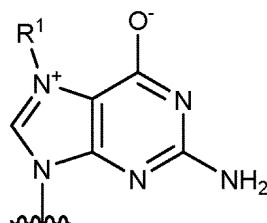
【0788】

一実施形態では、 R^1 は、 $-CH_3$ である。

【0789】

一実施形態では、 B^1 は、

【化 16】



である。

【0790】

一実施形態では、 R^2 、 $R^{2'}$ 、および R^3 の各々は、独立して、H、OH、または $O-CH_3$ である。

【0791】

一実施形態では、W、X、Y、および Z の各々は、O である。

【0792】

一実施形態では、 X' 、 Y' 、および Z' の各々は、O である。

【0793】

一実施形態では、 X' は、 CH_2 であり、 Y' および Z' は、O である。

【0794】

一実施形態では、 Y' は、 CH_2 であり、 X' および Z' は、O である。

【0795】

一実施形態では、 Z' は、 CH_2 であり、 X' および Y' は、O である。

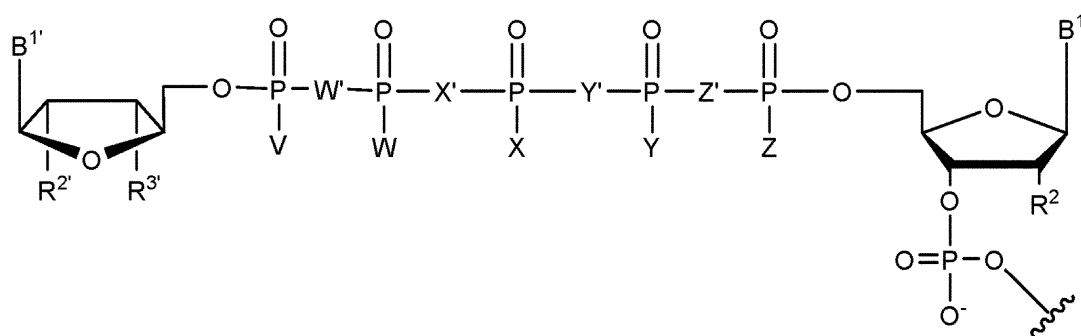
【0796】

一実施形態では、5' キャップは、任意選択的に修飾された 5' - 5' 五リン酸結合を介して連結される、2 つの任意選択的に修飾されたグアニンヌクレオチドを含む。

【 0 7 9 7 】

一実施形態では、gRNA分子の5'末端は、化学式：

【化 1 7】

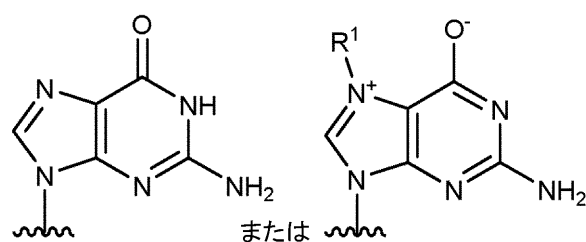


10

(式中、

B^1 および B^1' の各々は、独立して

【化 1 8】



20

であり、

各 R¹ は、独立して、任意選択的にフェニルもしくは 6 員ヘテロアリールにより置換された C₁~₄ アルキルであり；

R^2 、 $R^{2'}$ 、および R^3 の各々は、独立して、H、F、OH、もしくは $O-C_1 \sim 4$ アルキルであり；

V、W、X、Y、およびZの各々は、独立して、0またはSであり；

W'、X'、Y'、およびZ'の各々は、独立して、0またはである)

を有する。

【 0 7 9 8 】

一実施形態では、各 R^1 は、独立して、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、または $-CH_2C_6H_5$ である。

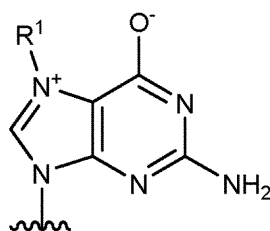
【 0 7 9 9 】

一実施形態では、 R^1 は、 $-CH_3$ である。

【 0 8 0 0 】

一実施形態では、 B^1 は、

【化 19】



40

である。

50

【0801】

一実施形態では、 R^2 、 $R^{2'}$ 、および R^3 の各々は、独立して、H、OH、または $-\text{O}-\text{CH}_3$ である。

【0802】

一実施形態では、V、W、X、Y、およびZの各々は、Oである。

【0803】

一実施形態では、 W' 、 X' 、 Y' 、および Z' の各々は、Oである。

【0804】

本明細書の用法では、用語「5' キャップ」は、伝統的なmRNA 5' キャップ構造を含むが、これらのアナログも含むと理解すべきである。例えば、上に示される化学構造によって含まれる5' キャップ構造に加えて、例えば、メチレンービス（リン酸）部分を有する四リン酸アナログ（例えば、Rydzik, A M et al., (2009) Org Biomol Chem 7 (22): 4763-76を参照）、非架橋酸素のイオウによる置換を有するアナログ（例えば、Grudzien-Nogalska, E. et al., (2007) RNA 13 (10): 1745-1755を参照）、N7-ベンジル化ジヌクレオシド四リン酸アナログ（例えば、Grudzien, E. et al., (2004) RNA 10 (9): 1479-1487を参照）、またはアンチリバースキャップアナログ（例えば、米国特許第7,074,596号明細書およびJemielity, J. et al., (2003) RNA 9 (9): 1108-1122 およびStepinski, J. et al., (2001) RNA 7 (10): 1486-1495を参照）を使用してもよい。本出願はさらに、OHまたはOMeの代わりにハロゲン基を含むキャップアナログ（例えば、米国特許第8,304,529号明細書を参照）；少なくとも1つのホスホロチオエート（PS）結合を含むキャップアナログ（例えば、米国特許第8,153,773号明細書およびKowalska, J. et al., (2008) RNA 14 (6): 1119-1131を参照）；および少なくとも1つのボラノホスフェートまたはホスホロチオエート結合を含むキャップアナログ（例えば、米国特許第8,519,110号明細書を参照）；ならびにアルキニル誘導体化5' キャップアナログ（例えば、米国特許第8,969,545号明細書を参照）の使用も包含する。

【0805】

通常、5' キャップは、gRNAの化学合成または生体外転写のどちらかの間に組み入れ得る。一実施形態では、5' キャップは使用されず、gRNA（例えば、生体外転写gRNA）が代わりにホスファターゼ（例えば、仔ウシ腸管アルカリホスファターゼ）による処理によって修飾され、5' 三リン酸基が除去される。

【0806】

本明細書で考察される方法および組成物は、3' ポリAテールを含むgRNAを用いることによって遺伝子編集するための方法および組成物も提供する。こうしたgRNAは、例えば、gRNA分子前駆体のインビトロ転写後に、ポリアデノシンポリメラーゼを用いてgRNA分子前駆体にポリAテールを付加することにより、調製することができる。例えば、一実施形態では、大腸菌（E. coli）ポリAポリメラーゼ（E-PAP）などのポリメラーゼを用いて、ポリAテールを酵素的に付加することができる。また、ポリAテールを含むgRNAは、DNAテンプレートからのインビトロ転写によっても調製され得る。一実施形態では、限定的長さのポリAテールがDNAテンプレート上にコードされて、RNAポリメラーゼ（T7 RNAポリメラーゼなど）を介してgRNAと共に転写される。ポリAテールを含むgRNAは、RNAリガーゼまたはDNAリガーゼ（gRNA分子前駆体およびポリAオリゴヌクレオチドと相補的なスプリントDNAオリゴヌクレオチドを含むか、もしくは含まない）を用いたインビトロ転写後に、ポリAオリゴヌクレオチドをgRNA分子前駆体と連結させることによって調製することもできる。例えば、一実施形態では、限定的長さのポリAテールは、合成オリゴヌクレオチドとして合成され、gRNAの3' 末端で、RNAリガーゼまたはDNAリガーゼ（ガイドRNAおよびポリAオ

10

20

30

40

50

リゴヌクレオチドに相補的なスプリントオリゴヌクレオチドを含むか、もしくは含まない)のいずれかと連結される。ポリAテールを含むgRNAは、1部または複数部として合成により調製することも可能であり、これらは、1つまたは複数のスプリントDNAオリゴヌクレオチドを含むか、もしくは含まないRNAリガーゼまたはDNAリガーゼのいずれかによって互いに連結される。

【0807】

いくつかの実施形態では、ポリAテールは、50アデニンヌクレオチド未満、例えば、45アデニンヌクレオチド未満、40アデニンヌクレオチド未満、35アデニンヌクレオチド未満、30アデニンヌクレオチド未満、25アデニンヌクレオチド未満または20アデニンヌクレオチド未満を含む。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、5～50アデニンヌクレオチド、例えば、5～40アデニンヌクレオチド、5～30アデニンヌクレオチド、10～50アデニンヌクレオチド、または15～25アデニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、約20アデニンヌクレオチドを含む。

【0808】

さらに、本明細書で考察される方法および組成物は、本明細書に記載される1つまたは複数の修飾ヌクレオチドまたはヌクレオチドを含むgRNAを用いることにより、遺伝子編集(例えば、生体外遺伝子編集)のための方法および組成物も提供する。

【0809】

このセクションで考察される例示的な修飾のいくつかは、gRNA配列内のどの位置に含有させてもよいが、いくつかの実施形態では、gRNAは、その5'末端またはその付近(例えば、その5'末端の1～10、1～5、もしくは1～2ヌクレオチド以内)に修飾を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、その3'末端またはその付近(例えば、その3'末端の1～10、1～5、もしくは1～2ヌクレオチド以内)に修飾を含む。いくつかの実施形態では、gRNAは、その5'末端またはその付近の修飾とその3'末端またはその付近の修飾の双方を含む。例えば、いくつかの実施形態では、gRNA分子(例えば、インビトロ転写gRNA)は、真核生物細胞に発現される遺伝子からの標的ドメインと相補的な標的化ドメインを含み、ここで、gRNA分子は、その5'末端で修飾され、3'末端ポリAテールを含む。gRNA分子は、例えば、5'三リン酸基が欠失してもよい(例えば、標的化ドメインの5'末端は、5'三リン酸基が欠失している)。一実施形態では、gRNA(例えば、インビトロ転写gRNA)は、5'三リン酸基を除去し、かつ本明細書で記載するような3'ポリAテールを含むように、ホスファターゼ(例えば、仔ウシ腸アルカリホスファターゼ)での処理により修飾される。あるいは、gRNA分子は、5'キャップを含んでもよい(例えば、標的化ドメインの5'末端は、5'キャップを含む)。一実施形態では、gRNA(例えば、インビトロ転写gRNA)は、本明細書に記載されるような5'キャップ構造またはキャップアナログと3'ポリAテールの双方を含む。いくつかの実施形態では、5'キャップは、5'-5'三リン酸結合を介してgRNA分子の残りと連結される修飾グアニンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、5'キャップは、任意選択的に修飾された5'-5'三リン酸結合を介して連結された、2つの任意選択的に修飾されたグアニンヌクレオチドを含む(例えば、前述されるように)。いくつかの実施形態では、ポリAテールは、5～50アデニンヌクレオチド、例えば、5～40アデニンヌクレオチド、5～30アデニンヌクレオチド、10～50アデニンヌクレオチド、15～25アデニンヌクレオチド、30アデニンヌクレオチド未満、25アデニンヌクレオチド未満、または約20アデニンヌクレオチドを含む。

【0810】

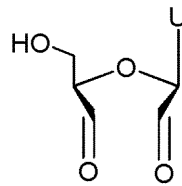
さらに別の実施形態では、本開示は、真核生物細胞で発現される遺伝子からの標的ドメインと相補的な標的化ドメインを含むgRNA分子を提供し、ここで、gRNA分子は、30アデニンヌクレオチド未満(例えば、25アデニンヌクレオチド未満、15～25アデニンヌクレオチド、または約20アデニンヌクレオチド)を含む3'ポリAテールを含む。いくつかの実施形態では、これらのgRNA分子は、さらにその5'末端でも修飾される(例えば、gRNA分子は、本明細書に記載されるように、5'リン酸基を除去するために

ホスファターゼでの処理により修飾されるか、または5'キャップを含有するように修飾される)。

【0811】

いくつかの実施形態では、gRNA分子は、3'末端ウリボースで修飾してもよい。例えば、ウリボースの2つの末端ヒドロキシル基が、アルデヒド基に酸化され得て、同時のリボース環の開環が、下に表示される(下に表示される)修飾ヌクレオシドをもたらす：

【化20】

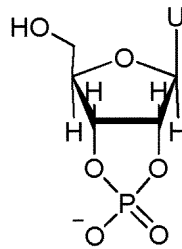


10

式中、「U」は、未修飾または修飾ウリジンであり得る。別の実施形態では、3'末端Uが、下で示されるように2'3'環状リン酸エステルで修飾され得る：

【0812】

【化21】



20

式中、「U」は、未修飾または修飾ウリジンであり得る。

【0813】

いくつかの実施形態では、gRNA分子は、例えば、本明細書に記載される修飾ヌクレオチドの1つまたは複数を組み込むことで、分解に対して安定化され得る、3'ヌクレオチドを含有してもよい。この実施形態では、例えば、ウリジンは、例えば、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、および5-ブロモウリジンで、または本明細書に記載される修飾ウリジンのいずれかなどの修飾ウリジンで置換され得て；アデノシン、シチジンおよびグアノシンは、例えば、8-ブロモグアノシンなどの8位に修飾がある修飾アデノシン、シチジンまたはグアノシンによって、または本明細書に記載される修飾アデノシン、シチジンおよびグアノシンのいずれかによって置換され得る。

30

【0814】

いくつかの実施形態では、糖修飾リボヌクレオチドがgRNAに組み込まれ得て、例えば、2'OH基が、H、OR、R(式中、Rは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリーール、アラールキル、ヘテロアリーールまたは糖であり得る)、ハロ、SH、SR(式中、Rは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリーール、アラールキル、ヘテロアリーールまたは糖であり得る)、アミノ(式中、アミノは、例えば、NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリルアミノ、アリーールアミノ、ジアアリーールアミノ、ヘテロアリーールアミノ、ジヘテロアリーールアミノ、またはアミノ酸であり得る)；またはシアノ(CN)から選択される基によって置換される。いくつかの実施形態では、リン酸骨格は、例えば、ホスホロチオエート(phosphothioate)基で、本明細書に記載されるように修飾され得る。いくつかの実施形態では、gRNAのヌクレオチドの1つまたは複数は、それぞれ独立して、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチルなどの2'-糖修飾；または例えば、2'-Fまたは2'-O-メチル、アデノシン(A)、2'-Fまたは2'-O-メチル、シチジン(C)、2'-Fまたは2'-O-メチル、ウリジン(U)、2'-Fま

40

50

たは2'-O-メチル、チミジン(T)、2'-Fまたは2'-O-メチルをはじめとする2'-フルオロ修飾；グアノシン(G)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン(Teo)、2'-O-メトキシエチルアデノシン(Aeo)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン(m5Ceo)、および任意のそれらの組み合わせをはじめとするが、これに限定されるものではない、修飾または未修飾ヌクレオチドであり得る。

【0815】

いくつかの実施形態では、gRNAとしては「ロックド」核酸(LNA)が挙げられ、その中では、2'-OH基が、例えばC1~6アルキレンまたはC1~6ヘテロアルキレン架橋によって、同一リボース糖上の4'炭素と結合し得て代表的架橋としては、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋；O-アミノ(アミノは、例えば、NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得る)、およびアミノアルコキシまたはO(CH₂)_n-アミノ(アミノは、例えば、NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得る)が挙げられる。

【0816】

いくつかの実施形態では、gRNAとしては、多環である修飾ヌクレオチド(例えば、トリシクロ；およびグリコール核酸(GNA)などの「アンロックド」形態(例えば、リボースが、リン酸ジエステル結合に付着するグリコール単位によって置換される、R-GNAまたはS-GNA)、またはトレオース核酸(リボースが、α-L-トレオフラノシル-(3'→2')で置換される、TNA)が挙げられる。

【0817】

一般に、gRNA分子としては、酸素を有する5員環である、糖類リボースが挙げられる。代表的な修飾gRNAsとしては、制限なしに、リボース中の酸素の置換(例えば、イオウ(S)、セレン(Se)、または例えば、メチレンまたはエチレンなどのアルキレンによる)；二重結合付加(例えば、リボースをシクロペンテニルまたはシクロヘキセニルで置換する)；リボース環縮小(例えば、シクロブタンまたはオキセタンの4員環を形成する)；リボース環拡大(例えば、アンヒドロヘキストール、アルトリトール、マンニトール、シクロヘキサニル、シクロヘキセニル、例えば、ホスホロアミダート骨格もまた有するモルホリノなどの追加的炭素またはヘテロ原子を有する6または7員環を形成する)が挙げられる。糖アナログ改変の大部分は2'位置に局在するが、4'位置をはじめとするその他の部位も修飾の対象となる。一実施形態では、gRNAは、4'-S、4'-Seまたは4'-C-アミノメチル-2'-O-Me修飾を含む。

【0818】

いくつかの実施形態では、例えば、7-デアザアデノシンなどのデアザヌクレオチドが、gRNA分子に組み込まれ得る。いくつかの実施形態では、例えば、N6-メチルアデノシンなどのO-およびN-アルキル化ヌクレオチドが、gRNAに組み込まれ得る。いくつかの実施形態では、gRNA中の1つまたは複数のまたは全てのヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチドである。

【0819】

miRNA結合部位

マイクロRNA(またはmiRNAs)は、天然細胞性19~25ヌクレオチド長の非コードRNAである。それらは、例えば、mRNAの3'UTRなどで、適切なmiRNA結合部位を有する核酸分子に結合し、遺伝子発現を下方制御する。下方制御は、核酸分子安定性の低下または翻訳阻害のどちらかである。例えば、Cas9をコードするmRNAなどの本明細書で開示されるRNA種は、例えば、その3'UTRなどに、miRNA結合部位を含み得る。miRNA結合部位は、選択された細胞型内の発現(expression)の下方制御を促進するように選択され得る。一例として、肝臓に豊富なマイクロRNAであるmiR-122に対する結合部位の組み込みは、肝臓における対象遺伝

10

20

30

40

50

子の発現を阻害し得る。

【0820】

IX. gRNA同定システムおよびデータベース

本明細書には、CRISPR/Cas9システムを用いて、対立遺伝子の編集用のgRNAを同定するためのシステム、方法およびコンピューター可読媒体が記載される。さらに、CRISPR/Cas9システムを用いて、対立遺伝子の編集用のgRNAを同定するデータベーススキーマを実行もしくは作成するためのシステム、方法およびコンピューター可読媒体が本明細書に記載される。gRNA同定システムは、ユーザー（例えば、医師もしくは医療専門家、臨床コーディネーター、医師、または対立遺伝子配列決定検査技師）が、特定の対立遺伝子を編集するのに好適なgRNAを同定することを可能にする。本明細書に記載されるように、ユーザーは、標的化移植片レシピエントと標的化移植片ドナー間の対立遺伝子マッチの数を増加するために、対立遺伝子を編集することを望む場合がある。gRNA同定システムは、レシピエント由来の対立遺伝子およびドナー候補由来の対立遺伝子に関するデータを受信し、入力からミスマッチ対立遺伝子を同定する。次に、gRNA同定システムは、データに問い合わせ、ドナー候補由来の対立遺伝子を編集するのに好適なgRNAのリストを作成する。1つまたは複数の基準に基づいてgRNAのリストをランク付けする。gRNA同定システムはまた、例えば、対立遺伝子、gRNA、ハプロタイプ、および系統情報に関するデータを保存する様々なテーブルを含むデータベーススキーマの実行も包含する。

【0821】

データベースは、現在まで記録された全てのHLA対立遺伝子変異体を保存するように構築される。これらのHLA対立遺伝子変異体の記録は、一般に入手可能であり、例えば、以下を参照されたい：<http://hla.alleles.org/alleles/index.html>, Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE, The IPDおよびIMGT/HLA databases: allele variant databases, Nucleic Acids Research (2015) 43:D423–431)。HLA対立遺伝子の記録が更新されると、データベースも更新され得る。このデータセットを用いて、MHC遺伝子座（HLA-A、-B、-C、DRB1、-DRB3/4/5、および-DQB1）の1つで存在し得る特定の単一对立遺伝子を標的化するgRNA配列が設計される。一般に入手可能なデータベース（全米骨髄バンク（National Marrow Donor Program）：<https://bioinformatics.bethematchclinical.org/HLA-Resources/Haplotype-Frequencies/High-Resolution-HLA-Alleles-and-Haplotypes-in-the-US-Population/>；<https://bioinformatics.bethematchclinical.org/HLA-Resources/Haplotype-Frequencies/Jewish-High-Resolution-Haplotype-Frequencies/>）を用いて、データベースは、個々の対立遺伝子およびハプロタイプを、これらの個々の対立遺伝子が同定されるヒト対象の異なる系統バックグラウンド（すなわち、系統、人種、民族バックグラウンド）の人に共通して存在し、かつ特異的である対立遺伝子およびハプロタイプと相互参照する。一実施形態例では、データベースは、以下の数またはそれ以上の対立遺伝子変異体を含む（同定される変異体の数は、時間が経過するにつれ、新たな患者と共に増加するため；遺伝子座当たりの対立遺伝子変異体の現在の数は、MHC遺伝子座での高い多型度の一例を示すために列記される）：HLA-A（3,094対立遺伝子）、HLA-B（3,865対立遺伝子）、HLA-C（2,618対立遺伝子）、HLA-DRB1（1,719対立遺伝子）、HLA-DRB3/4/5（95対立遺伝子）、HLA-DQB1（777対立遺伝子）。これらの対立遺伝子（ならびに、恐らく数の増加に伴いそれ以上の対立遺伝子）について、少なくとも106,234のgRNAがこのデータベースに含まれ得る。一

実施形態例では、*S. pyogenes* Cas9と一緒に用いられる gRNA の標的化ドメインの長さは、17 または 20 ヌクレオチドである。一実施形態例では、*S. aureus* Cas9と一緒に用いられる gRNA の標的化ドメインの長さは、20 または 24 ヌクレオチドである。別の実施形態では、用いようとする gRNA の標的化ドメインの長さは、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または 30 ヌクレオチドである。データベースには、ヨーロッパ系アメリカ人（例えば、白色人種）、アフリカ系アメリカ人、アジア系（パシフィックアイランダーを含む）、ヒスパニック系（例えば、ラテン系）集団およびユダヤ系統の人に検出される対立遺伝子頻度および共通のハプロタイプも含まれ得る。

【0822】

データベースを用いて、数千の対立遺伝子変異体（もしあれば）のうちの単一对立遺伝子に高度に特異的な gRNA を選択して、オフターゲット効果（対立遺伝子特異的 gRNA が、ヒト染色体配列内の他のゲノム遺伝子座の他の対立遺伝子に誤って標的化する可能性があるかどうか）を見出すことができる。さらに、データベースは、同じ gRNA による両アレル破壊を支持し得る対立遺伝子特異性を含まない個別の HLA 遺伝子座（例えば、HLA-A）を標的化する gRNA を同定することができる。一実施形態例では、ミスマッチ、部分的マッチ、もしくはハプロタイプ同一の HSPC ドナーを相互参照して、同定するために、データベースからの対立遺伝子変異体、gRNA、および系統データを、一般に入手可能な全国および国際臍帯血および骨髓ドナー造血幹／前駆細胞バンクと関連付けることができる。ミスマッチ、部分的マッチ、もしくはハプロタイプ同一の HSPC ドナー細胞は、CRISPR/Cas9 技術により編集して、ドナー細胞が、疾患の治療のために同種異系 HSPC 移植を必要とするが、ミスマッチまたは部分的マッチドナー細胞を編集することなく、マッチするドナー細胞を同定することができないレシピエント対象と後にマッチするように、HLA 遺伝子型を改変することができる。

【0823】

ユーザー（例えば、医師もしくは医療専門家、臨床コーディネーター、医師、または対立遺伝子配列決定検査技師）は、レシピエントの全ハプロタイプと関連する具体的な対立遺伝子変異体を同定するために、HLA タイピング、例えば、標的化移植片レシピエントの MHC 遺伝子座の両 HLA ハプロタイプの DNA 配列決定を提供する。公式または非公式の幹細胞ドナーデータベースから最も高い HLA マッチング度（両染色体コピー上でマッチする最多数の対立遺伝子）を有するドナー候補を検索するために、完全な HLA ハプロタイプ情報を臍帯血および骨髓幹細胞バンクに入力してもよい。公式／非公式データベースから見出された移植片レシピエントとの最も高いマッチング度を有する利用可能なドナーに基づいて、ユーザーまたはシステムは、HLA マッチングのレベルを高めるために編集する必要がある対立遺伝子を決定することができる。一旦編集されたら、ドナー細胞は、同種異系 HSCT の基準を満たす可能性があり、GVHD 発生の尤度および／または重症度が低い。gRNA 同定システムは、ユーザーが、ドナーのゲノム DNA に存在する他の対立遺伝子を標的化することなく、特定の対立遺伝子を編集することができる gRNA を見出すことを可能にする。gRNA 同定システムは、対立遺伝子を編集するために使用することができる gRNA のリストを作成する。ユーザーは、リスト上の 1 つまたは複数の gRNA を用いて、マッチしない対立遺伝子を破壊またはノックアウトし、次に、マッチしない対立遺伝子をドナー細胞中のレシピエント特異的対立遺伝子でノックインまたは置換することができる。

【0824】

2 つのドナー候補が類似レベルの MHC マッチング（例えば、4／6）を有し、ドナーとレシピエント間のマッチングを向上させる（例えば、5／6 マッチまで）目的でミスマッチ MHC 対立遺伝子の修正のためにいずれを選択することもできる場合、ユーザーは、MHC 制限された系統データベースにおいて最も一般的なマイナー組織適合性抗原（m i H A g）を相互参照することができる。m i H A g は、当該技術分野ではよく知られてい

10

20

30

40

50

る。例えば、Spierings et al., PLOS Genetics, 3 (6) : 1108-1119, 2007; Spierings, Tissue Antigens, 84: 347-360, 2014; および Spierings et al., Biol. Blood Marrow Transplant, 19: 1244-1253, 2013) を参照されたい。ユーザーは、系統データベースを使用して、潜在的に「修正された」MHC 抗原に制限された miHAg (例えば、ドナー細胞中に存在する「修正済」MHC 受容体により制限され得るため、宿主対移植片拒絶を招き得るドナー miHAg) を有する潜在的「修正済」MHC ハプロタイプを相互参照することができる。これらの miHAg は、系統群の間で存在の仕方が異なるため、系統群中で miHA を有する 2 人のドナー候補を相互参照することによって、ユーザーは、より好適なドナーを修正および選択するために、より良い MHC 対立遺伝子を選択することができる。この例では、ユーザーが、2 つの対立遺伝子のうちの 1 つを修正のために選択する選択肢に直面する場合、ユーザーは、gRNA 同定システムの系統データベースの情報を使用して、以下: 1) 移植片レシピエントの系統群に見出される最も一般的な MHC 遺伝子座、および 2) ドナー/レシピエントミスマッチ MHC 全体で MHC 制限されていない miHA に基づき、MHC 修正のためにどちらのドナーを選択すべきかについて自己決定を下すことができる。これは、miHA でのドナーとレシピエント間の遺伝的相違も同種異系 HSCT の結果に影響を与える点で重要である。予測されるマイナー組織適合性抗原ミスマッチ度は、特に非破壊的アロ-HSCT に関して、あまり好ましくない臨床結果と相関することがわかっている (Larsen et al., Biol Blood Marrow Transplant (2010), 16 (10: 1370-81)。従って、特定の系統群で共通する miHAg に制限される MHC ハプロタイプを示す系統データベースを有する両方のドナー MHC ハプロタイプを相互参照すれば、アロ-HSCT の結果をさらに向上させることができる。

【0825】

現在まで記録された HLA 対立遺伝子変異体を含む一般に入手可能なデータセット (hla.alleles.org) を用いて、HLA-A、-B、-C、DRB1、-DRB3/4/5、および-DQB1 遺伝子座について報告されている個別の対立遺伝子について設計された gRNA 配列、ならびにこれらの個別の対立遺伝子が提示されるヒト対象の系統に対する全ての対立遺伝子の相互参照を含むデータベースが構築および確立された (Marsh, S. G. E. (2015), Nomenclature for factors of the HLA system, update March 2015. Tissue Antigens. doi:10.1111/tan.12581; Maier M, et al. Hum. Immunol. 2007; 68 (9): 779-788) (対立遺伝子特異的 gRNA 例および詳細なデータベース設計については、「gRNA」および「実施例」のセクションを参照されたい)。下記の数の対立遺伝子変異体 (例えば、現在まで発見された対立遺伝子の総数。追加の対立遺伝子が、新たな変異体が同定されるたびに追加され得る) が、データベースに含まれた: HLA-A (3, 094 対立遺伝子)、HLA-B (3, 865 対立遺伝子)、HLA-C (2, 618 対立遺伝子)、HLA-DRB1 (1, 719 対立遺伝子)、HLA-DRB3/4/5 (95 対立遺伝子)、HLA-DQB1 (777 対立遺伝子)。データベースを用いて、データベースに示される数千の対立遺伝子変異体のうちの 1 つに特異的な gRNA (もしあれば) を選択することができる。さらに、本明細書に記載されるデータベースは、1 つまたは複数の gRNA により両アレル破壊を可能にする対立遺伝子特異性なしで、個別の HLA 遺伝子座を標的化する gRNA を同定し、階層化することができる。対立遺伝子変異体、gRNA、および系統を既存の臍帯血および骨髄ドナー登録簿と関連付けることによって、レシピエント対象において十分にマッチしたアロ-HSCT を形成するために、後に修飾することができる部分的マッチドナーを相互参照し、同定することができる。

【0826】

S. ピオゲネス (S. pyogenes)、S. アウレウス (S. aureus)、お

よびN. メニンジチディス (N. meningitidis) Cas9分子と共に使用されるガイドRNA (gRNA) は、DNA配列検索アルゴリズムを使用して同定することができる。ガイドRNA (gRNA) 設計は、公共ツールcas-offinderに基づく、特定用途向けガイドRNA設計ソフトウェアを使用して実施される (Baet al. (2014) Bioinformatics 30(10):1473-5)。特定用途向けgRNA設計ソフトウェアは、それらの全ゲノムでのオフターゲット性向を計算した後に、gRNAをスコアする。典型的には、完全なマッチから7つのミスマッチまでのマッチが、長さ17~24のガイドについて検討される。一旦オフターゲット部位が計算により決定されたら、各ガイドについて集約スコアが計算されて、ウェブインタフェースを使用して、表形式の出力に要約される。PAM配列に隣接するgRNA部位候補を同定するのに加えて、ソフトウェアはまた、各MHC遺伝子座のゲノム配列全体を通して、選択されたgRNA部位とは1、2、3つ以上のヌクレオチドが異なる、全てのPAM隣接配列も同定する。各遺伝子のゲノムDNA配列は、UCSCゲノムブラウザから取得し、配列は、一般に入手可能なRepeatMaskerプログラムを用いて、反復要素についてスクリーニングした。RepeatMaskerは、反復要素および低複雑度領域について、入力DNA配列を検索する。その結果は、所与のクエリー配列中に存在する反復の詳細なアノテーションである。

【0827】

遺伝子編集のための対象のMHC対立遺伝子を標的化するgRNAを同定した後、gRNAは、以下の基準：1) 標的部位との距離、2) 5' Gの存在、および3) 直交性スコア、あるいは、関連する (relevant) PAM (例えば、S. ピオゲネス (S. pyogenes) の場合はNGGPAM、S. アウレウス (S. aureus) の場合は、NNGRRTまたはNNGRRV PAM、およびN. メニンジチディス (N. meningitidis) の場合は、NNNNGATTまたはNNNNGCTT PAMなど) を含有するヒトゲノム中の近いマッチの同定に基づいて、さらに階層化される。直交性は、標的配列に対する最小数のミスマッチを含有するヒトゲノム中の配列数を指す。「高レベルの直交性」または「良好な直交性」は、例えば、ヒトゲノム中に意図される標的以外の同一配列を含まず、しかも標的配列中に1つまたは2つのミスマッチを含有する任意の配列を含まない、20量体gRNAを指してもよい。良好な直交性がある標的化ドメインを選択することによって、オフターゲットDNA切断を最小化する。

【0828】

従って、本発明に記載されるgRNA同定システムの例示的な実施形態は、ユーザーが、例えば、6つのHLA遺伝子座の対立遺伝子などの他の対立遺伝子を標的化することができない単一对立遺伝子を標的化するgRNAを検索することを可能にする。さらに、gRNA同定システムを使用して、クエリー入力を特定の対立遺伝子識別子に変更することにより、特定の対立遺伝子を問い合わせることもできる。例示的な実施形態は、対立遺伝子を編集するためのgRNAを同定するシステムおよび方法を提供する。例示的な実施形態はまた、gRNA同定システムのデータベーススキーマをインプリメントするための非一時的コンピューター可読記憶媒体およびシステムも提供する。

【0829】

非一時的コンピューター可読記憶媒体は、以下に記載されるデータベーススキーマをインプリメントするための処理装置による実行のための指示を保存する。データベーススキーマをインプリメントするシステムは、プロセッサ、および以下に記載されるデータベーススキーマを保存するメモリーを含む。非一時的コンピューター可読媒体は、処理装置による実行のための命令を保存し、ここで、命令の実行は、以下に記載されるデータベーススキーマに従い、処理装置にデータベースを作成させる。

【0830】

データベーススキーマは、主要なHLA対立遺伝子に関するデータを保存する対立遺伝子テーブルと、gRNAに関するデータを保存するgRNAテーブルを含む。データベーススキーマはさらに、対立遺伝子テーブルの記録とgRNAテーブルの記録のリレーショ

10

20

30

40

50

ンシップを保存する対立遺伝子－gRNA－リレーションテーブルも含み、ここで、対立遺伝子テーブルは、対立遺伝子－gRNA－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、gRNAテーブルは、対立遺伝子－gRNA－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する。データベーススキーマはまた、ハプロタイプに関するデータを保存するハプロタイプテーブルも含み、ここで、対立遺伝子テーブルは、ハプロタイプテーブルと1対多のリレーションシップを有する。データベーススキーマはさらに、複数の系統内で発生するハプロタイプの頻度に関するデータを保存するハプロタイプ－頻度テーブルも含み、ここで、ハプロタイプテーブルは、ハプロタイプ－頻度テーブルと1対1のリレーションシップを有する。また、系統に関するデータを保存する系統テーブルもデータベーススキーマに含まれる。

10

【0831】

データベーススキーマはまた、ハプロタイプ－頻度テーブルの記録と系統テーブルの記録のリレーションシップを記録する系統－ハプロタイプ－リレーションシップテーブルも含み、ここで、ハプロタイプ－頻度テーブルは、系統－ハプロタイプ－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、系統テーブルは、系統－ハプロタイプ－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する。データベーススキーマはさらに、複数の系統内で発生する対立遺伝子の頻度に関するデータを保存する対立遺伝子－頻度テーブルも含み、ここで、対立遺伝子テーブルは、対立遺伝子頻度テーブルと1対1のリレーションシップを有する。データベーススキーマはまた、対立遺伝子頻度テーブルの記録と系統テーブルの記録のリレーションシップを記録する対立遺伝子－系統－リレーションテーブルも含み、ここで、対立遺伝子頻度テーブルは、対立遺伝子－系統－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有し、系統テーブルは、対立遺伝子－系統－リレーションテーブルと1対多のリレーションシップを有する。

20

【0832】

データベースはまた、マイナー組織適合性抗原に関するデータを保存するマイナー抗原テーブル、およびマイナー組織適合性抗原に対するHLA制限に関する主要－マイナー－制限テーブルも含む。マイナー抗原テーブルは、主要－マイナー－制限テーブルと1対多のリレーションシップを有し、対立遺伝子テーブルは、主要－マイナー－制限テーブルと1対多のリレーションシップを有する。

【0833】

対立遺伝子テーブルは、対立遺伝子idキー、対立遺伝子属性、遺伝子名属性、および対立遺伝子配列属性を含む。gRNAテーブルは、gRNAidキー、Cas変異体属性、gRNA配列(PAMを含む)属性、gRNA配列(PAMを含まない)属性、鎖属性、直交性スコア属性、およびオフターゲットリスト情報属性を含む。対立遺伝子－ガイド－リレーションテーブルは、リレーションidキー、対立遺伝子テーブルの対立遺伝子idキーに対応する対立遺伝子id属性、およびgRNAテーブルのgRNAidキーに対応するgRNAid属性を含んでもよい。ハプロタイプテーブルは、ハプロタイプidキー、HLA-A対立遺伝子属性、HLA-B対立遺伝子属性、HLA-C対立遺伝子属性、HLA-DRB1遺伝子座属性、HLA-DRB3/DRB4/DRB5遺伝子座属性、およびHLA-DQB1対立遺伝子遺伝子座属性を含んでもよい。

30

40

【0834】

ハプロタイプ－頻度テーブルは、ハプロタイプ頻度idキー、ハプロタイプテーブルのハプロタイプidキーに対応するハプロタイプid属性、ヨーロッパ系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、ヨーロッパ系統群におけるハプロタイプ発生のランクの属性、アフリカ系アメリカ人系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、アフリカ系アメリカ人系統群におけるハプロタイプ発生のランクの属性、アジア系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、アジア系統群におけるハプロタイプ発生のランクの属性、ヒスパニック系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、ヒスパニック系統群におけるハプロタイプ発生のランクの属性、ユダヤ人系統群におけるハプロタイプの発生頻度の属性、およびユダヤ人系統群におけるハプロタイプ発生のランクの属性を含む。

50

【0835】

対立遺伝子-頻度テーブルは、対立遺伝子頻度 i d キー、対立遺伝子テーブルの対立遺伝子 i d キーに対応する対立遺伝子 i d 属性、ヨーロッパ系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、ヨーロッパ系統群における対立遺伝子発生のランクの属性、アフリカ系アメリカ人系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、アフリカ系アメリカ人系統群における対立遺伝子発生のランクの属性、アジア系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、アジア系統群における対立遺伝子発生のランクの属性、ヒスパニック系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、ヒスパニック系統群における対立遺伝子発生のランクの属性、ユダヤ人系統群における対立遺伝子の発生頻度の属性、およびユダヤ人系統群における対立遺伝子発生のランクの属性を含んでもよい。

10

【0836】

対立遺伝子-頻度テーブルは、対立遺伝子テーブルと依存リレーションシップを有し、対立遺伝子テーブルに完全に依存的である。ハプロタイプ-頻度テーブルは、ハプロタイプテーブルと依存リレーションシップを有し、ハプロタイプテーブルに完全に依存的である。

【0837】

1つまたは複数の対立遺伝子を編集するための g R N A を同定するシステムは、プロセッサ、および実行されると、以下に記載される方法をプロセッサにインプリメントさせる命令を保存するメモリを含む。本方法は、1つまたは複数の対立遺伝子を編集するための g R N A を同定するコンピューターシステムを用いて実施してもよい。

20

【0838】

本方法は、以下：コンピューターシステムのインターフェースを介して、標的化移植片レシピエントの第1の複数の対立遺伝子の一覧、標的化移植片ドナーの第2の複数の対立遺伝子の一覧を受信するステップを含む。この方法は、続いて、第1および第2の複数の対立遺伝子の一覧を処理して、第1の複数の対立遺伝子と第2の複数の対立遺伝子との間で1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を同定するステップ、次に、データベースに問い合わせ、1つまたは複数の g R N A 分子が、第2の複数の対立遺伝子の1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるか否かを決定するステップを含む。データベースからの1つまたは複数の g R N A が、1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるという決定に応じて、好適であることが判明した1つまたは複数の g R N A を同定する g R N A 分子のリストが作成される。g R N A のリストはランク付けされて、表示される。

30

【0839】

本方法はまた、第1の複数の対立遺伝子の各々について D N A 配列を表示するステップを含んでもよい。データベースは、ある人種群に発生する対立遺伝子の尤度を示す数をスコアする。本方法はまた、ある系統内の第1の複数の対立遺伝子の各々の発生頻度を表示するステップを含んでもよい。本方法は、第1の複数の対立遺伝子の各々とマイナー組織適合性抗原との間の制限リレーションシップを表示するステップをさらに含んでもよい。第1の複数の対立遺伝子が、標的化移植片レシピエントの母系遺伝性主要 H L A ハプロタイプで、第2の複数の対立遺伝子が、標的化移植片ドナーの母系遺伝性主要 H L A ハプロタイプであってもよい。第1の複数の対立遺伝子の一覧は、1つの対立遺伝子、2つの対立遺伝子、3つの対立遺伝子、4つの対立遺伝子、5つの対立遺伝子、6つの対立遺伝子、7つの対立遺伝子、または8つの対立遺伝子を含む。第2の複数の対立遺伝子の一覧は、1つの対立遺伝子、2つの対立遺伝子、3つの対立遺伝子、4つの対立遺伝子、5つの対立遺伝子、6つの対立遺伝子、7つの対立遺伝子、または8つの対立遺伝子を含む。

40

【0840】

g R N A のリストは、1つのミスマッチ対立遺伝子を編集するために1つの g R N A を同定し得る。g R N A のリストは、2つ以上のミスマッチ対立遺伝子を編集するために2つ以上の g R N A を同定し得る。g R N A のリストは、2つ以上のミスマッチ対立遺伝子を編集するために1つの g R N A を同定し得る。

50

【0841】

gRNAのリストからのgRNAは、標的化移植片ドナーの第2の複数の対立遺伝子からのミスマッチ対立遺伝子を編集して、第1の複数の対立遺伝子と第2の複数の対立遺伝子間でマッチする対立遺伝子の数を増加させることができる。gRNAのリストからのgRNAは、1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集して、標的化移植片レシピエントに移植片対宿主病（GVHD）が発生する尤度を低減することができる。

【0842】

図24は、一実施例に従って、モジュール内にインプリメントされたgRNA同定システム2400を示すブロック図である。これらのモジュールは、図33に示す装置1010内にインプリメントすることもできる。モジュールは、入力モジュール2410、クエリーモジュール2420、ランク付けモジュール2430、およびデータベース管理モジュール2440を含み得る。モジュールは、様々な回路、回路系、および1つまたは複数のソフトウェア構成要素、プログラム、アプリケーション、または装置1010に含まれる1つまたは複数のプロセッサにより実行されるように設計されたその他のコードベースもしくは命令ユニットを含み得る。他の実施形態では、モジュール2410、2420、2430、2440の1つまたは複数がサーバー1020内に含まれてもよく、モジュール2410、2420、2430、2440の残りは、装置1010内またはデータベース管理システム1040の一部として提供される。モジュール2410、2420、2430、および2440は、図24には個別のモジュールとして示されるが、モジュール2410、2420、2430、および2440が、図示されるよりも少ない、もしくは多いモジュールとしてインプリメントされ得ることは理解すべきである。モジュール2410、2420、2430、および2440のいずれも、装置3310、サーバー3320、データベース管理システム3340もしくはデータベース3350などのシステム3300（図33）に含まれる1つまたは複数の構成要素と連絡し得ることは理解すべきである。

【0843】

入力モジュール2410は、装置、例えば、装置3310に付属するインターフェースから受信される入力を管理し、解析するように、設計され得る。入力は、標的化移植片レシピエントの第1の対立遺伝子群の一覧と、標的化移植片ドナーの第2の対立遺伝子群の一覧とを含み得る。入力はまた、標的化移植片レシピエントおよび／または標的化移植片ドナーのハプロタイプに関する情報、標的化移植片レシピエントおよび／または標的化移植片ドナーの系統情報も含み得る。入力モジュール2410はまた、標的化移植片レシピエントと標的化移植片ドナー間の1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を同定するように設計することもできる。

【0844】

クエリーモジュール2420は、入力およびミスマッチ対立遺伝子を解析し、データベースに問い合わせ、データベース中の1つまたは複数のgRNAが、ミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるか否かを決定するように設計され得る。クエリーモジュール2420はまた、同定された1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適な、データベースからのgRNAのリスクを作成するように設計することもできる。

【0845】

ランク付けモジュール2430は、gRNAのリストを解析し、様々な基準に基づいてリストをランク付けするように設計され得る。例えば、gRNAのリスト中の個々のgRNAは、非標的化対立遺伝子に対するそれぞれのオフターゲット効果に基づいてランク付けされ得る。データベース管理モジュール2440は、対立遺伝子、ハプロタイプ、gRNA、系統、およびその他の情報を保存するデータベースにアクセスし、それを管理するように設計され得る。

【0846】

図25は、一実施形態例に従って、対立遺伝子を編集するためのgRNAを同定する例示的な方法2500を示すフローチャートである。方法2500は、図24に示されるg

10

20

30

40

50

RNA同定システム2400内のモジュールを用いて実施され得る。例示的な方法2500は、ステップ2502で、標的化移植片レシピエントの第1の対立遺伝子群の一覧を受信する入力モジュール2410から開始する。一実施形態例では、第1の対立遺伝子群は、標的化移植片レシピエントの母系遺伝性主要HLAハプロタイプ、または標的化移植片レシピエントの父系遺伝性主要HLAハプロタイプであってよい。ハプロタイプは、本明細書の用法では、異なるHLA遺伝子についての1つの対立遺伝子群を指す。

【0847】

ステップ2504で、入力モジュール2410は、標的化移植片ドナーの第2の対立遺伝子群の一覧を受信する。一実施例では、第2の対立遺伝子群は、HSCドナー候補を遺伝子編集するために標的化される、母系遺伝性主要HLAハプロタイプ（例えば、一方の染色体上にHLA-A/-B/-DRB1を含むMHC遺伝子座の群）、または父系遺伝性主要HLAハプロタイプ（例えば、他方の染色体上にHLA-A/-B/-DRB1を含むMHC遺伝子座の群）であってもよい。移植片レシピエントについて入力として受信される情報のタイプが、移植片ドナーについて入力として受け取られる情報のタイプを決定し、逆も同様である。

【0848】

いくつかの実施形態では、入力モジュール2410は、移植片レシピエントおよびドナーの系統情報、移植片レシピエントおよびドナーの性別、および年齢情報に関する入力を受信する場合もある。

【0849】

例示的な方法2500は、ステップ2506に進み、ここで、入力モジュール2410は、受信した入力を処理して、第1の対立遺伝子群と第2の対立遺伝子群同士の1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を同定する。ミスマッチ対立遺伝子は、第1の対立遺伝子群と第2の対立遺伝子群からの対立遺伝子の各々の比較に基づいて同定することができる。ミスマッチ対立遺伝子は、本明細書の用法では、移植片レシピエントの対応する対立遺伝子とは異なる移植片ドナー由来の対立遺伝子を指す。いくつかの実施形態では、1つのミスマッチ対立遺伝子が存在し得る。他の実施形態では、複数のミスマッチ対立遺伝子が存在し得る。入力モジュール2410は、さらなる処理のために同定されたミスマッチ対立遺伝子の記録を保存し得る。

【0850】

ステップ2508で、クエリーモジュール2420は、データベースに問い合わせ、データベースからのgRNAが、移植片ドナーの1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるか否かを決定する。一実施形態例では、以下に詳しく説明する図27A、27Bおよび27Cに関して記載されるデータベーススキーマ2700および2700'に従って、データベースをインプリメントすることができる。データベースは、対立遺伝子およびgRNAに関する情報を保存することができる。前述したように、gRNA同定システムは、ドナー対立遺伝子が、移植片レシピエントの対立遺伝子とマッチすることができるように、移植片ドナーの1つまたは複数の対立遺伝子を編集するのに好適なgRNAを同定するのを補助する。ステップ2510で、クエリーモジュール2420は、gRNAが、移植片ドナーの1つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適であるか否かを決定する。gRNAが好適であれば、これは、ステップ2512で作成された好適なgRNAのリストに加えられる。データベースにより多くのgRNAがある（ステップ2514）場合、プロセスが反復され、データベースに、データベース中の各gRNAに関して問い合わせがなされて、ドナー対立遺伝子が、移植片レシピエントの対立遺伝子とマッチすることができるような移植片ドナーの1つまたは複数の対立遺伝子の編集に、gRNAが好適であるか否かが決定される。同定されるいずれの好適なgRNAも作成リストに加えられる。いくつかの実施形態では、ミスマッチドナー対立遺伝子を編集するために、複数のgRNAが利用可能である。他の実施形態では、ミスマッチドナー対立遺伝子を編集するために、1つまたは0のgRNAが利用可能である。一実施例では、2つ以上のミスマッチ対立遺伝子が存在する場合、クエリーモジュール2420は、

10

20

30

40

50

最初に、ミスマッチ対立遺伝子の全てを編集することができる gRNA を同定する。次に、クエリーモジュール 2420 は、ミスマッチ対立遺伝子の少なくとも 1 つを編集することができる gRNA を同定する。このようにして、全てのミスマッチ対立遺伝子を編集するために複数の gRNA を必要とするのではなく、1 つの gRNA を用いて全てのミスマッチ対立遺伝子を編集することができる場合、gRNA 同定システム 2400 は、効率的な gRNA オプションをユーザーに提供することができる。全ての好適な gRNA が作成リストに加えられたら、ランク付けモジュール 2430 は、ステップ 2516 の特定の基準に基づいて gRNA のリストをランク付けする。例えば、gRNA は、それらのオフターゲット効果、またはオフターゲット効果がないこと、非標的化対立遺伝子に基づいてランク付けされ得る。ランク付けプロセスについては、図 26 を参照にして以下に詳しく説明する。

10

【0851】

ステップ 2518 では、好適な gRNA のランク付けリストが、例えば、図 33 を参照に説明される画面表示装置 3418 などの表示装置を介してユーザーに表示される。一実施形態例では、レシピエントの対立遺伝子各々の DNA 配列も表示される。別の実施形態例では、一系統内のレシピエントの対立遺伝子（第 1 の対立遺伝子群）の各々の発生頻度が表示される。別の例示的实施形態では、レシピエントの MHC およびドナーの MHC により制限される miRNA が表示される。

【0852】

非限定的な例では、レシピエント（第 1 の対立遺伝子群）とドナー（第 2 の対立遺伝子群）の間に 1 つ（単一もしくは特異な）のミスマッチ対立遺伝子が存在し得る。この場合、gRNA 同定システムは、1 つのミスマッチ対立遺伝子を編集するために 1 つの gRNA を同定し得る。別の非限定的な例では、レシピエント（第 1 の対立遺伝子群）とドナー（第 2 の対立遺伝子群）の間に 2 つ以上のミスマッチ対立遺伝子が存在し得る。この場合、gRNA 同定システムは、複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するために複数の gRNA を同定し得る。この例では、ミスマッチ対立遺伝子は、連続的または不連続的のいずれでもよい。別の非限定的な例では、レシピエント（第 1 の対立遺伝子群）とドナー（第 2 の対立遺伝子群）の間に 2 つ以上のミスマッチ対立遺伝子が存在し得る。この場合、gRNA 同定システムは、複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するために 1 つ（単一もしくは特異な）の gRNA を同定し得る。この例では、ミスマッチ対立遺伝子は、連続的または不連続的のいずれでもよい。

20

30

【0853】

図 26 は、例示的实施形態に従って、gRNA をランク付けするための例示的な方法を示すフローチャートである。方法 2600 は、ステップ 2602 で、ミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適な、同定された gRNA 候補（図 25 を参照にして説明した通り）を有する gRNA 同定システム 2400 から開始する。ステップ 2604 では、ランク付けモジュール 2430 が、各 gRNA 候補についてデータベースからのミスマッチ、挿入／欠失（インデル）、クロマチン状態などに基づき事前に決定されたオフターゲットスコアを検索する。ステップ 2606 では、ランク付けモジュール 2430 は、ミスマッチ、挿入／欠失（インデル）、クロマチン情報などの検索されたオフターゲットスコアに基づいて gRNA をランク付けする。ランク付けされた gRNA のリストは、ステップ 2608 で、例えば、図 34 を参照に説明される画面表示装置 3418 などの表示装置を介してユーザーに表示される。

40

【0854】

一例示的实施形態では、ランク付けモジュール 2430 は、データベースに保存された gRNA の各々につて、ミスマッチ、挿入／欠失（インデル）、クロマチン情報などに基づいてオフターゲットスコアを決定する。このスコアは、gRNA に関連し、ランク付けプロセス中に検索できるように保存される。いくつかの実施形態では、オフターゲットスコアは、gRNA 配列をヒトゲノムとアラインメントして、ヒトゲノムと gRNA 配列同士のミスマッチを決定することによって取得される。

50

【0855】

例えば、gRNA同定システムを用いて、ゲノム全体の総オフターゲット活性を最小にするように、ユーザーの標的配列内のgRNAの選択を最適化することができる。一実施形態例では、オフターゲットスコアを決定するアルゴリズムは、ミスマッチの数の他に、Cas9により認識されるプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列の変更も可能にする。例えば、潜在的オフターゲット部位を決定するとき、Cas9により認識されるPAMの同義性が報告され得る。S. ピオゲネス（*S. pyogenes*）Cas9の場合、このアルゴリズム例は、最初に、対象のsgRNA配列および5'-NRG-3' PAM配列に対応する20-bp配列から構成される全ての23-bp DNA配列を収集する。次に、上記アルゴリズム例は、収集された配列をクエリー配列と比較して、20-bp sgRNA配列中のミスマッチ塩基の数を計数する。Bae S., Park J & Kim J. - S. Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30, 1473-1475 (2014) を参照されたい。

10

【0856】

別の実施形態では、オフターゲットスコアは、ヒトゲノムのクロマチン状態を考慮に入れて決定され得る。<http://cheetah.bioch.virginia.edu/AdliLab/CROP-IT/about.html>を参照されたい。

20

【0857】

また別の実施形態では、考えられるCRISPRガイド（例えば、PAM配列：NGGが続く20ヌクレオチド）について配列を操作した後、選択されたゲノム全体を通じて考えられるオフターゲットマッチについて操作してもよい。例えば、オフターゲットスコアは、ミスマッチの総数、ミスマッチ絶対位置（PAM部位に接近するミスマッチの比較的高い妨害に対応するため）、およびミスマッチ同士の平均ペアワイズ距離（ガイドDNA相互作用を破壊する上での接近するミスマッチの立体作用を説明するため）を考慮に入れて計算してもよい。<http://crispr.mit.edu/about>を参照されたい。

【0858】

別の例示的实施形態では、オフターゲットスコアを決定するプロセスは、Bowtie 2 (Johns Hopkins Universityにより提供される既存のゲノムインデキシングプログラム)を用いて、同定されたgRNA配列を残りの生物染色体DNAにマッピングすることによって特異性を検証する。gRNAを別の配列にマッピングすることができれば、これは、オフターゲットを有する。一実施形態例では、オフターゲットスコア計算は、配列の5'末端側の最初の6塩基のオフターゲットに許容されるミスマッチの数も考慮に入れてよい。また別の実施形態例では、オフターゲットスコア計算は、標的配列までの許容編集距離（すなわち、オフターゲットに許容されるミスマッチおよびインデルの数）も考慮に入れてよい。<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/aboutpage.html>を参照されたい。

30

【0859】

ユーザーは、本明細書に記載されるgRNA同定システムを使用して、造血幹細胞移植を必要とする将来のレシピエント患者に対して部分的HLAマッチドナーを評価することができる。ユーザーは、入手可能な骨髄および臍帯血データベースを用いて、部分的マッチドナー候補を同定するか、または移植片レシピエントに生物学的に近縁の個体をスクリーニングすることができる。ユーザーは、MHC遺伝子座でマッチする多数の対立遺伝子を有する数人のドナー候補から1人のドナーを選択することができる。異なる民族系統／起源の人は、miHA gの頻度が異なり、これは、MHC制限されるため、類似する民族系統／起源のドナーが好ましい。同じ系統内に数人のドナー候補がいる場合、ユーザーは、本明細書に記載されるgRNA同定システムを用いて、MHCの頻度を見つけることが

40

50

でき、ドナー *m i H A g* を配列決定して、最も類似する *m i H A g* プロフィール（例えば、10の *m i H A g* 遺伝子座）を有するドナーを選択する。ドナーが、「修正」MHC（レシピエントMHCに従い）によって制限される *m i H A g* を有する場合、このドナーを選択することはできない。

【0860】

図27Aは、一実施形態例に従って、gRNA同定システムのための例示的なデータベーススキーマ2700を示す。例示的なデータベーススキーマ2700は、対立遺伝子テーブル2705、gRNAテーブル2710、対立遺伝子-gRNA-リレーションテーブル2715、ハプロタイプテーブル2720、ハプロタイプ-頻度テーブル2725、系統テーブル2730、系統-ハプロタイプ-リレーションテーブル2735、対立遺伝子-頻度テーブル2740、および対立遺伝子-系統-リレーションテーブル2745を含む。いくつかの実施形態では、例示的なデータベーススキーマ2700はまた、マイナー抗原テーブル2750および主要-マイナー-制限テーブル2755も含む。例示的なデータベーススキーマ2700は、図27Aには、11のテーブルを含むものとして示されるが、データベーススキーマ2700は、これより少ないか、または多いテーブル数を含み得ることは理解すべきである。

【0861】

図27BおよびCは、一実施形態例に従って、gRNA同定システムのための例示的なデータベーススキーマ2700'を詳細に示す。例示的なデータベーススキーマ2700'は、MySQLを用いて示される。データベース内のテーブルの各々は、キーおよび1つまたは複数の属性を含む。例示的なデータベーススキーマ2700'は、対立遺伝子テーブル2705、gRNAテーブル2710、対立遺伝子-gRNA-リレーションテーブル2715、ハプロタイプテーブル2720、ハプロタイプ-頻度テーブル2725、系統テーブル2730、系統-ハプロタイプ-リレーションテーブル2735、対立遺伝子-頻度テーブル2740、および対立遺伝子-系統-リレーションテーブル2745を含む。いくつかの実施形態では、例示的なデータベーススキーマ2700'はまた、マイナー抗原テーブル2750および主要-マイナー-制限テーブル2755も含む。例示的なデータベーススキーマ2700'は、図27Bおよび27Cには、11のテーブルを含むものとして示されるが、データベーススキーマ2700'は、これより少ないか、または多いテーブル数を含み得ることは理解すべきである。

【0862】

一実施形態例では、gRNA（ガイド）テーブルは、gRNA ID、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）を含まないgRNA標的配列、PAMを含むgRNA標的配列、Cas変異体タイプ（一部のgRNAは、S. ピオゲネス（*S. pyogenes*）またはS. アウレウス（*S. aureus*）に特異的であり、これらのCas9変異体に特異的な標的化ドメイン長さを含む）、標的化gRNAが指令されて結合するゲノムDNA鎖（例えば、+もしくは-鎖）、直交性スコア（ヒトゲノムのオフターゲットヒットスコアの加重合計）、ならびにオフターゲット数（gRNAが、異なる数のミスマッチもしくはインデルを含む標的化遺伝子座として同定されない他のゲノム遺伝子座上で標的化またはヒットする回数）を含む。対立遺伝子テーブルの一例は、以下のカテゴリーおよび関連データを含む：対立遺伝子ID、対立遺伝子識別子（HLA命名法）、遺伝子（遺伝子座）名、および対立遺伝子配列。対立遺伝子-頻度テーブルの一例は、NBMPデータベース（National Marrow Donor Program: <https://bioinformatics.bethematchclinical.org/HLA-Resources/Haplotype-Frequencies/High-Resolution-HLA-Alleles-and-Haplotypes-in-the-US-Population/>; <https://bioinformatics.bethematchclinical.org/HLA-Resources/Haplotype-Frequencies/Jewish-High-Resolution-Haplotype-Frequencies/>）に注記されているように、ヨー

ロッパ系アメリカ人（白色人種）、アフリカ系アメリカ人、アジア系、ヒスパニック系、およびユダヤ系集団内の頻度記録ID、対立遺伝子識別子、頻度およびランクを含む。

【0863】

対立遺伝子テーブル2705は、主要HLA対立遺伝子に関するデータを保存する。一実施形態例では、対立遺伝子テーブル2705は、一般に入手可能なHLA対立遺伝子データベース（http://hla.alleles.org/alleles/text_index.htmに見出される）からのデータを用いて構成される。いくつかの実施形態では、対立遺伝子テーブル2705は、HLA対立遺伝子の変異体の配列に関するデータを保存する。対立遺伝子テーブル2705は、対立遺伝子idキー、対立遺伝子属性、遺伝子名属性、および対立遺伝子配列属性を含む。

10

【0864】

gRNAテーブル2710は、gRNAに関するデータを保存する。いくつかの実施形態では、gRNAは、前述したような対立遺伝子を編集するために設計される。一実施形態では、gRNAテーブル2710は、gRNAidキー、gRNAタイプ属性、プロトSpacer隣接モチーフ（PAM）を含むgRNA配列、gRNA配列（PAMを含まない）属性、鎖属性、直交性スコア属性、およびオフターゲットリスト情報属性を含む。

【0865】

対立遺伝子-gRNA-リレーションテーブル2715は、対立遺伝子テーブル2705の記録とgRNAテーブル2710の記録との間のリレーションシップを保存する。例示的データベーススキーマ2700では、対立遺伝子テーブル2705は、対立遺伝子-gRNA-リレーションテーブル2715と1対多のリレーションシップを有する。gRNAテーブル2710は、対立遺伝子-gRNA-リレーションテーブル2715と1対多のリレーションシップを有する。一実施形態では、対立遺伝子-gRNA-リレーションテーブルは、リレーションidキー、対立遺伝子テーブルの対立遺伝子idキーに対応する対立遺伝子id属性、gRNAテーブルのgRNAidキーに対応するgRNAid属性を含む。

20

【0866】

ハプロタイプテーブル2720は、ハプロタイプに関するデータを保存する。ハプロタイプは、片方の親から一緒に遺伝された遺伝子または対立遺伝子群である。対立遺伝子テーブル2705は、ハプロタイプテーブルと1対多のリレーションシップを有する。ハプロタイプテーブル2720は、ハプロタイプidキー、HLA-A対立遺伝子属性、HLA-B対立遺伝子属性、HLA-C対立遺伝子属性、HLA-DRB1遺伝子座属性、HLA-DRB3/DRB4/DRB5遺伝子座属性、HLA-DQB1対立遺伝子遺伝子座属性を含む。

30

【0867】

ハプロタイプ-頻度テーブル2725は、ある系統内で発生するハプロタイプの頻度に関するデータを保存する。ハプロタイプテーブル2720は、ハプロタイプ-頻度テーブル2725と1対1のリレーションシップを有する。一実施形態では、ハプロタイプ-頻度テーブル2725は、ハプロタイプ頻度idキー、ハプロタイプテーブル2720のハプロタイプidキーに対応するハプロタイプid属性、ヨーロッパ系統群内のハプロタイプの発生頻度の属性、およびヨーロッパ系統群内のハプロタイプ発生のランクの属性を含む。ハプロタイプ-頻度テーブル2725はまた、アフリカ系アメリカ人系統群内のハプロタイプの発生頻度の属性、アフリカ系アメリカ人系統群内のハプロタイプ発生のランクの属性、アジア系統群内のハプロタイプの発生頻度の属性、アジア系統群内のハプロタイプ発生のランクの属性、ヒスパニック系統群内のハプロタイプの発生頻度の属性、ヒスパニック系統群内のハプロタイプ発生のランクの属性、ユダヤ系統群内のハプロタイプの発生頻度の属性、およびユダヤ系統群内のハプロタイプ発生のランクの属性も含み得る。ハプロタイプ-頻度テーブル2725は、ハプロタイプテーブル2720と依存リレーションシップを有し、ハプロタイプテーブル2720に完全に依存的である。

40

【0868】

50

系統テーブル 2730 は、複数の民族系統または起源に関するデータを保存する。一実施形態例では、系統テーブル 2730 は、ヨーロッパ系統群、アフリカ系アメリカ人系統群、アジア系統群、ヒスパニック系統群、およびユダヤ系統群に関するデータを保存する。系統起源テーブル 2730 は、系統 i d キー、および系統名属性を含む。

【0869】

系統-ハプロタイプ-リレーションテーブル 2735 は、ハプロタイプ-頻度テーブル 2725 の記録と系統テーブル 2730 の記録の間のリレーションシップを保存する。ハプロタイプ-頻度テーブル 2725 は、系統-ハプロタイプ-リレーションテーブル 2735 と 1 対多のリレーションシップを有する。系統テーブル 2730 は、系統-ハプロタイプ-リレーションテーブル 2735 と 1 対多のリレーションシップを有する。一実施形態では、系統-ハプロタイプ-リレーションテーブル 2735 は、i d キー、系統テーブル 2730 の系統 i d キーに対応する系統 i d 属性、およびハプロタイプ-頻度テーブル 2725 のハプロタイプ i d キーに対応するハプロタイプ i d 属性を含む。

【0870】

対立遺伝子-頻度テーブル 2740 は、ある系統内で発生する対立遺伝子の頻度に関するデータを保存する。対立遺伝子テーブル 2705 は、対立遺伝子頻度テーブルと 1 対 1 のリレーションシップを有する。一実施形態では、対立遺伝子-頻度テーブル 2740 は、対立遺伝子頻度 i d キー、対立遺伝子テーブルの対立遺伝子 I D に対応する対立遺伝子属性、ヨーロッパ系統群内の対立遺伝子の発生頻度の属性、ヨーロッパ系統群内の対立遺伝子発生ランクの属性、アフリカ系アメリカ人系統群内の対立遺伝子の発生頻度の属性、アフリカ系アメリカ人系統群内の対立遺伝子発生ランクの属性、アジア系統群内の対立遺伝子の発生頻度の属性、アジア系統群内の対立遺伝子発生ランクの属性、ヒスパニック系統群内の対立遺伝子の発生頻度の属性、ヒスパニック系統群内の対立遺伝子発生ランクの属性、ユダヤ系統群内の対立遺伝子の発生頻度の属性、およびユダヤ系統群内の対立遺伝子発生ランクの属性を含む。対立遺伝子-頻度テーブル 2740 は、対立遺伝子テーブル 2705 と依存リレーションシップを有し、対立遺伝子テーブル 2705 に完全に依存的である。

【0871】

対立遺伝子-系統-リレーションテーブル 2745 は、対立遺伝子-頻度テーブル 2740 の記録と系統テーブル 2730 の記録の間のリレーションシップを保存する。対立遺伝子-頻度テーブル 2740 は、対立遺伝子-系統-リレーションテーブル 2745 と 1 対多のリレーションシップを有する。系統テーブル 2730 は、対立遺伝子-系統-リレーションテーブル 2745 と 1 対多のリレーションシップを有する。一実施形態では、対立遺伝子-系統-リレーションテーブル 2745 は、対立遺伝子-系統 i d キー、対立遺伝子-頻度テーブル 2740 の対立遺伝子 i d キーに対応する対立遺伝子 i d 属性、および系統テーブル 2730 の系統 i d キーに対応する系統 i d 属性を含む。

【0872】

マイナー-抗原テーブル 2750 は、マイナー組織適合性抗原 (m i H A g) に関するデータを保存する。一実施形態では、マイナー-抗原テーブル 2750 は、m i H A g i d キー、m i H A g 名属性、m i H A g 遺伝子属性、染色体属性、免疫原性対立遺伝子属性、非免疫原性対立遺伝子属性、および免疫原性表現型属性を含む。

【0873】

主要-マイナー-制限テーブル 2755 は、m i H A g に対する H L A 制限に関するデータを保存する。マイナー-抗原テーブル 2750 は、主要-マイナー-制限テーブル 2755 と 1 対多のリレーションシップを有する。対立遺伝子テーブル 2705 は、主要-マイナー-制限テーブル 2755 と 1 対多のリレーションシップを有する。一実施形態では、主要-マイナー-制限テーブル 2755 は、主要-マイナー i d キー、対立遺伝子テーブル 2705 の対立遺伝子 i d キーに対応する主要 i d 属性、およびマイナー-抗原テーブル 2750 の m i H A g i d キーに対応するマイナー i d 属性を含む。

【0874】

10

20

30

40

50

テーブル 2705、2710、2715、2720、2725、2730、2735、2740、2745、2750 および 2755 の各々は、特定のキーと特定の属性を有するものとして説明されるが、テーブルの各々が、異なるキーもしくは異なる数のキー、および／または異なる属性もしくは異なる属性の数を有するように設計され得ることは理解すべきである。

【0875】

表 1～12 は、図 27A、27B、27C に関して説明されたデータベーススキーマ 2700 または 2700' の 1 つまたは複数のテーブル、例えば、ハプロタイプテーブル 2720 および／またはハプロタイプ頻度テーブル 2725 に保存され得る例示的なデータを示す。

【0876】

図 28A は、一実施形態例に従って、gRNA 同定システムに入力される例示的な対立遺伝子を示す。第 1 の対立遺伝子群、すなわち、標的化移植片レシピエントの対立遺伝子は、対立遺伝子 2802 であってよい。第 2 の対立遺伝子群、すなわち、標的化移植片ドナーの対立遺伝子は、対立遺伝子 2804 であってよい。図 28A からわかるように、対立遺伝子 2802 と対立遺伝子 2804 の間にミスマッチが存在し、これは、枠 2805 により示される。図示されるように、ドナー対立遺伝子 A*02:01:01:01 は、レシピエント対立遺伝子 A*01:01:01:01 とマッチしない。gRNA 同定システムを用いて、レシピエント対立遺伝子にマッチするようにこれらのミスマッチドナー対立遺伝子を編集することができる gRNA を同定することができる。この入力／シナリオ例は、「単一对立遺伝子のノックアウト」と呼ばれることもある。前述のように、gRNA 同定システムは、単一对立遺伝子をノックアウトするための 1 つの gRNA を同定することができる。

【0877】

図 28B は、一実施形態例に従って、gRNA 同定システムに入力される例示的な対立遺伝子を示す。この実施例では、第 1 の対立遺伝子群、すなわち、レシピエントの対立遺伝子は、対立遺伝子 2812 であってよい。第 2 の対立遺伝子群、すなわち、標的化移植片ドナーの対立遺伝子は、対立遺伝子 2814 であってよい。図 28B からわかるように、対立遺伝子 2802 と対立遺伝子 2804 の間に複数のミスマッチが存在し、これは、枠 2815、2817 および 2819 により示される。図示されるように、ドナー対立遺伝子 A*02:01:01:01-B*08:01:01:01-DRB1*03:01 は、レシピエント対立遺伝子 A*03:01:01:01-B*07:02:01-DRB1*15:01:01:01 とマッチしない。gRNA 同定システムを用いて、レシピエント対立遺伝子にマッチするようにこれらのミスマッチドナー対立遺伝子を編集することができる gRNA を同定することができる。この入力／シナリオ例は、「複数対立遺伝子のノックアウト」と呼ばれることもある。前述のように、gRNA 同定システムは、複数の対立遺伝子をノックアウトするための単一の gRNA もしくは複数の gRNA を同定することができる。

【0878】

図 28C は、一実施形態例に従って、gRNA 同定システムに入力される例示的な対立遺伝子を示す。この実施例では、第 1 の対立遺伝子群、すなわち、レシピエントの対立遺伝子は、対立遺伝子 2822 であってよい。第 2 の対立遺伝子群、すなわち、標的化移植片ドナーの対立遺伝子は、対立遺伝子 2824 であってよい。図 28C からわかるように、対立遺伝子 2802 と対立遺伝子 2804 の間に複数のミスマッチが存在し、これは、枠 2825 および 2827 により示される。図示されるように、ドナー対立遺伝子 A*02:01:01:01 および A*29:02:01:01 は、レシピエント対立遺伝子 A*01:01:01:01 および A*23:01:01:01 とマッチしない。gRNA 同定システムを用いて、レシピエント対立遺伝子にマッチするようにこれらのミスマッチドナー対立遺伝子を編集することができる gRNA を同定することができる。この入力／シナリオ例は、「両アレル破壊」と呼ばれることもある。前述のように、gRNA 同定システム

10

20

30

40

50

用いて、両アレル破壊のための単一 gRNA もしくは複数の gRNA を同定することができる。

【0879】

このようにして、gRNA 同定システムは、単一のミスマッチ対立遺伝子（図 28A）、複数の連続的ミスマッチ対立遺伝子（図 28B）、または複数の不連続的ミスマッチ対立遺伝子（図 28C）を有するドナー対立遺伝子およびレシピエント対立遺伝子を受信することができる。

【0880】

図 29 は、一実施形態例に従って、gRNA 同定システムの例示的なクエリーまたは入力、ならびに gRNA 同定システムの出力としての例示的な gRNA リスト 2950 を示す。前述したように、ユーザーは、ドナーの対立遺伝子群およびレシピエント／患者の対立遺伝子群をはじめとするクエリーを入力することができる。前述したように、gRNA 同定システムは、ドナー対立遺伝子の 1 つまたは複数のミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適な gRNA のリストを出力する。図 29 に示すように、ユーザーが、クエリー 2900 を入力すると、gRNA 同定システムは、出力として gRNA リスト 2950 を作成する。クエリーに基づいて、gRNA 同定システムは、遺伝子編集のために好適な gRNA を決定すると、ミスマッチドナー対立遺伝子を標的化して、ミスマッチ対立遺伝子を除外する。この実施例では、A*02:01:01:01 および A*29:02:01:01 がドナーと患者との間のミスマッチ対立遺伝子であるため、gRNA 同定システムは、これらを標的化し、対立遺伝子 B*08:01:01、DRB1*03:01:01:01、B*44:03:01 および DRB1*07:01:01:01 はドナーと患者との間で一致することから、これらを排除する。図 29 に示すように、オフターゲットスコア（2910）が gRNA の各々について表示され、これらのリストが、オフターゲットスコアに基づいてランク付けされる。また、gRNA 配列（2905）も表示される。さらに、各 gRNA と一緒に用いられる Cas9 分子のタイプが「タイプ」として表示される（2915）。「sa」は、S. アウレリウス（S. aureus）由来の Cas9 分子を指し、「spy」は、S. ピオゲネス（S. pyogenes）由来の Cas9 分子を指す。また、列記される gRNA の各々が結合する鎖は、－鎖および＋鎖としても表示される（2920）。

【0881】

前述したように、gRNA 同定システムは、ミスマッチ対立遺伝子を編集するのに好適な gRNA のリストに加えて、他の出力も提供し得る。図 30 は、一実施形態例に従って、gRNA 同定システムの出力として対立遺伝子配列を示す例示的な表 3000 を示す。対立遺伝子配列は、レシピエントもしくはドナーまたは双方の 1 つまたは複数の対立遺伝子のものであってもよい。

【0882】

図 31A は、一実施形態例に従って、gRNA 同定システムの出力としてハプロタイプ頻度を示す例示的な表 3100 を示す。ハプロタイプの発生頻度は、系統に基づいて示す。図 31B は、一実施形態例に従って、gRNA 同定システムの出力として対立遺伝子頻度を示す例示的な表 3150 を示す。対立遺伝子の発生頻度は、系統に基づいて示す。図 32 は、gRNA 同定システムの出力としての主要組織適合性複合体（MHC）を考慮したマイナー組織適合性抗原（miHAg）制限を示す例示的な表 3200 を示す。

【0883】

データベースおよび gRNA 同定システムの例示的な使用では、ユーザーは、ドナーの限定的な HLA 遺伝子型情報と共にクエリーを入力してもよい。例えば、限定的な HLA 遺伝子型情報は、対立遺伝子群および具体的な HLA タンパク質についての情報を含み得る。別の実施例では、限定的な HLA 遺伝子型情報は、対立遺伝子群、具体的な HLA タンパク質、およびコード領域内の同義 DNA 置換についての情報を含み得る。限定的な HLA 遺伝子型情報に、ユーザーは、非コード領域の相違を示す情報を含めない場合がある。

【0884】

こうした限定的なHLA遺伝子型情報がクエリーとしてデータベースに送られると、gRNA同定システムは、アラインメントなどのさらなる調査のために標的対立遺伝子の全サブタイプの配列を検索結果として提供し得る。別の実施形態では、gRNA同定システムは、特定のガイドについてオンターゲットもしくはオフターゲット部位を有する標的対立遺伝子のサブタイプの数またはパーセンテージを検索結果として提供する場合もあり、これは、このgRNAが、どれくらいドナーにおける未知の標的HLAサブタイプを編集する見込みがあるかを示し得る。また別の実施例では、gRNA同定システムは、特定のgRNAについてオンターゲットもしくはオフターゲット部位を有する、除外された対立遺伝子のサブタイプの数またはパーセンテージを検索結果として提供する場合もあり、これは、このgRNAが、どれくらいドナーにおける未知の除外HLAサブタイプにオフターゲット効果を有する見込みがあるかを示し得る。

10

【0885】

図33は、一実施形態例に従って、gRNA同定システムをインプリメントするためのシステム3300を描写するネットワーク図を示す。システム3300は、ネットワーク3305、装置3310、サーバー3320、データベース管理システム3340、およびデータベース3350を含み得る。構成要素3310、3320、3340、および3350の各々は、ネットワーク3305と連絡している。

【0886】

一実施形態例では、ネットワーク3305の1つまたは複数の部分は、アドホックネットワーク(ad hoc network)、イントラネット、エクストラネット、バーチャル・プライベート・ネットワーク(VPN)、ローカル・エリア・ネットワーク(LAN)、無線LAN(WLAN)、ワイド・エリア・ネットワーク(WAN)、無線ワイド・エリア・ネットワーク(WWAN)、メトロポリタン・エリア・ネットワーク(MAN)、インターネットの1部分、公衆交換電話ネットワーク(Public Switched Telephone Network)(PSTN)の1部分、携帯電話ネットワーク、無線ネットワーク、WiFiネットワーク、WiMaxネットワーク、その他のあらゆるタイプのネットワーク、またはこうしたネットワークの2つ以上の組合せであってよい。

20

【0887】

装置3310は、限定はしないが、ワークステーション、コンピューター、汎用コンピューター、インターネットアプライアンス、携帯用デバイス、ワイアレスデバイス、ポータブルデバイス、ウェアラブルコンピューター、携帯もしくは移動電話、携帯型情報端末(PDA)、スマートフォン、タブレット、ウルトラブック、ネットブック、ラップトップ、デスクトップ、マルチプロセッサシステム、マイクロプロセッサベースのもしくはプログラム可能な家庭用電化製品、ミニコンピューターなどを含み得る。装置3310は、図34に示すコンピューター3400に関して記載される1つまたは複数の構成要素を含んでよい。

30

【0888】

装置3310は、有線または無線接続を介してネットワーク3305に接続され得る。装置3310は、限定はしないが、ウェブブラウザアプリケーション、データベース管理システム、および本明細書に記載のgRNA同定システムなどの1つまたは複数のアプリケーションまたはソフトウェアシステムを含み得る。

40

【0889】

一例示的实施形態では、装置3310は、本明細書に記載される全ての機能を実施することも可能である。他の実施形態では、gRNA同定システムは、装置3310に搭載されてもよく、サーバー3320が、本明細書に記載される機能を実施する。また別の実施形態では、装置3310は、一部の機能を実施することができ、サーバー3320が、本明細書に記載される他の機能を実施する。

【0890】

サーバー3320、データベース管理システム3340、およびデータベース3350

50

は、有線接続を介してネットワーク 3305 に接続されている。あるいは、サーバー 3320、データベース管理システム 3340、およびデータベース 3350 の 1 つまたは複数が、無線接続を介してネットワーク 3305 に接続されてもよい。サーバー 3320 は、ネットワーク 3305 を介して、装置 3310、データベース管理システム 3340、およびデータベース 3350 と連絡するように設計された 1 つまたは複数のコンピューターまたはプロセッサを含む。サーバー 3320 は、装置 3310 によりアクセスされる 1 つまたは複数のアプリケーションもしくはウェブサイトを提供する、および／またはデータベース 3350 のコンテンツへのアクセスを促進する。データベース管理システム 3340 は、データベース 3350 へのアクセスを促進するように設計された 1 つまたは複数のコンピューターもしくはプロセッサを含む。データベース 3350 は、装置 3310 またはサーバー 3320 による使用のためのデータおよび／または命令（もしくはコード）を保存するための 1 つまたは複数の記憶装置を含む。データベース 3350 はまた、図 27A、27B、および 27C に関して説明したデータベーススキーマ 2700 または 2700' に従って、データを保存し得る。データベース管理システム 3340、データベース 3350、および／またはサーバー 3320 は、互いにまたは装置 3310 から地理的に分散された 1 つまたは複数の位置に配置してもよい。あるいは、データベース 3350 をサーバー 3320 内に搭載してもよい。

【0891】

図 34 は、本明細書に記載される gRNA 同定システム 2400 の例示的实施形態をインプリメントするために使用することができる例示的なコンピューター 3400 のブロック図である。コンピューター 3400 は、1 つまたは複数のコンピューター実行可能命令または例示的な実施形態をインプリメントするためのソフトウェアを保存するための 1 つまたは複数の非一時的コンピューター可読媒体を含む。非一時的コンピューター可読媒体としては、限定はしないが、1 または複数タイプのハードウェアメモリー、非一時的有形的表現媒体（例えば、1 つまたは複数の磁気記憶ディスク、1 つまたは複数の光ディスク、1 つまたは複数のフラッシュドライブ）などを含み得る。例えば、コンピューター 3400 に組み込まれたメモリー 3406 は、コンピューター可読およびコンピューター実行可能命令、または gRNA 同定システム 2400 の例示的な実施形態をインプリメントするためのソフトウェアを保存し得る。コンピューター 3400 はまた、コンピューター可読およびコンピューター実行可能命令、またはメモリー 3406 に保存されたソフトウェア、ならびにシステムハードウェアを制御するための他のプログラムを実行するために、構成可能および／またはプログラム可能プロセッサ 3402 と付属コア 3404、ならびに任意選択的に、1 つまたは複数の追加的構成可能および／またはプログラム可能プロセッサ 3402' と付属コア 3404' も含む（例えば、複数のプロセッサ／コアを備えるコンピューターシステムの場合）。プロセッサ 3402 およびプロセッサ 3402' は、各々、単一コアプロセッサまたは複数のコア（3404 および 3404'）プロセッサであってもよい。

【0892】

コンピューター内のインフラストラクチャーおよびリソースが動的に共有され得るように、コンピューター 3400 に可視化を使用してもよい。複数のプロセッサで実行中のプロセスに対処して、プロセスが、複数のコンピューターリソースではなく、ただ 1 つのコンピューターリソースを使用していることがわかるようにするために、ビジュアル・マシン 3414 を設置してもよい。

【0893】

メモリー 3406 は、DRAM、SRAM、EDO RAM などのコンピューターシステムメモリーまたはランダムアクセスメモリーを含んでもよい。メモリー 3406 は、その他のタイプのメモリー、またはそれらの組合せを同様に含んでもよい。

【0894】

ユーザーは、コンピューター・モニターなどの画面表示装置 3418 によって、コンピューター 3400 と相互作用することができ、画面表示装置は、例示的な実施形態に従っ

10

20

30

40

50

て設置され得る1つまたは複数のグラフィカル・ユーザー・インターフェイス3422を表示することができる。コンピューター3400は、ユーザーからの入力を受信するための他のI/Oデバイス、例えば、キーボードもしくは任意の好適なマルチタッチインターフェイス3408、ポインティング装置3410（例えば、マウス）、マイクロフォン3428、および／または画像取り込み装置3432（例えば、カメラもしくはスキャナー）を含んでもよい。マルチタッチインターフェイス3408（例えば、キーボード、ピンパッド、スキャナー、タッチスクリーンなど）およびポインティング装置3410（例えば、マウス、スタイラスペンなど）は、画面表示装置3418に接続してもよい。コンピューター3400は、他の好適な通常のI/O周辺機器を含んでもよい。

【0895】

コンピューター3400は、コンピューター可読およびコンピューター実行可能命令および／または本明細書に記載のgRNA同定システム2400の例示的な実施形態をインプリメントするためのソフトウェアを保存するために、ハードドライブ、CD-ROM、またはその他のコンピューター可読媒体などの1つまたは複数の記憶装置3424も含み得る。例示的な記憶装置3424は、例示的な実施形態をインプリメントするのに必要な任意の好適な情報を保存するための1つまたは複数のデータベースをさらに含んでもよい。例えば、例示的な記憶装置3424は、システム2400およびデータベーススキーマ2700、2700'によって使用される情報、例えば、対立遺伝子配列、gRNA配列、ハプロタイプ、系統情報、miHA g情報、MHC情報オフターゲットスコア、および／またはその他の情報を保存するための1つまたは複数のデータベース3426を保存することができる。データベースは、任意の好適な時点で手動もしくは自動的に更新されて、データベース内の1つまたは複数のアイテムを追加、削除、および／または更新し得る。

【0896】

コンピューター3400は、1つまたは複数のネットワーク装置3420を介して、1つまたは複数のネットワーク、例えば、ローカル・エリア・ネットワーク（LAN）、ワイド・エリア・ネットワーク（WAN）またはインターネットとインターフェイス接続するように設計されたネットワークインターフェイス3412を含むことができ、これは、多様な接続、限定はしないが、標準電話回線、LANもしくはWANリンク（例えば、802.11、T1、T3、56kb、X.25）、ブロードバンド接続（例えば、ISDN、フレーム・リレー、ATM）、無線接続、コントローラー・エリア・ネットワーク（CAN）、またはこれらのいずれかもしくは全部の組合せを通して行われる。例示的な実施形態では、コンピューター3400は、コンピューター3400とネットワーク間の無線連絡（例えば、ネットワークインターフェイスを介した）を促進するために、1つまたは複数のアンテナ3430を含むことができる。ネットワークインターフェイス3412は、搭載型ネットワークアダプター、ネットワークインターフェースカード、PCMCIAネットワークカード、カードバスネットワークアダプター、無線ネットワークアダプター、USBネットワークアダプター、モデムまたは、コミュニケーション可能で、かつ本明細書に記載の操作を実施することができる任意のタイプのネットワークにコンピューター3400をインターフェイス接続するのに好適ないずれか他の装置を含んでもよい。さらに、コンピューター3400は、例えば、ワークステーション、デスクトップコンピューター、サーバー、ラップトップ、携帯型コンピューター、タブレットコンピューター（例えば、iPad（登録商標）タブレットコンピューター）、モバイルコンピューターもしくはコミュニケーション・デバイス（例えば、iPhone（登録商標）コミュニケーション・デバイス）、POS端末装置、企業内デバイス、またはコミュニケーション可能で、かつ本明細書に記載の操作を実施する上で十分なプロセッサ能力およびメモリー容量を有するその他の形態のコンピューターもしくは電気通信デバイスなど、あらゆるコンピューターシステムであってよい。

【0897】

コンピューター3400は、例えば、Microsoft（登録商標）Windows（登録商標）操作システム、Unix（登録商標）およびLinux（登録商標）操作シ

10

20

30

40

50

システムの様々なリリース、Macintoshコンピュータ用Mac OS（登録商標）のあらゆるバージョン、あらゆる組み込み操作システム、あらゆるリアルタイム操作システム、あらゆるオープンソース操作システム、あらゆる専有操作システム、または本明細書に記載のコンピュータで実行することができ、かつ本明細書に記載の操作を実施することができる任意の他の操作システムなど、あらゆる操作システム3416を実行し得る。例示的な実施形態では、操作システム3416は、ネイティブモードまたはエミュレートモードで実行し得る。例示的な実施形態では、操作システム3416は、1つまたは複数のクラウドマシンインスタンスで実行し得る。

【0898】

以下の説明は、当業者が、対立遺伝子に対するgRNAを同定するコンピューターシステム構成ならびに関連方法および製品を作製し、使用することを可能にするために呈示される。本明細書に記載されるデータベーススキーマは、CRISPR/Cas9分子と共に使用するgRNAを同定するために例示されるが、当業者には、本明細書に記載されるデータベーススキーマおよびgRNA同定方法を用いて、他のヌクレアーゼ（例えば、TALEN、Cpf1、およびジンクフィンガーヌクレアーゼ）と共に使用することができる配列を同定し、選択し得ることは容易に明らかであろう。これらの実施形態例に対する様々な変更が当業者には容易に明らかとなり、本明細書で定義される一般的原理は、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、他の実施形態および用途に適用することができる。さらに、以下の説明において、説明の目的で多くの具体的事項が記載される。しかし、当業者であれば、本発明が、こうした具体的事項を使用しなくても実施され得ることは理解されよう。他の事例では、不必要な細部によって本発明の説明を不明瞭にしないために、公知の構造およびプロセスはブロック図で示される。従って、本開示は、示される実施形態に限定するのではなく、本明細書に開示される原理および特徴と一致する最も広い範囲と一致させることが意図される。

【0899】

例示的な実施形態の説明に際して、明瞭化のために特定の技術用語が使用される。説明を目的として、具体的用語は各々、類似の目的を達成するために類似の様式で作動するあらゆる技術的および機能的同等物を少なくとも含むことが意図される。さらに、特定の例示的な実施形態が、複数のシステム要素を含むいくつかの事例では、デバイス構成要素または方法ステップ、それらの要素、構成要素もしくはステップは、単一の要素、構成要素もしくはステップに代えることも可能である。同様に、単一の要素、構成要素もしくはステップを、同じ目的を果たす複数の要素、構成要素もしくはステップに代えることもできる。さらに、例示的な実施形態は、それらの特定の実施形態を参照にして図示および説明してきたが、当業者は、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、形態および細部に様々な代用および改変を加えられることは理解されよう。さらにまた、他の実施形態、機能および利点も本発明の範囲内である。

【0900】

説明の目的で例示的なフローチャートが提供され、これらは、方法の非限定的な例である。当業者であれば、例示的な方法が、例示的なフローチャートに示されるものより多いもしくは少ないステップを含み得ること、ならびに例示的なフローチャート中のステップは、例示的なフローチャートに示される順序とは異なる順序で実施され得ることを認識されよう。

【実施例】

【0901】

以下の実施例は単なる例示であり、本発明の範囲または内容をどのようにも限定することとは意図されない。

【0902】

実施例1：gRNAのクローニングおよび最初のスクリーニング

候補gRNAの適合性は、本実施例に記載されるように評価され得る。キメラgRNAについて記載されるが、アプローチはまた、モジュラーgRNAを評価するのに使用さ

れ得る。

【0903】

ベクターに gRNA をクローニングする

各 gRNA 毎に、1 対の重複オリゴヌクレオチドが設計されて入手される。オリゴヌクレオチドは、アニールされて、長いキメラ gRNA の上流 U6 プロモーターおよび残りの配列を含有する、消化ベクター骨格にライゲートされる。プラスミドは配列確認されて、十分な量の形質移入品質の DNA を生成するために準備される。交互の (A l t e r n a t e) プロモーターを使用して、生体内転写 (例えば、H1 プロモーター) または生体外転写 (例えば、T7 プロモーター) が駆動されてもよい。

【0904】

直鎖 dsDNA 分子中で gRNA をクローニングする (S T I T C H R)

各 gRNA 毎に、単一オリゴヌクレオチドが設計されて入手される。U6 プロモーターおよび gRNA スキャフォールド (例えば、第1の相補的ドメイン; 連結ドメイン; 第2の相補的ドメイン; 隣接ドメイン; およびテールドメインをはじめとする、crRNA および tracrRNA に由来する配列をはじめとする、標的化ドメイン以外の全てを含む) は、別々に PCR 増幅されて、dsDNA 分子として精製される。gRNA 特異的オリゴヌクレオチドが PCR 反応で使用されて、オリゴヌクレオチド中で特定化された標的化ドメインによって連結する、U6 および gRNA スキャフォールドを縫い合わせる。結果として生じる dsDNA 分子 (S T I T C H R 生成物) は、形質移入のために精製される。交互の (A l t e r n a t e) プロモーターを使用して、生体内転写 (例えば、H1 プロモーター) または生体外転写 (例えば、T7 プロモーター) が駆動されてもよい。任意の gRNA スキャフォールドを使用して、任意の細菌種に由来する Cas9 と適合性の gRNA が生成されてもよい。

【0905】

最初の gRNA スクリーニング

試験される各 gRNA は、プラスミド発現 Cas9 および小量の GFP 発現プラスミドと共に、ヒト細胞に形質移入される。予備実験では、これらの細胞は、93T、K562 または U2OS などの不死化ヒト細胞株であり得る。代案としては、初代ヒト細胞が使用されてもよい。この場合、細胞は、最終的な治療細胞標的 (例えば、赤血球系細胞) に関連があってもよい。可能な治療標的細胞集団と類似した初代細胞の使用は、内在性クロマチンおよび遺伝子発現の文脈で、遺伝子標的化比率に関する重要な情報を提供してもよい。

【0906】

形質移入は、(リポフェクタミンまたは Fugene などの) 脂質移入を使用して、または (ロンザヌクレオフェクション (Lonza Nucleofection) (商標) などの) 電気穿孔によって実施されてもよい。形質移入に続いて、GFP 発現は、蛍光顕微鏡検査またはフローサイトメトリーのどちらかによって判定され、一貫した高レベルの形質移入が確認され得る。これらの予備形質移入は、異なる gRNA および異なる標的化アプローチ (17 量体、20 量体、ヌクレアーゼ、二重ニッカーゼなど) を含み、いずれの gRNA / gRNA 組み合わせが最大活性を与えるかが判定され得る。

【0907】

各 gRNA の切断効率は、T7E1 タイプアッセイまたは配列決定によって、標的遺伝子座における NHEJ 誘導インデル形成を測定することで、評価されてもよい。代案としては、Cell / Surveyor ヌクレアーゼなどのその他のミスマッチ感受性酵素もまた使用されてもよい。

【0908】

T7E1 アッセイでは、PCR アンプリコンは、およそ 500 ~ 700 bp であり、意図される切断部位は、アンプリコン中に非対称的に配置される。PCR 産物の増幅、精製、およびサイズ検証に続いて、95 °C に加熱して、次に、緩慢に冷却することで、DNA は変性され再ハイブリダイズされる。ハイブリダイズ PCR 産物は、次に、非完全にマッチする DNA を認識して切断する、T7 エンドヌクレアーゼ I (またはその他のミスマッ

10

20

30

40

50

チ感受性酵素)で消化される。最初のテンプレートDNA中にインデルが存在する場合、アンプリコンは変性されて再アニールされ、それは異なるインデルを有するDNA鎖のハイブリダイゼーションをもたらす、ひいては完全にはマッチしない二本鎖DNAをもたらす。消化産物は、ゲル電気泳動またはキャピラリー電気泳動法によって視覚化されてもよい。切断されたDNAの割合(切断および比切断密度で除した分解産物密度)を使用して、次の方程式を使用して、パーセントNHEJが推定されてもよい： $\%NHEJ = (1 - (1 - \text{切断割合})^{1/2})$ 。T7E1アッセイは、約2～5%NHEJに至るまで感受性である。

【0909】

T7E1アッセイの代わりに、またはそれに加えて、配列決定が使用されてもよい。サンガー配列決定では、精製PCRアンプリコンがプラスミド骨格にクローン化され、形質転換されて、単一プライマーでミニプレップされて配列決定される。T7E1によってNHEJ比率を判定した後に、サンガー配列決定を使用して、インデルの正確な性質が判定されてもよい。

【0910】

配列決定はまた、次世代配列決定技術を使用して実施されてもよい。次世代配列決定を使用する場合、アンプリコンは300～500bpであってもよく、意図される切断部位は非対称的に配置される。PCRに続いて、例えば、(例えば、Illumina MiSeq上の)ハイスループット配列決定で使用する次世代配列決定アダプターおよびバーコード(例えばIllumina多重アダプターおよびインデックス)が、アンプリコンの末端に付加されてもよい。この方法は、非常に低いNHEJ比率の検出を可能にする。

【0911】

実施例2：NHEJによる遺伝子標的化の評価

遺伝子標的化効率のさらなる評価のために、最初の試験で最大レベルのNHEJを誘導するgRNAが選択され得る。この場合、細胞は疾病対象に由来し、したがって関連変異を有する。

【0912】

形質移入に続いて(通常は形質移入の2～3日後)、ゲノムDNAが形質移入細胞の混合集団から単離されてもよく、PCRを使用して標的領域が増幅されてもよい。PCRに続いて、所望の変異体(標的遺伝子のノックアウトまたは標的配列モチーフの除去のどちらか)を生成する遺伝子標的化効率が、配列決定によって判定されてもよい。サンガー配列決定では、PCRアンプリコンは、500～700bp長であってもよい。次世代配列決定では、PCRアンプリコンは、300～500bp長であってもよい。遺伝子機能のノックアウトが目的である場合、配列決定を使用して、遺伝子機能を破壊することが予期されるフレームシフトまたは大規模な欠失または挿入をもたらすNHEJ誘導インデルを、対立遺伝子の何パーセントが受けたかが評価されてもよい。特定の配列モチーフの除去が目的であれば、配列決定を使用して、この配列に広がる対立遺伝子の何パーセントが、NHEJ誘導欠失を受けたかが評価されてもよい。

【0913】

実施例3：HDRによる遺伝子標的化の評価

遺伝子標的化効率のさらなる評価のために、最初の試験で最大レベルのNHEJを誘導するgRNAを選択することができる。この場合、細胞は疾病対象に由来し、したがって関連変異を有する。

【0914】

形質移入に続いて(通常は形質移入の2～3日後)、形質移入細胞の混合集団からゲノムDNAを単離してもよく、PCRを使用して標的領域を増幅してもよい。PCRに続いて、遺伝子標的化効率を、いくつかの方法によって判定することができる。

【0915】

遺伝子標的化の頻度の決定は、細胞外から提供された供与体テンプレートまたは内在性ゲノム供与体配列を用いた相同組換え修復(HDR)を受け、したがって、所望の修正を

10

20

30

40

50

組み込んでいる対立遺伝子のパーセンテージを測定することを含む。所望のHDR事象が、制限酵素部位を生成または破壊する場合、遺伝子標的化の頻度は、RFLPアッセイにより決定してもよい。制限部位が生成または破壊されない場合、配列決定を用いて、遺伝子標的化頻度を決定することもできる。RFLPアッセイを使用する場合、やはり配列決定を用いて、所望のHDR事象を確認し、他の変異が存在しないことを確実にすることも可能である。細胞外から提供される供与体テンプレートを使用する場合、プライマーの少なくとも1つを相同性アームに含まれる領域外側の内在性遺伝子配列内に配置し、これによって、細胞中にまだ存在する供与体テンプレートの増幅を防止する。したがって、供与体テンプレート内に存在する相同性アームの長さは、PCRアンプリコンの長さに作用し得る。PCRアンプリコンは、供与体領域全体（相同性アームの外側に位置する双方のプライマー）に広がるか、またはこれらのアンプリコンは、供与体領域の一部のみと、供与体および内在性DNA同士の単一結合とに広がる（1つの内部プライマーと1つの外部プライマー）。アンプリコンの広がり、ドナー全体に満たない場合、2つの異なるPCRを用いて、5'および3'結合の双方を増幅し、配列決定すべきである。

【0916】

PCRアンプリコンが短い（600bp未満）場合、次世代配列決定を使用することが可能である。PCRの後、次世代配列決定アダプターおよびバーコード（例えば、Illuminaマルチプレックスアダプターおよびインデックス）を、例えば、ハイスループット配列決定（例えば、Illumina MiSeq上の）に使用するために、アンプリコンの末端に付加してもよい。この方法は、非常に低い遺伝子標的化率の検出を可能にする。

【0917】

PCRアンプリコンが次世代配列決定には長すぎる場合、サンガー（Sanger）配列決定を実施することができる。サンガー配列決定のためには、精製されたPCRアンプリコンをプラスミド骨格にクローニングし（例えば、LifeTechZero Blunt（登録商標）TOPO（登録商標）クローニングキットを用いてクローニングされたTOPO）、形質転換し、ミニプレップした後、配列決定する。

【0918】

前述した同じまたは類似のアッセイを用いて、内在性ゲノム供与体配列によるHDRを受け、従って、所望の修正を組み込んでいる対立遺伝子のパーセンテージを測定することができる。

【0919】

実施例4：CCR5遺伝子座に標的化されたS.アウレウス（S. aureus）の試験
野生型CCR5遺伝子産物の発現を阻止するように遺伝子修飾されたオートロガスCD34⁺造血幹／前駆細胞（HSPC）は、通常、HIV感染を受けやすいHIVウイルスHSPC子孫（例えば、マクロファージおよびCD4Tリンパ球）の侵入を阻止する。臨床的に、CCR5ケモカイン受容体のコード配列に遺伝子変異を含むHSPCの移植は、HIV感染を長期間制御することが証明されている（Huetter, et al., New England Journal Of Medicine, 2009; 360（7）：692-698）。CRISPR/Cas9プラットフォームを用いたゲノム編集は、例えば、編集された遺伝子座での遺伝子発現の阻害をもたらす得る標的化切断部位にインデルを生成することによって、内在性遺伝子標的を正確に改変する。この実施例では、セクションII（gRNAをデザインする方法）に記載される基準に基づいて選択された11のS.アウレウス（S. aureus）Cas9gRNA（表23）を用いた遺伝子編集。

【0920】

ヒト293FT細胞（Life Technologies）は、S.アウレウス（S. aureus）Cas9をコードするプラスミドDNAと、U6プロモーターから標的細胞において転写される別のS.アウレウス（S. aureus）gRNAをコードするオリゴヌクレオチドで形質移入した（Lipofectamine（商標）、製造者の指

10

20

30

40

50

示に従って)。形質移入に対して48および72時間の時点でゲノムDNAを単離し、CCR5遺伝子座PCRをgDNAで実施した後、T7E1エンドヌクレアーゼアッセイによりインデルを分析した。表示する数値は、2つの反復測定値の平均値 $\pm$ s.d.である(図8)。CCR5遺伝子座のインデルを検出するために、形質移入からのゲノムDNAサンプルから増幅したCCR5遺伝子座特異的PCR産物についてT7E1アッセイを実施した後、CCR5遺伝子座で検出されたインデルのパーセンテージを計算した。S. アウレウス(S. aureus) CCR5 gRNAおよびS. アウレウス(S. aureus) Cas9プラスミドDNAと接触させた細胞において、最大40%のインデルが検出された。

【0921】

【表63】

表 23. S.アウレウス(*S. aureus*)Cas9 gRNA 標的配列

S.アウレウス(<i>S. aureus</i>) gRNA 名称	S.アウレウス(<i>S. aureus</i>)gRNA 標的配列	配列番号
CCR5_Sa1	GCC UAU AAA AUA GAG CCC UGU C	351
CCR5_Sa2	AUA CAG UCA GUA UCA AUU CUG G	352
CCR5_Sa3	GUG GUG ACA AGU GUG AUC AC	353
CCR5_Sa4	CCA UAC AGU CAG UAU CAA UUC UGG	354
CCR5_Sa5	AAG CCU AUA AAA UAG AGC CCU GUC	355
CCR5_Sa6	UGG GGU GGU GAC AAG UGU GAU CAC	356
CCR5_Sa7	GGG UGG UGA CAA GUG UGA UCA C	357
CCR5_Sa8	GGU GAC AAG UGU GAU CAC	358
CCR5_Sa9	GCC UUU UGC AGU UUA UCA GGA U	359
CCR5_Sa10	GCU CUA UUU UAU AGG CUU CUU CUC	360
CCR5_Sa11	GCU CUU CAG CCU UUU GCA GUU UAU	361

【0922】

実施例5：5'キャップおよび3'ポリAテールの付加によるgRNAの修飾は、標的ゲノム遺伝子座でのゲノム編集を増加すると共に、CD34+細胞生存能力および生存期間を改善する

ウイルス-宿主共進化の間に、mRNAのキャッピングを模倣するウイルスRNAキャッピングは進化して、ウイルスRNAが、細胞の自然免疫系からの検出を免れることを可能にした(Deleclercq et al., 2012, Nature Reviews Microbiology 10:51-65)。造血幹/前駆細胞中のトル様受容体は、自然免疫応答、細胞老化、およびプログラム細胞死を引き起こし得る外来の一本鎖および二本鎖RNAの存在を感知する(Kajaste-Rudnitski and Naldini, 2015, Human Gene Therapy, 26:201-209)。初期実験の結果から、GFPMRNA単独を用いて電気穿孔された細胞と比較して、非修飾標的特異的gRNAおよびCas9mRNAを用いて電気穿孔されたヒト造血幹/前駆細胞は、細胞寿命、増殖能、複能性の低減(例えば、赤血球分化能の喪失および歪んだ骨髓系分化)を招くことが立証された。この課題に取り組むために、細胞の老化およびアポトーシスは、外来核酸の標的細胞感知および自然免疫応答の誘導、さらにはこれに続くプログラム細胞死の誘導ならびに増殖能および分化能の喪失に起因すると仮定された。

【0923】

造血/幹前駆細胞におけるゲノム編集の最適化のために、ならびにこの仮定を検証する目的で、動員末梢血および骨髓由来のヒトCD34+細胞を、5'キャップおよび3'ポリAテールの付加と共に、または付加なしで、インビトロ転写されたHBB(HBB-8gRNA; 配列番号217)またはAAVS1(gRNA AAVS1-1; 配列番号218)標的化gRNAと共に送達されるS. ピオゲネス(*S. pyogenes*) Cas9mRNAで(Maxcyte装置を用いて)電気穿孔した。

【0924】

図9～11に示すように、キャップおよびテール付加 gRNA の電気穿孔は、ヒト CD34⁺ 細胞寿命および生存能力を高めた。CD34⁺ 細胞は、それぞれ Cas9 mRNA (S. ピオゲネス (S. pyogenes) (Sp) または S. アウレウス (S. aureus) (Sa) Cas9) と組み合わせた表示のキャップ／テールなし gRNA またはキャップ／テール付加 gRNA で電気穿孔した。対照サンプルは、GFP mRNA 単独で電気穿孔された細胞または電気穿孔されていないが、表示の時間枠で培養した細胞を含む。

【0925】

単一のキャップおよびテールなし HBB または AAVS1 gRNA とそれぞれ組み合わせた Cas9 で電気穿孔したヒト CD34⁺ 細胞は、5' キャップおよび 3' ポリA テールを含むようにインビトロで転写された同じ gRNA 配列で電気穿孔した細胞と比較して、培養中の3日にわたって低い増殖能を示した (図9)。Cas9 mRNA と一緒に送達された他のキャップおよびテール付加 gRNA (HBB (HBB-8 gRNA; 配列番号 217)、AAVS1 (AAVS1-1 gRNA; 配列番号 218)、CXCR4 (CXCR4-231 gRNA; 配列番号 214) および CCR5 (CCR-U43 gRNA; 配列番号 216) 遺伝子座) に標的化されている) は、送達後3日にわたる生存 CD34⁺ 細胞の総数の倍率増加の比較によって決定される通り、HSPC 生存能力、増殖、または複能性にマイナスに影響を及ぼさなかった。重要なことには、GFP mRNA と接触させた細胞または非処理の細胞と比較して、キャップおよびテール付加 gRNA および Cas9 mRNA と接触させた CD34⁺ 細胞の増殖能に差はなかった。Cas9 mRNA および gRNA との接触後 72 時間時点での細胞生存能力の分析 (7-アミノアクチノマイシン D または ヨウ化プロピジウム のいずれかと アネキシン (Annexin) V 抗体の同時染色、それに続くフローサイトメトリー分析による) から、キャップおよびテール付加 gRNA と接触した細胞は、培養中に拡大して、生存能力を維持したが、キャップおよびテールなし gRNA と接触させた HSC は、生存細胞数に減少を示すことが判明した (図10)。また、キャップおよびテール付加 gRNA と接触した生存細胞 (ヨウ化プロピジウム陰性) は、CD34 細胞表面マーカーの発現も維持した (図11)。

【0926】

図12、13、14A～14B、15A および 15B に示すように、Cas9 mRNA およびキャップおよびテール付加 gRNA の電気穿孔は、ヒト CD34⁺ 細胞における効率的な編集およびそれらの子孫を支持した。

【0927】

改善された生存期間に加えて、キャップおよびテール付加 AAVS1 特異的 gRNA と接触した標的細胞は、Cas9 mRNA およびキャップ／テールなし gRNA と接触した細胞と比較して、より高いオンターゲットゲノム編集率 (% インデル) も示した (図12)。さらに、キャップ／テール付加 gRNA を含む Cas9 mRNA と接触した CD34⁺ 細胞の子孫の方が、キャップ／テールなし gRNA を含む Cas9 mRNA と接触した CD34⁺ 細胞の子孫と比較して、より高いレベルの標的化編集が検出された (図12、CFC)。キャップ／テールなし gRNA の送達は、コロニー形成細胞 (CFC) アッセイで決定される通り、CD34⁺ 細胞の生体外造血能も低下した。Cas9 mRNA と一緒に、キャップおよびテールなし gRNA と接触した細胞は、総コロニー形成能 (例えば、力価) の喪失およびコロニーサブタイプの多様性の減少 (例えば、赤血球および前駆細胞能の喪失ならびに子孫における骨髄マクロファージ表現型への歪み) を示した (図13)。対照的に、キャップおよびテール付加 gRNA と接触した細胞は、CD34⁺ 細胞から分化したコロニーの総数およびコロニー多様性 (混合造血コロニー [GEMM] および赤血球コロニー [E] の検出) の双方に関して CFC 能力を維持した。

【0928】

次に、キャップおよびテール付加 HBB 特異的 gRNA をいずれかの Cas9 mRNA と共送達するか、または Cas9 リボ核タンパク質 (RNP) と複合体化した後、HSPC の特定の特徴を模倣することが明らかにされた赤白血病細胞株である K562 細胞に電

気穿孔した。キャップおよびテール付加 gRNA と Cas9 mRNA または RNP を共送達すると、HBB 遺伝子座 PCR 産物の T7E1 アッセイ分析によって決定される通り、HBB 遺伝子座で高レベルのゲノム編集がもたらされた (図 14A)。次に、3つの異なるキャップおよびテール付加 gRNA (HBB、AAVS1、および CXCR4 遺伝子座を標的化する) を *S. pyogenes* Cas9 mRNA と一緒に、臍帯血 (CB) から単離された CD34⁺ 細胞に共送達した。この場合、様々な量の gRNA (2もしくは10 μg の gRNA および 10 μg の *S. pyogenes* Cas9 mRNA) を細胞中に電気穿孔し、遺伝子座 PCR 産物の T7E1 アッセイ分析により標的遺伝子座でのゲノム編集のパーセンテージを評価した。対照的に、Cas9 mRNA と一緒にキャップおよびテールなし HBB gRNA で電気穿孔された CB CD34⁺ 細胞からのゲノム DNA には HBB 遺伝子座に切断が検出されなかった。この結果は、Cas9 mRNA とキャップおよびテール付加 gRNA で電気穿孔された CB CD34⁺ 細胞は、増殖能およびコロニー形成能を維持することを示した。5~20% のインデルが標的遺伝子座で検出され、Cas9 mRNA と共送達されたキャップおよびテール付加 gRNA の量は、標的化編集のパーセンテージに影響しなかった (図 14B)。T7E1 アッセイを実施した後の表示の遺伝子座特異的 PCR 産物の代表的なゲル画像は、電気穿孔 (Maxcyte 装置) により *S. pyogenes* Cas9 mRNA と共送達されたキャップおよびテール付加遺伝子座特異的 gRNA (AAVS1、HBB、および CXCR4 gRNA) の送達から 72 時間後の CB CD34⁺ 細胞の標的化遺伝子座に切断を示している (図 15A)。重要なことには、Cas9 mRNA または gRNA と接触しなかった細胞 (すなわち、非処理対照) と比較して、*S. pyogenes* Cas9 mRNA と共送達されたキャップおよびテール付加 AAVS1 特異的 gRNA、HBB 特異的 gRNA、もしくは CXCR4 特異的 gRNA で電気穿孔された細胞の生存能力に差はなかった。フローサイトメトリー分析により決定される通り、7-AAD および アネキシン V についてのネガティブ染色法によって生存細胞が示される (フローサイトメトリープロットの左下部、図 15B)。*S. pyogenes* Cas9 mRNA と共送達されたキャップおよびテール付加 AAVS1 特異的 gRNA、HBB 特異的 gRNA、または CXCR4 特異的 gRNA で電気穿孔された CB CD34⁺ 細胞は、CFC アッセイにより決定される通り、生体外造血コロニー形成能を維持した。HBB 特異的 gRNA および Cas9 と接触した細胞についての CFC アッセイにおける生体外造血能のグラフを図 14C に示す。

【0929】

実施例 6：ドナー細胞中の単一 HLA-A 対立遺伝子を破壊するための Cas9 / gRNA の標的化と、レシピエント対立遺伝子による HLA-A 対立遺伝子の置換

この実施例では、アフリカ系アメリカ人レシピエント対象が HSCT を必要とする。レシピエントの HLA タイピングを従来の方法 (例えば、DNA 配列決定) により行った後、骨髄および臍帯血ドナー登録簿で利用可能なドナー遺伝子型と比較する。完全にマッチするドナーは、全米骨髄バンク (National Marrow Donor Program) 登録簿、全米臍帯血バンク (National Cord Blood Program) 登録簿、またはその他の幹細胞もしくは臍帯血バンク登録簿でも見出すことができない。しかし、部分的にマッチする臍帯血ヨーロッパ系アメリカ人 (白色人種) ドナーが同定されており、その場合、アロー UCT の要件を満たす臍帯血 (CB) マッチングのために、遺伝子座の 6 対立遺伝子の 5 つが要求される (すなわち、HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1) (図 16A~16B)。ドナー候補とレシピエント間のマッチングのレベルを高める目的で、A*02:01:01 対立遺伝子に特異的な Cas9 および 1 つまたは複数の gRNA を、その特定の対立遺伝子の標的化破壊 (片アレル遺伝子編集) のために、ドナー臍帯血 HSPC に送達する。1 つまたは複数の恐らく修飾された (例えば、キャップ/テール付加) gRNA を、破壊しようとする特定の HLA-A 対立遺伝子のために作製された上位階層 gRNA から選択する (表 24)。Cas9 / gRNA で対立遺伝子を破壊した後、T7E1 アッセイおよび DNA 配列解析によって、対立遺伝子

の破壊を確認する。HLA-A^{L^o}、例えば、HLA-A^{+/-}、例えば、HLA-A*02:01:01:01陰性細胞（例えば、HLA-A*02:01:01:01片アレル破壊が成功している細胞）を選別により精製する。ミスマッチレシピエントHLA-A対立遺伝子（例えば、A*01:01:01:01）DNA配列（例えば、cDNA、図17A～17B）を作製し、レンチウイルスベクターにクローン化する。レシピエント細胞におけるこの対立遺伝子を調節する内在性プロモーター配列を配列決定し、さらに、A*01:01:01:01 cDNA配列上流のレンチウイルスベクターにクローン化する。次に、このHLA-Aトランスジーン発現カセット（例えば、マッチHLA対立遺伝子を調節するHLAプロモーター）をレンチウイルスベクター粒子にパッケージする。選別されたドナーHLA-A^{L^o}、例えば、HLA-A^{+/-}、例えば、HLA-A*02:01:01:01陰性細胞をレンチウイルスベクター粒子と接触させて、細胞中にA*01:01:01:01トランスジーン発現カセットを遺伝子移入する。次に、形質導入された細胞を、細胞表面上のHLA-Aの発現増大（形質導入されていないHLA-A^{L^o}細胞と比較して）に基づいて選別する。HLA-A片アレル遺伝子置換の後、HLA修飾臍帯血ドナーHSPCは、6HLA遺伝子座の6つがレシピエント対象とマッチする。マッチするドナー臍帯血HSPCを従来の臍帯血移植片臨床プロトコルに従って、レシピエント対象に移植する。

【0930】

10

20

30

40

50

【表 6 4】

表 24.単一 HLA-A 対立遺伝子 A*02:01:01:01 の Cas9 標的化破壊 (単一遺伝子座での片アレル破壊)のためのガイド RNA

HLA-A*02:01:01:01		
gRNA 配列(-PAM)	gRNA タイプ(Cas9 タイプ, 長さ)	鎖
GAGUGAGAGCCCCGCCAGGU (配列番号 219)	sa20	-
GCACUGUCACUGCUUGCAGC (配列番号 220)	sa20	-
GACGGCUCCCAUCUCAGGGU (配列番号 221)	sa20	-
GUAGCUCCCUCCUUUUCUAU (配列番号 222)	sa20	-
GAAGAGCUCAGAUAGAAAAG (配列番号 223)	sa20	+
GAAGACGGCUCCCAUCUCAGGGUG (配列番号 224)	sa24	-
GAGAGUAGCUCCCUCCUUUUCUAU (配列番号:225)	sa24	-
GUGAGAGCCCCGCCAGGUCUGGGU (配列番号:226)	sa24	-
GGGCUGGGAAGACGGCUCCCAUCU (配列番号 227)	sa24	-
GGAAGACGGCUCCCAUCUCAGGGU (配列番号 228)	sa24	-
GAGAACCGGCCUCGCUC (配列番号 229)	spy17	-
GAGAGCCCCGCCAGGUC (配列番号 230)	spy17	-
GGAGUGAGAGCCCCGCC (配列番号 231)	spy17	-
GCUCAGAUAGAAAAGGA (配列番号 232)	spy17	+
GCUCCCAUCUCAGGGUG (配列番号 233)	spy17	-
GGGCGGGCUCUCACUCCAUG (配列番号 234)	spy20	+
GUGAGAGCCCCGCCAGGUCU (配列番号 235)	spy20	-
GGGAAGACGGCUCCCAUCUC (配列番号 236)	spy20	-
GGCUCCCAUCUCAGGGUGAG (配列番号 237)	spy20	-
GGAAGACGGCUCCCAUCUCA (配列番号 238)	spy20	-

略語: sa: S.アウレウス(*S. aureus*)gRNA、spy: S.ピオゲネス(*S. pyogenes*) gRNA。

【0931】

実施例 7：ドナー細胞中の HLA-A 遺伝子の両アレル破壊のための Cas9 / gRNA の標的化と、レシピエント対象の同一 HLA-A 対立遺伝子による 2 つのドナーミスマッチ HLA-A 対立遺伝子の置換

この実施例では、ヒスパニック系（ラテンアメリカ人）レシピエント対象が HSCT を必要とする。レシピエントの HLA タイピングを従来の方法（例えば、DNA 配列決定）により行った後、骨髄および臍帯血ドナー登録簿で利用可能なドナー遺伝子型と比較する。完全にマッチするドナーは、全米骨髄バンク（National Marrow Donor Program）登録簿、全米臍帯血バンク（National Cord Blo

od Program) 登録簿、またはその他の幹細胞もしくは臍帯血バンク登録簿でも見出すことができない。しかし、部分的にマッチする臍帯血ヨーロッパ系アメリカ人（白色人種）ドナーが同定されており、その場合、アローUCTの要件を満たす臍帯血（CB）マッチングのために、遺伝子座の6対立遺伝子の4つが要求される（すなわち、HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1）（図18A～18B）。ドナー候補とレシピエント間のマッチングのレベルを高める目的で、HLA-A遺伝子座を標的化する（例えば、ドナー細胞中の両方のHLA-A対立遺伝子に共通の配列を標的化する）Cas9および1つまたは複数のgRNAを、その遺伝子の標的化破壊（両アレル遺伝子編集）のために、ドナー臍帯血HSPCに送達する。1つまたは複数のgRNA（恐らく修飾されたgRNA、例えば、キャップ／テール付加）を、遺伝子座で破壊しようとするHLA-A対立遺伝子のために作製された上位階層gRNAから選択する（表25）。Cas9／gRNAによる遺伝子座の両アレル破壊後、T7E1アッセイおよびDNA配列解析によって、対立遺伝子の破壊を確認する。HLA-A^{-/-}、例えば、HLA-A*02:01:01:01およびA*29:02:01:01陰性細胞（例えば、両アレル破壊が成功している細胞）を選別により精製する。初めドナー細胞中に存在しなかったレシピエント対象同一HLA-A対立遺伝子のDNA配列（例えば、cDNA）（例えば、A*01:01:01:01およびA*23:01:01:01を作製し、レンチウイルスベクターにクローン化する。レシピエント対象細胞中のこれらの対立遺伝子を調節する内在性プロモーター配列を配列決定し、さらに、A*01:01:01:01およびA*23:01:01:01 cDNA配列上流の1つまたは複数のレンチウイルスベクターに、対立遺伝子を調節する各々のプロモーター（対象細胞中のプロモーター／対立遺伝子組合せに対応する）を用いて、クローン化する。このHLA-Aトランスジーン発現カセットをレンチウイルスベクター粒子にパッケージする。選別されたドナーHLA-A^{-/-}、例えば、HLA-A*02:01:01:01およびA*29:02:01:01陰性細胞（例えば、両アレル破壊が成功している細胞）をレンチウイルスベクター粒子と接触させて、レシピエント細胞中にA*01:01:01:01およびA*23:01:01:01トランスジーン発現カセットの両方を遺伝子移入する。次に、形質導入された細胞を、細胞表面上のHLA-Aの発現増大（形質導入されていないHLA-A^{-/-}細胞と比較して）に基づいて選別する。HLA-A両アレル遺伝子置換の後、HLA修飾臍帯血ドナーHSPCは、6HLA遺伝子座の6つがレシピエント対象とマッチする。マッチしたドナー臍帯血HSPCを従来の臍帯血移植片臨床プロトコルに従って、レシピエント対象に移植する。

【0932】

10

20

30

40

50

【表 6 5】

表 25.対立遺伝子 A*02:01:01:01 および A*29:02:01 の破壊を目的とする、HLA-A 遺伝子座での Cas9 標的化両アレル破壊のための gRNA

HLA-A*02:01:01:01 および HLA-A*29:02:01:01		
gRNA 配列 (-PAM)	gRNA タイプ(Cas9 タイプ, 長さ)	鎖
GCACUGUCACUGCUUGCAGC (配列番号 239)	sa20	-
GACGGCUCCCAUCUCAGGGU (配列番号 240)	sa20	-
GUAGCUCCCUCCUUUUCUAU (配列番号 241)	sa20	-
GAAGAGCUCAGAUAGAAAAG (配列番号 242)	sa20	+
GAGCCCGCCCAGGUCUGGGU (配列番号 243)	sa20	-
GAAGACGGCUCCCAUCUCAGGGUG (配列番号 244)	sa24	-
GAGAGUAGCUCCCUCCUUUUCUAU (配列番号 245)	sa24	-
GGGCUGGGAAGACGGCUCCCAUCU (配列番号 246)	sa24	-
GGAAGACGGCUCCCAUCUCAGGGU (配列番号 247)	sa24	-
GGGCACUGUCACUGCUUGCAGCCU (配列番号 248)	sa24	-
AAGACGGCUCCCAUCUC (配列番号 249)	spy17	-
GAGAACCGGCCUCGCUC (配列番号 250)	spy17	-
AGCUCAGAUAGAAAAGG (配列番号 251)	spy17	+
GCUCAGAUAGAAAAGGA (配列番号 252)	spy17	+
GCUCCCAUCUCAGGGUG (配列番号 253)	spy17	-
CGGCUCCCAUCUCAGGGUGA (配列番号 254)	spy20	-
GGGAAGACGGCUCCCAUCUC (配列番号 255)	spy20	-
GGCUCCCAUCUCAGGGUGAG (配列番号 256)	spy20	-
GGAAGACGGCUCCCAUCUCA (配列番号 257)	spy20	-
GCAAGCAGUGACAGUGCCCA (配列番号 258)	spy20	+

略語: sa: *S.アウレウス(S. aureus)*gRNA、spy: *S.ピオゲネス(S. pyogenes)* gRNA.

【0933】

実施例 8：ミスマッチ HLA ハプロタイプの破壊による多重ゲノム編集のための Cas9 および gRNA の標的化と、HLA-A、HLA-B、および HLA-DRB1 のそれぞれ 1 コピーの遺伝子置換

この実施例では、ヒスパニック系（ラテンアメリカ人）レシピエント対象が HSCT を必要とする。レシピエントの HLA タイピングを従来の方法（例えば、DNA 配列決定）により行った後、骨髄および臍帯血ドナー登録簿で利用可能なドナー遺伝子型と比較する。完全にマッチするドナーは、全米骨髄バンク（National Marrow Donor Program）登録簿、全米臍帯血バンク（National Cord Blo

od Program) 登録簿、またはその他の幹細胞もしくは臍帯血バンク登録簿でも見出すことができない。しかし、ハプロタイプ同一の臍帯血ヨーロッパ系アメリカ人(白人種)ドナーが同定されており、その場合、アローUCTの要件を満たす臍帯血(CB)マッチングのために、遺伝子座(例えば、ハプロタイプ同一の)の6対立遺伝子の3つが要求される(すなわち、HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1)(図18A~18B)。ドナー候補とレシピエント間のマッチングのレベルを高める目的で、ドナーHSPCにおいてマッチしないハプロタイプ中の対立遺伝子(例えば、A*02:01:01:01、B*08:01:01:01、およびDRB1*03:01:01:01)を標的化する、Cas9および複数のgRNA(例えば、恐らく修飾されたgRNA、例えば、キャップ/テール付加gRNA)を、複数の遺伝子座の標的化片アレル破壊(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1の多重遺伝子編集)のために、ドナー臍帯血HSPCに送達する。1つまたは複数の恐らく修飾されたgRNA(例えば、キャップ/テール付加)を、上記の特定の遺伝子座で破壊しようとするHLA-A、HLA-B、およびHLA-DRB1ドナー特異的対立遺伝子(レシピエントとマッチしない)のために作製された上位階層gRNAから選択する(表26)。Cas9/gRNAによる遺伝子座の標的化片アレル破壊後、T7E1アッセイおよびDNA配列解析によって、対立遺伝子の破壊を確認する。HLA-A^{+/−}、例えば、HLA-A*02:01:01:01陰性;HLA-B^{+/−}、例えば、B*08:01:01:01陰性;およびHLA-DRB1^{+/−}、例えば、DRB1*03:01:01:01陰性細胞(例えば、3つの遺伝子座で片アレル破壊が成功している細胞)を選別により精製する。初めハプロタイプ同ードナー細胞中に存在しなかったミスマッチレシピエント対象HLA-A対立遺伝子(例えば、A*03:01:01:01、B*07:02:01:01、DRB1*15:01:01:01)を配列決定してから、DNA配列(例えば、cDNA)は、レシピエント細胞中のこれらの対立遺伝子に隣接するDNAを配列決定することによって決定されたそれらの内在性プロモーター上流の1つまたは複数のレンチウイルスベクターにクローン化する。HLA-A、-B、および-DRB1トランスジーン発現カセットをレンチウイルスベクター粒子にパッケージする。選別されたドナーHLA-A^{+/−}、HLA-B^{+/−}、HLA-DRB1^{+/−}細胞、例えば、(例えば、HLA-A、-B、-DRB1の多重片アレル破壊が成功している細胞)をレンチウイルスベクター粒子と接触させて、レシピエント細胞中にHLA-A、-B、および-DRB1トランスジーン発現カセットを遺伝子移入する。次に、形質導入された細胞を、細胞表面上のHLA-A、-B、および-DRB1の発現増大(形質導入されていないHLA-A^{+/−}、HLA-B^{+/−}、HLA-DRB1^{+/−}細胞と比較して)に基づいて選別する。HLA-A、-B、および-DRB1遺伝子置換の後、HLA修飾臍帯血ドナーHSPCは、6HLA遺伝子座の6つがレシピエント対象とマッチする。マッチするドナー臍帯血HSPCを従来の臍帯血移植片臨床プロトコルに従って、レシピエント対象に移植する。

【0934】

10

20

30

40

50

【表 6 6】

表 26. 対立遺伝子 A*02:01:01:01, B*08:01:01, および DRB1*03:01:01:01 の破壊を目的とする、
(a) HLA-A, (b) HLA-B, および(c) HLA-DRB1 遺伝子座での Cas9 標的化ハプロタイプ破壊のための
gRNA

(a) HLA-A*02:01:01:01		
gRNA 配列 (-PAM)	gRNA タイプ(Cas9 タイプ, 長さ)	鎖
GAGUGAGAGCCCCGCCAGGU (配列番号 259)	sa20	-
GCACUGUCACUGCUUGCAGC (配列番号 260)	sa20	-
GACGGCUCCCAUCUCAGGGU (配列番号 261)	sa20	-
GUAGCUCCCUCCUUUUCUAU (配列番号 262)	sa20	-
GAAGAGCUCAGAUAGAAAAG (配列番号 263)	sa20	+
GAAGACGGCUCCCAUCUCAGGGUG (配列番号 264)	sa24	-
GAGAGUAGCUCCCUCCUUUUCUAU (配列番号: 265)	sa24	-
GUGAGAGCCCCGCCAGGUCUGGGU (配列番号 266)	sa24	-
GGGCUGGGAAGACGGCUCCCAUCU (配列番号 267)	sa24	-
GGAAGACGGCUCCCAUCUCAGGGU (配列番号 268)	sa24	-
GAGAACCGGCCUCGCUC (配列番号 269)	spy17	-
GAGAGCCCGCCCAGGUC (配列番号 270)	spy17	-
GGAGUGAGAGCCCGCCC (配列番号 271)	spy17	-
GCUCAGAUAGAAAAGGA (配列番号 272)	spy17	+
GCUCCCAUCUCAGGGUG (配列番号 273)	spy17	-
GGCGGGCUCUCACUCCAUG (配列番号 274)	spy20	+
GUGAGAGCCCGCCCAGGUCU (配列番号: 275)	spy20	-
GGGAAGACGGCUCCCAUCUC (配列番号 276)	spy20	-
GGCUCCCAUCUCAGGGUGAG (配列番号 277)	spy20	-
GGAAGACGGCUCCCAUCUCA (配列番号 278)	spy20	-

【 0 9 3 5】

10

20

30

40

50

【表 6 7】

(b) HLA-B*08:01:01		
gRNA 配列 (-PAM)	gRNA タイプ(Cas9 タイプ, 長さ)	鎖
GCACUGUCGCUGCACGCAGC (配列番号 279)	sa20	-
GACGGCUCCCAUCUCAGGGU (配列番号 280)	sa20	-
GAGCCGGCCCCAGGUCUCGGU (配列番号 281)	sa20	-
GUAGCUCCCUCCUUUCCAC (配列番号 282)	sa20	-
GAAGAGCUCAGGUGGAAAAG (配列番号 283)	sa20	+
GAAGACGGCUCCCAUCUCAGGGUG (配列番号 284)	sa24	-
GCGGCUACUACAACCAGAGCGAGG (配列番号 285)	sa24	+
GUGGGAGCCGGCCCAGGUCUCGGU (配列番号 286)	sa24	-
GGAAGACGGCUCCCAUCUCAGGGU (配列番号 287)	sa24	-
GGACUGGGAAGACGGCUCCCAUCU (配列番号 288)	sa24	-
GAGACCCGGCCUCGCUC (配列番号 289)	spy17	-
GUGCAGCGACAGUGCCC (配列番号 290)	spy17	+
GGAGCCGGCCCAGGUCU (配列番号 291)	spy17	-
GCUCCCAUCUCAGGGUG (配列番号 292)	spy17	-
GCUCAGGUGGAAAAGGA (配列番号 293)	spy17	+
GGGAAGACGGCUCCCAUCUC (配列番号 294)	spy20	-
GCGUGCAGCGACAGUGCCCA (配列番号 295)	spy20	+
GGCUCCCAUCUCAGGGUGAG (配列番号 296)	spy20	-
GGAAGACGGCUCCCAUCUCA (配列番号 297)	spy20	-
GGGCCGGCUCCCAUCCAUG (配列番号 298)	spy20	+

【 0 9 3 6 】

10

20

30

40

50

【表 6 8】

(c) HLA-DRB1*03:01:01:01		
gRNA 配列 (-PAM)	gRNA タイプ (Cas9 タイプ, 長さ)	鎖
GAUGGACUCGCCGUGCACU (配列番号 299)	sa20	-
GGGACACCAGACCACGUUUC (配列番号 300)	sa20	+
GGACACCAGACCACGUUUCU (配列番号 301)	sa20	+
GACUUCAGCCAAGAGGAUUC (配列番号 302)	sa20	+
GAAUCCUCUUGGCUGAAGUC (配列番号 303)	sa20	-
GCUGGGGACACCAGACCACGUUUC (配列番号 304)	sa24	+
GACAAGCCCUCUCACAGUGGAAUG (配列番号 305)	sa24	+
GAAAGGACACUCUGGACUUCAGCC (配列番号 306)	sa24	+
UUAGGAUGGACUCGCCGUGCACU (配列番号 307)	sa24	-
UCAGGAAUCCUCUUGGCUGAAGUC (配列番号 308)	sa24	-
GCGGCGAGUCCAUCCUA (配列番号 309)	spy17	+
GAGUACUCCAAGAAACG (配列番号 310)	spy17	-
CACCAGACCACGUUUCU (配列番号 311)	spy17	+
CUCCAAGAAACGUGGUC (配列番号 312)	spy17	-
AAUCAGAAAGGACACUC (配列番号 313)	spy17	+
GUAGAGUACUCCAAGAAACG (配列番号 314)	spy20	-
GCAGCGGCGAGUCCAUCCUA (配列番号 315)	spy20	+
GUACUCCAAGAAACGUGGUC (配列番号 316)	spy20	-
GGACACCAGACCACGUUUCU (配列番号 317)	spy20	+
GCUCUCCAUCCACUGUGAG (配列番号 318)	spy20	-

【0937】

以下の実施例 9 ～ 11 では、ゲノム DNA の増幅、続いて DNA 配列に基づくタイピングおよび／または配列特異的プライマー／プローブにより、数人のドナーからのヒト臍帯血単核細胞（MNC）を HLA タイピングした（Kashi Clinical Laboratories, Portland, OR）。3 人の HSC ドナー由来の一次ヒト細胞、臍帯血 MNC を前述のように HLA タイピングした後、HLA-A、HLA-B および HLA-DRB1 対立遺伝子について 4 桁タイピング報告を作成した（表 27）。最も高い対立遺伝子マッチング数に基づいて、サンプルを、部分的にマッチするドナーとレシピエントとしてペア形成した。各々の推定ドナーとレシピエントのペアについて、ミスマッ

チ対立遺伝子を同定して、こうした遺伝子座の編集によって、ドナー候補とレシピエント間の対立遺伝子ミスマッチ数を減らすようにした。データベースを用いて、対立遺伝子特異的様式で標的化遺伝子座の編集に使用するために適切な gRNA を検索した。HLA タイピングの 8 つの数字のうち 4 つ（4 分野のうちの 2 つ）は、表示される対立遺伝子のいずれのサブタイプであってもよい（例えば、HLA-A*02:01 は、HLA-A*02:01:01:01 であり得る）。標的対立遺伝子の全サブタイプのオンターゲット部位にマッチする gRNA について、データベースを検索した。同定された gRNA が、ドナー細胞中の他の HLA 対立遺伝子のどのサブタイプ（例えば、HLA-A、HLA-DRB1）も標的化しないように、検索を調整した。データベースはまた、同定された gRNA 各々に対するオンターゲット特異性を有する標的対立遺伝子のサブタイプの計数／パーセンテージも提供した。このプロセスでは、ユーザーが、同時に複数の対立遺伝子を表示する場合、データベースは、まず、全ての標的遺伝子座においてオンターゲット部位を有する gRNA を検索し、他の対立遺伝子にオンターゲット部位を有する gRNA は回避された。同定された適切な gRNA を取得した後、データベースはさらに、参照として使用される全てのドナー対立遺伝子のサブタイプの配列を提供する。前のステップで同定された gRNA のオン／オフターゲット部位が、これらのドナー対立遺伝子サブタイプ配列に対して検索される。gRNA 選択の最終ステップは、最初のステップからのデータ（標的対立遺伝子のサブタイプのより高い計数／パーセンテージ、除外対立遺伝子のより低いオフターゲット計数／パーセンテージ、全ゲノムの低いオフターゲット計数／パーセンテージ、など）に基づく gRNA 選択を含む。

【0938】

【表 69】

表 27. HSC 移植のためにマッチングを向上させる遺伝子編集対象の推定ドナーおよびレシピエントペアの評価のための 4 つの幹細胞ドナーの HLA タイピング結果

# 患者 ID	Lab ID 数/サンプルタイプ (Lab ID)	HLA クラス I				HLA クラス II	
		A*		B*		DRB1*	
1	160202008HLA / 細胞	01:01	26:01	07:02	57:01	15:01	16:01
2	160202009HLA / 細胞	01:01	01:01	07:02	57:01	01:01	13:05
3	160202010HLA / 細胞	01:01	02:01	07:02	51:01	04:02	15:01

【0939】

実施例 9：一次ヒト T-リンパ球におけるミスマッチ HLA-A 対立遺伝子（HLA-A*26:01）の破壊によるゲノム編集のための Cas9 および gRNA の標的化

レシピエントに対して 6 対立遺伝子での HLA マッチングが不適レベル（3 遺伝子座、3 / 6 ミスマッチ HLA 対立遺伝子）であるドナー候補とのマッチングのレベルを高めるために、本明細書に記載のデータベースを用い、Cas9 および特異的に同定された gRNA を使用して、標的化対立遺伝子特異的遺伝子編集を実施した。その結果、ミスマッチドナー（表 27、患者 1）からの細胞同士の HLA マッチングのレベルが、遺伝子破壊（表 28）によって、レシピエント患者候補（表 27、患者 2）への移入に好適となった（HLA ミスマッチを 2 / 6 ミスマッチ HLA 対立遺伝子に低減することにより）。

【0940】

【表 7 0】

表 28. 患者 1 ドナー HSC 遺伝子型と 患者 2 レシピエント遺伝子型のマッチングを高めるための遺伝子編集
 ストラテジー前および後の同種異系ドナー候補およびレシピエントペアからの一次ヒト HSC の HLA 遺伝子型

遺伝子編集前						
患者 1 (ドナー)			患者 2 (レシピエント)			編集前の ミスマッチ HLA
遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	
HLA-A	01:01	26:01	HLA-A	01:01	01:01	
HLA-B	07:02	57:01	HLA-B	07:02	57:01	
HLA-DRB1	15:01	16:01	HLA-DRB1	01:01	13:05	
遺伝子編集後						
患者 1 (ドナー)			患者 2 (レシピエント)			編集後の ミスマッチ HLA
遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	
HLA-A	01:01		HLA-A	01:01	01:01	
HLA-B	07:02	57:01	HLA-B	07:02	57:01	
HLA-DRB1	15:01	16:01	HLA-DRB1	01:01	13:05	

【0941】

患者 1 (ドナー) は、患者 2 (レシピエント) と、6 タイプの HLA 対立遺伝子 (HLA-A、および HLA-DRB1; 表 28) のうちの 3 つでミスマッチであった。HLA-A 26:01 の標的化破壊は、ドナー候補 (患者 1) とレシピエント (患者 2) 同士の HLA ミスマッチを低減し得る。従って、ドナー中に存在する他の HLA 対立遺伝子で予測される低いオフターゲット特異性と共に、対立遺伝子 HLA-A 26:01 に対して予測される高いオンターゲット特異性を有する gRNA をデータベースから同定し、選択した (表 29)。gRNA を PCR テンプレートからインピットで転写した後、5' および 3' 末端修飾 (例えば、5' ARCA キャップおよび 3' ポリ A [20A] テールなどの修飾) を有するように改変したが、これらの修飾は、上記タイプの一次血球において高い遺伝子編集度を維持しながら、修飾 gRNA (RNP) と複合体化した Cas9 タンパク質による処理後に T リンパ球および HSC 生存能力を向上させることがこれまでに証明されている。

【0942】

ドナー細胞における対立遺伝子特異的遺伝子編集を評価するために、一次 T リンパ球 (CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞) を臍帯血 (CB) 単位から単離した後、表 29 に挙げる gRNA をこれらの細胞中でスクリーニングした。手短には、修飾 HLA-A 26:01 対立遺伝子特異的 gRNA を *S. pyogenes* (S. pyogenes) Cas9 タンパク質と事前に複合体化して、ドナー T リンパ球に電気穿孔された RNP を取得した (Amara Nucleofector)。RNP 送達から 3~4 日後の細胞からゲノム DNA を単離し、HLA-A 遺伝子座を抽出 gDNA から PCR 増幅した。T7E1 エンドヌクレアーゼアッセイ分析を用いて、遺伝子編集を評価することによって、A*26:01 の対立遺伝子特異的編集のために最も有効な gRNA を同定する (図 19A~19B)。患者 1 からの一次ヒト造血細胞において、試験した他の gRNA と比較して、HLA-A 26:01_2 gRNA が最も高いレベルのオンターゲット活性を有した。要約すると、この実施例は、一次ヒト血球中の HLA 遺伝子の対立遺伝子標的化遺伝子破壊を示す。

【0943】

【表 7 1】

表 29. HLA-A 26:01 に標的化される *S.ピオゲネス*(*S. pyogenes*)gRNA

HLA-A 26:01 に標的化される <i>S.ピオゲネス</i> (<i>S. pyogenes</i>)gRNA				ドナー の MHC 遺伝子座に存在する他の HLA 対立遺伝子中のオフターゲット					
gRNA ID	サイズ	ガイド (DNA 配列)	A*26:01 中の %	A*01:01	A*26:01	B*07:02	B*57:01	DRB1*15:01	DRB1*16:01
HLA-A2601_1	20	ACGGTTCTCAC ACCATCCAG (配列番号 319)	100	(3, 1) (2, 69)	(0, 38)	(3, 1) (2, 46)	(3, 22)	0	0
HLA-A2601_2	20	CACACCATCCA GAGGATGTA (配列番号 320)	100	0	(0, 38)	0	0	0	0
HLA-A2601_3	20	CCGGAACACAC GGAATGTGA (配列番号 321)	97.4	(3, 70)	(0, 38)	0	(4, 22)	0	0
HLA-A2601_4	20	TGCGGAGCCAC TCCACGCAC (配列番号 322)	97.4	(3, 3) (2, 66) (5, 1)	(0, 37)	0	(1, 1) (0, 21)	0	0
HLA-A2601_5	17	ACCATCCAGAG GATGTA (配列番号 323)	100	(3, 1) (2, 69)	(0, 38)	(3, 1) (2, 46)	(3, 22)	0	0
HLA-A2601_6	17	GTTCTCACACC ATCCAG (配列番号 324)	100	0	(0, 38)	0	0	0	0
HLA-A2601_7	17	GAACACACGG AATGTGA (配列番号 325)	97.4	(3, 70)	(0, 38)	0	(4, 22)	0	0
HLA-A2601_8	17	GGAGCCACTCC ACGCAC (配列番号 326)	97.4	(3, 3) (2, 66) (5, 1)	(0, 37)	0	(1, 1) (0, 21)	0	0

【0944】

実施例 10：一次ヒト T-リンパ球におけるミスマッチ HLA-B 対立遺伝子 (HLA-B 51:01) の破壊による多重ゲノム編集のための Cas9 および gRNA の標的化
レシピエントに対して 6 対立遺伝子でのマッチングが不適レベル (3 遺伝子座、4 / 6 ミスマッチ HLA 対立遺伝子) であるドナー候補とのマッチングのレベルを高めるために、本明細書に記載のデータベースを用い、Cas9 および特異的に同定された gRNA を使用して、ミスマッチ対立遺伝子 HLA-B 51:01 および HLA-DRB1 04:02 の多重遺伝子破壊 (表 30) を実施した。その結果、ミスマッチドナー (表 30、患者 3) からの細胞同士の HLA マッチングのレベルが、レシピエント患者候補 (表 30、患者 2) への移入に好適となった (HLA ミスマッチを 2 / 6 ミスマッチ HLA 対立遺伝子に低減)。

【0945】

10

20

30

40

50

【表 7 2】

表 30.ドナー HSC (患者 3)とレシピエント (患者 2)のマッチングを高めるための、同種異系ドナー候補およびレシピエントペアからの一次ヒト HSC の多重 HLA(MHC クラス I およびクラス II)遺伝子編集

遺伝子編集前						
ドナー (患者 3)			レシピエント (患者 2)			編集前のミスマッチ HLA
遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	
HLA-A	01:01	02:01	HLA-A	01:01	26:01	3/6
HLA-B	07:02	51:01	HLA-B	07:02	57:01	
HLA-DRB1	04:02	15:01	HLA-DRB1	15:01	16:01	
遺伝子編集後						
ドナー (患者 3)			レシピエント (患者 2)			編集後のミスマッチ HLA
遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	
HLA-A	01:01	02:01	HLA-A	01:01	26:01	1/6
HLA-B	07:02		HLA-B	07:02	57:01	
HLA-DRB1		15:01	HLA-DRB1	15:01	16:01	

【0 9 4 6】

患者 3 (ドナー) は、患者 2 (レシピエント) と、6 タイプの H L A 対立遺伝子 (H L A - A、および H L A - D R B 1 ; 表 3 0) のうちの 3 つでミスマッチであった。H L A - B 5 1 : 0 1 および H L A - D R B 1 0 4 : 0 2 の標的化破壊は、ドナー候補 (患者 3) とレシピエント (患者 2) 間の H L A ミスマッチを低減し得る。従って、ドナー中に存在する他の H L A 対立遺伝子で予測される低いオフターゲット特異性 (表 3 0) と共に、対立遺伝子 H L A - B 5 1 : 0 1 および H L A - D R B 1 0 4 : 0 2 に対して予測される高いオンターゲット特異性を有する g R N A をデータベースから同定し、選択した (表 3 1 および 3 2) 。 g R N A を P C R テンプレートからインビトロで転写した後、5' および 3' 末端修飾 (例えば、5' A R C A キャップおよび 3' ポリ A [2 0 A] テールなどの修飾) を有するように改変したが、これらの修飾は、高度の遺伝子編集を維持しながら、修飾 g R N A (R N P) と複合体化した C a s 9 タンパク質による処理後に H S C 生存能力を向上させることがこれまでに証明されている。

【0 9 4 7】

10

20

30

40

50

【表 7 3】

表 31: HLA-B 51:01 に標的化される *S.ピオゲネス*(*S. pyogenes*)gRNA

HLA-B 51:01 に標的化される <i>S.ピオゲネス</i> (<i>S. pyogenes</i>)gRNA				ドナー の MHC 遺伝子座に存在する他の HLA 対立遺伝子中のオフターゲット					
gRNA ID	サイズ	ガイド (DNA 配列)	B*5101 中の%	A*01:01	A*02:01	B*07:02	B*51:01	DRB1* 04:02	DRB1* 15:01
HLA-B-5101_1	20	CCTCGCTCTGG TTGTAGTAG (配列番号 327)	100	0	0	0	(0, 54)	0	0
HLA-B-5101_2	20	CGTCTGCCAAG TGTGAGACC (配列番号 328)	98.2	0	(5, 2) (6, 116)	(6, 45)	(1, 1) (0, 53)	0	0
HLA-B-5101_3	20	CTCTCGGTAAG TCTGTGTGT (配列番号 329)	98.2	(3, 67) (4, 3)	(3, 116) (4, 3)	(3, 47)	(0, 54)	0	0
HLA-B-5101_4	20	GCGAGGCCGG GTCTCACACT (配列番号 330)	98.2	0	0	0	(1, 1) (0, 53)	0	0
HLA-B-5101_5	17	CGCTCTGGTTG TAGTAG (配列番号 331)	100	0	(5, 1)	0	(0, 54) (5, 1)	0	0
HLA-B-5101_6	17	AGGCCGGGTCT CACACT (配列番号 332)	98.2	0	0	0	(1, 1) (0, 53)	0	0
HLA-B-5101_7	17	CTTACCGAGAG AACCTG (配列番号 333)	98.2	(3, 2) (2, 68)	(3, 115) (5, 1) (4, 4)	(2, 47)	(0, 54)	0	0
HLA-B-5101_8	17	CGATCCGCAGG TTCTCT (配列番号 334)	98.2	(5, 2) (4, 68)	(5, 116)	(3, 47)	(1, 1) (0, 53)	0	0

【 0 9 4 8 】

10

20

30

40

50

【表 7 4】

表 32: HLA-DRB1 04:02 に標的化される *S.ピオゲネス*(*S. pyogenes*)gRNA

HLA-DRB1 04:02 に標的化される <i>S.ピオゲネス</i> (<i>S. pyogenes</i>)gRNA				ドナー の MHC 遺伝子座に存在する他の HLA 対立遺伝子中のオフターゲット					
gRNA ID	サイズ	ガイド (DNA 配列)	DRB1 *04:02 中の%	A*01: 01	A*02: 01	B*07: 02	B*51: 01	DRB1 *04:02	DRB1*15:01
HLA_DRB1-0402_1	20	AGGACATCCTGG AAGACGAG (配列 番号 335)	100	0	0	0	0	(0, 3)	(4, 27) (5, 2)
HLA_DRB1-0402_2	20	GGAAGACGAGC GGGCCGCGG (配列番号 336)	100	0	0	0	0	(0, 3)	(4, 27) (5, 2)
HLA_DRB1-0402_3	20	CCTGGAAGACGA GCGGGCCG (配列 番号 337)	100	0	0	0	0	(0, 3)	(4, 27) (5, 2)
HLA_DRB1-0402_4	20	CCGCGGCCCGCT CGTCTTCC (配列 番号 338)	100	(6, 1)	0	0	0	(0, 3)	(4, 27) (5, 2)
HLA_DRB1-0402_5	17	GGAAGACGAGC GGGCCG (配列番号 339)	100	0	0	0	0	(0, 3)	(4, 27) (5, 2)
HLA_DRB1-0402_6	17	ACATCCTGGAAG ACGAG (配列番号 340)	100	0	0	0	0	(0, 3)	(4, 28) (5, 6)
HLA_DRB1-0402_7	17	CATCCTGGAAGA CGAGC (配列番号 341)	100	0	0	0	0	(0, 3)	(4, 28) (5, 1)
HLA_DRB1-0402_8	17	CGGCCCCGCTCGT CTTCC (配列番号 342)	100	0	0	0	0	(0, 3)	(4, 27) (5, 2)

【0949】

ドナー細胞における対立遺伝子特異的遺伝子編集を評価するために、一次Tリンパ球（CD4⁺T細胞）をCB単位から単離した後、表31および表32に列記するgRNAをこれらの細胞中でスクリーニングした。手短には、修飾HLA-B 51:01およびHLA-DRB1 04:02対立遺伝子特異的gRNA（表31および32）を*S.ピオゲネス*（*S. pyogenes*）Cas9タンパク質と事前に複合体化して、ドナーTリンパ球に電気穿孔されたRNPを取得した（Amaxa Nucleofector）。RNP送達から3～4日後の細胞からゲノムDNAを単離し、HLA-A遺伝子座を抽出gDNAからPCR増幅した。T7E1エンドヌクレアーゼアッセイ分析を用いて、遺伝

子編集を評価することによって、B*51:01の対立遺伝子特異的編集で最も有効なgRNAを同定した(図20A)。Cas9RNPでされたT細胞が、編集後に高い生存能力(>80%)を示し、これらを培養して拡大した。遺伝子破壊の結果、細胞表面で低減したHLA-Bタンパク質発現(抗ヒトHLA-B-FITC)を定量するために、編集細胞は、フローサイトメトリー分析によっても評価した(図20Bおよび20C)。T7E1エンドヌクレアーゼを用いて決定される高レベルの遺伝子破壊を支持したgRNAも、HLA-Bの細胞表面発現の高いパーセンテージ減少または低下を示した。例えば、HLA-B 5101__1 gRNAは、43%遺伝子破壊と、HLA-B発現の67%のノックダウンを支持した。HLA-B対立遺伝子特異的抗体およびMHCクラスI(AlexaFluor 647共役抗ヒトHLA-A、-B、-C、Biolegend Catalog # 311416)で共染色した細胞は、2つの画分:HLA-B^{low}/-およびMHCクラスI⁺である細胞と、HLA-B⁺/MHCクラスI⁺である細胞にさらに分けることができた。MHCクラスI細胞表面の相対発現における2つの集団のこの相違は、1つのHLA遺伝子の対立遺伝子特異的発現が欠如しているが、他の全てのクラスI細胞表面抗原は維持する細胞の精製集団を取得するためのFACSまたは免疫磁気選別による単離を支持する。同じ細胞において、修飾(キャップおよびテール付加)HLA-DRB1 04:02標的化gRNAをS.ピオゲネス(S. pyogenes)Cas9タンパク質(RNP)と複合体化し、細胞に電気穿孔して、MHCクラスII遺伝子の対立遺伝子特異的遺伝子破壊を評価した。これらの細胞から抽出したgDNAのT7E1分析から、一次ヒトTリンパ球においてDRB1 04:02の実質的な対立遺伝子特異的破壊が明らかにされた(図21)。要約すると、この実施例は、一次ヒト血球中の複数のHLA遺伝子の対立遺伝子特異的ノックダウンを示す。

【0950】

実施例11:一次ヒトTリンパ球およびHSCにおけるミスマッチHLA-A対立遺伝子(HLA-A 02:01)およびHLA-DRB1(04:02)の破壊による多重ゲノム編集のためのCas9およびgRNAの標的化

レシピエントに対して6対立遺伝子でのHLAマッチングが不適レベル(3遺伝子座、4/6ミスマッチHLA対立遺伝子)のドナー候補とのマッチングのレベルを高めるために、本明細書に記載のデータベースを用い、Cas9および特異的に同定されたgRNAを使用して、HLA-A 02:01およびHLA-DRB1 04:02のミスマッチ対立遺伝子の多重遺伝子破壊(表33)を実施した。その結果、ミスマッチドナー(表33、患者3)からの細胞同士のHLAマッチングのレベルが、レシピエント患者候補(表33、患者1)への移入に好適となった(HLAミスマッチを2/6ミスマッチHLA対立遺伝子に低減することにより)。

【0951】

10

20

30

40

50

【表 7 5】

表 33.ドナー HSC とレシピエントのマッチングを高めるための、同種異系ドナー候補およびレシピエントペアからの一次ヒト HSC の HLA タイピング

遺伝子編集前						
ドナー (患者 3)			レシピエント (患者 1)			編集前のミスマッチ HLA
遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	
HLA-A	01:01	02:01	HLA-A	01:01	01:01	4/6
HLA-B	07:02	51:01	HLA-B	07:02	57:01	
HLA-DRB1	04:02	15:01	HLA-DRB1	01:01	13:05	
遺伝子編集後						
ドナー (患者 3)			レシピエント (患者 1)			編集後のミスマッチ HLA
遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	遺伝子	対立 遺伝子 1	対立 遺伝子 2	
HLA-A	01:01		HLA-A	01:01	26:01	2/6
HLA-B	07:02	51:01	HLA-B	07:02	57:01	
HLA-DRB1		15:01	HLA-DRB1	01:01	16:01	

【0 9 5 2】

患者 3 (ドナー) は、患者 1 (レシピエント) と、6 タイプの HLA 対立遺伝子 (HLA-A、および HLA-DRB1) のうちの 4 つでミスマッチであった。HLA-A 02:01 および HLA-DRB1 04:02 の標的化破壊は、HSC ドナー (患者 3) とレシピエント (患者 1) 間の HLA ミスマッチを低減し得る。従って、ドナー中に存在する他の HLA 対立遺伝子で予測される低いオフターゲット特異性と共に、対立遺伝子 HLA-A 02:01 および HLA-DRB1 04:02 に対して予測される高いオンターゲット特異性を有する gRNA をデータベースから同定し、選択した (表 3 4 および 3 2)。gRNA を PCR テンプレートからインビトロで転写した後、5' および 3' 末端修飾 (例えば、5' ARCA キャップ および 3' ポリ A [20A] テールなど) を有するように改変したが、これらの修飾は、高度の遺伝子編集を維持しながら、修飾 gRNA (RNP) と複合体化した Cas9 タンパク質による処理後に HSC 生存能力を向上させることがこれまでに証明されている。

【0 9 5 3】

10

20

30

40

50

【表 7 6】

表 34: HLA-A 02:01 に標的化される *S.ピオゲネス*(*S. pyogenes*)gRNA

gRNA ID	サイズ	ガイド (DNA 配列)	% in A*02:01	A*01:01	A*02:01	B*07:02	B*51:01	DRB1*04:02	DRB1*15:01
HLA-A 0201_1	20	ACTCCAC GCACGTG CCCTCC (配列番号 343)	99.2	(3, 1) (4, 67) (5, 2)	(0, 117) (1, 2)	(2, 45) (3, 2)	(2, 50) (3, 4)	0	0
HLA-A 0201_2	20	CTACCTG GAGGGCA CGTGCG (配列番号 344)	99.1	(1, 1) (2, 67) (3, 2)	(0, 118) (1, 1)	(2, 46) (3, 1)	(2, 50) (3, 4)	0	0
HLA-A 0201_3	20	GTGGACC TGGGGAC CCTGCG (配列番号 345)	98.3	(2, 68) (3, 2)	(0, 117) (1, 2)	(5, 47)	0	0	0
HLA-A 0201_4	20	CCACTCA CAGACTC ACCGAG (配列番号 346)	97.5	0	(0, 116) (1, 2)	0	(6, 51)	0	(6, 5)
HLA-A 0201_5	17	GCACGTG CCCTCCA GGT (配列番号 347)	98.3	0	(0, 118) (1, 1)	(2, 46) (3, 1) (5, 1)	(2, 50) (3, 4)	0	0
HLA-A 0201_6	17	AGGGCAC GTGCGTG GAG (配列番号 348)	98.3	(2, 1) (3, 66) (4, 2)	(0, 118) (1, 1)	(2, 45) (3, 2)	(2, 52) (3, 2)	0	0
HLA-A 0201_7	17	CCTGGAG GGCACGT GCG (配列番号 349)	98.3	(1, 1) (2, 67) (3, 2)	(0, 118) (1, 1)	(2, 46) (3, 1)	(2, 50) (3, 4)	0	0
HLA-A 0201_8	17	CTCACAG ACTCACC GAG (配列番号 350)	97.5	0	(0, 116) (1, 2)	0	0	0	0

【0954】

ドナー細胞における対立遺伝子特異的遺伝子編集を評価するために、一次Tリンパ球（CD4⁺T細胞）をCB単位から単離した後、表34に挙げるgRNAをこれらの細胞中でスクリーニングした。手短には、修飾HLA-A 02:01およびHLA-DRB1 04:02対立遺伝子特異的gRNAを*S.ピオゲネス*（*S. pyogenes*）Cas9タンパク質と事前に複合体化して、ドナーTリンパ球に電気穿孔されたRNPを取得した（Amaxa Nucleofector）。RNP送達から3～4日後の細胞からゲノムDNAを単離し、HLA-A遺伝子座を抽出gDNAからPCR増幅した。T7E1エンドヌクレアーゼアッセイ分析（図22A）、ならびにHLA-A2対立遺伝子特異的抗体（FITC共役および抗ヒトHLA-A2、Biolegend Catalog # 343303）を用いたフローサイトメトリー分析（図22B）により、遺伝子編集を評価することによって、A*02:0の対立遺伝子特異的編集で最も有効なgRNAを同定

した。フローサイトメトリー分析から、生存ヒトT細胞の表面上のHLA-A2タンパク質発現の最大92%低減が明らかにされた(図22B)。これは、HLA-A遺伝子座を標的化するA*02:01対立遺伝子標的化gRNAが、HLA-A2対立遺伝子に対して特異的であることを示している。HLA-A2対立遺伝子特異的抗体およびMHCクラスI(AlexaFluor 647共役抗ヒトHLA-A、-B、-C、Biolegend Catalog # 311416)で共染色した細胞は、2つの画分:HLA-A2(対立遺伝子特異的遺伝子発現のノックダウン)およびMHCクラスI⁺である細胞と、HLA-A2⁺MHCクラスI⁺である細胞にさらに分けることができた。MHCクラスI細胞表面抗原の相対発現における2つの集団のこの相違は、1つのHLA遺伝子の対立遺伝子特異的発現が欠如しているが、他の全てのクラスI細胞表面抗原は維持する細胞の精製集団を取得するためのFACSまたは免疫磁気選別による単離を支持する(図23)。HLA-DRB1 04:02対立遺伝子を標的化するTリンパ球においてもオンターゲット対立遺伝子特異的編集を実施したところ、表21Cに示す同じ結果が得られた。HLA-A2対立遺伝子特異的抗体およびMHCクラスI(HLA-A、-B、-C)で共染色した細胞は、2つの画分:HLA-A2⁻およびMHCクラスI⁺である細胞と、HLA-A2⁺/MHCクラスI⁺である細胞にさらに分けることができた。MHCクラスI細胞表面の相対発現における2つの集団のこの相違は、1つのHLA遺伝子の対立遺伝子特異的発現が欠如しているが、他の全てのクラスI細胞表面抗原は維持する細胞の精製集団を取得するためのFACSまたは免疫磁気選別による単離を支持する。要約すると、この実施例は、一次ヒト血球中の複数のHLA遺伝子の対立遺伝子特異的ノックダウンを示す。

【0955】

実施例12:HLA遺伝子型のマッチングを促進するためのHLA対立遺伝子のノックアウト

移植されたHLA遺伝子ミスマッチ同種異系細胞(例えば、HSC)の拒絶の尤度を低減するために、移植を必要とするレシピエント対象を6つのHLA対立遺伝子(HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1で各々2つずつの対立遺伝子)でHLAタイピングする(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1多型を決定する)。理想的には、6/6HLA対立遺伝子マッチは、移植後にGVHDを発生するリスクが低いことから、レシピエント遺伝子型は、同じ6/6HLA対立遺伝子を有するドナーとマッチする。6/6HLA対立遺伝子を有するドナーは利用可能ではない(例えば、骨髓もしくは臍帯血HSCドナー登録簿、または近縁の家族メンバーから)が、5/6、4/6、3/6もしくは2/6HLA対立遺伝子マッチを有する部分的にマッチするドナーが利用可能である場合、本明細書に記載の方法を用いて、部分的マッチドナーとレシピエント間のミスマッチを低減することができる。必要に応じて、本明細書に記載される遺伝子編集方法を用いて単一对立遺伝子または複数の対立遺伝子(2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つの対立遺伝子)を破壊して、移植レシピエントにおけるGVHD発生のリスクおよび/または疾患の重症度を低減することができる。以下の実施例におけるドナーとレシピエント間のHLA遺伝子マッチングを記載する全ての事例において、分子はマッチ対立遺伝子の数を示し、分母は発現された対立遺伝子の数を示す。

【0956】

本明細書に記載される方法を用いて、ドナー血球(例えば、HSCとT細胞)を修飾して、免疫適合性血球を作製することができる。例えば、本方法を用いて、ドナーHSCにおける1つ、2つもしくは3つのHLA対立遺伝子を破壊(例えば、ノックアウト)して、特定の集団に存在する頻度が最も高いHLA遺伝子型とマッチする細胞を作製することができる。例えば、北アメリカにおける4つの民族群に最も一般的な10のハプロタイプを表35~38に列記する(例えば、<https://bioinformatics.bethematchclinical.org/hla-resources/haplotype-frequencies/>;Burdett et al., Hum. Immunol. 64(10 Suppl):S6(2003)で入手可能な全米骨髓バンク

(National Marrow Donor Program) HLAハプロタイプ頻度データを参照されたい)。

【0957】

【表77】

表 35. 米国内でヨーロッパ系アメリカ人系統を有する個体について最も一般的な 10 の HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 ハプロタイプ

HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	ヨーロッパ系ランク
0101g	0801g	0301	1
0301g	0702g	1501	2
0201g	4402g	0401	3
0201g	0702g	1501	4
2902	4403	0701	5
0201g	1501g	0401	6
0101g	5701	0701	7
0301g	3501g	0101	8
0201g	4001g	1302	9
3001	1302	0701	10

10

【0958】

【表78】

表 36: 米国内でアフリカ系アメリカ人系統を有する個体について最も一般的な 10 の HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 ハプロタイプ

HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	アフリカ系アメリカ人ランク
3001	4201	0302	1
0101g	0801g	0301	2
6801g	5802	1201g	3
6802	1510	0301	4
3303	5301	0804	5
3601	5301	1101	6
0301g	0702g	1501	7
3402	4403	1503	8
2902	4403	0701	9
3001	4201	0302	10

30

【0959】

40

50

【表 7 9】

表 37. 米国内でアジア系統を有する個体について最も一般的な 10 の HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 ハプロタイプ

HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	アジア系ランク
3303	5801g	0301	1
0207g	4601	0901	2
3303	4403	0701	3
3001	1302	0701	4
3303	5801g	1302	5
1101g	1502	1202	6
2402g	5201g	1502	7
0101g	5701	0701	8
3303	4403	1302	9
0101g	3701	1001	10

10

【0 9 6 0】

【表 8 0】

20

表 38. 米国内でヒスパニック系/ラテンアメリカ人系統を有する個体について最も一般的な 10 の HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 ハプロタイプ

HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	ヒスパニック系ランク
2902	4403	0701	1
0101g	0801g	0301	2
0301g	0702g	1501	3
3002	1801g	0301	4
3301	1402	0102	5
6803	3905	0407	6
2301g	4403	0701	7
2402g	3906	1406	8
0201g	0702g	1501	9
0206	3905	0407	10

30

【0 9 6 1】

レシピエントに対して 3 / 6 H L A 対立遺伝子マッチを有するドナーの場合、単一 H L A 対立遺伝子、2 つの H L A 対立遺伝子、または 3 つの H L A 対立遺伝子を破壊することによって、H L A マッチング度を高める、例えば、H L A マッチングをそれぞれ 4 / 6、5 / 6 もしくは 6 / 6 対立遺伝子マッチまで高めることができる。

40

【0 9 6 2】

以下に示すように、本明細書に記載される方法は、レシピエントに対して 3 / 6 H L A 対立遺伝子でマッチするいずれのドナー細胞にも適用することができる。例えば、ドナーとレシピエントが、以下に挙げる H L A 遺伝子型（表 3 9）を有しており、ここで、ドナー H L A 遺伝子型が、2 つの最も一般的なヨーロッパ系アメリカ人ハプロタイプを含み、かつレシピエントが、対立遺伝子 1 にハプロタイプマッチを、また対立遺伝子 2 にいずれかの非マッチハプロタイプを有する場合、本明細書に記載される方法を用い、以下によって H L A マッチング度を高めることができる：

（a）単一对立遺伝子（例えば、H L A - A * 0 3 0 1 g、H L A - B * 0 7 0 2、H

50

HLA-DRB1*1501)の破壊(例えば、ノックアウト)による4/6マッチの生成。

(b) 2つの対立遺伝子(例えば、HLA-A*0301gとHLA-B*0702、HLA-A*0301gとHLA-DRB1*1501、HLA-B*0702とHLA-DRB1*1501)の多重破壊(例えば、ノックアウト)による5/6マッチの生成。

(c) 3つの対立遺伝子(例えば、HLA-A*0301g、HLA-B*0702、HLA-DRB1*1501)の多重破壊(例えば、ノックアウト)による6/6マッチの生成。

【0963】

【表81】

表 39.

	ドナー			レシピエント		
	HLA クラス I		HLA クラス II	HLA クラス I		HLA クラス II
	HLA-A*	HLA-B*	HLA-A*	HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*
対立 遺伝子 1	0101g	0801g	0301	0101g	0801g	0301
対立 遺伝子 2	0301g	0702g	1501	いずれかの 非マッチ対立 遺伝子、 例えば、2402	いずれかの 非マッチ対立 遺伝子、 例えば、3502	いずれかの 非マッチ対立 遺伝子、 例えば、1104

【0964】

例えば、ドナーとレシピエントが、以下に挙げるHLA遺伝子型(表40)を有しており、ここで、ドナーHLA遺伝子型が、2つの最も一般的なアフリカ系アメリカ人ハプロタイプを含み、かつレシピエントが、対立遺伝子1にハプロタイプマッチを、また対立遺伝子2にいずれかの非マッチハプロタイプを有する場合、本明細書に記載される方法を用い、以下によってHLAマッチング度を高めることができる：

(a) 単一对立遺伝子(例えば、HLA-A*0101g、HLA-B*0801gまたはHLA-DRB1*0301)の破壊(例えば、ノックアウト)による4/6HLAマッチの生成。

(b) 2つの対立遺伝子(例えば、HLA-A*0101gとHLA-B*0801g、HLA-A*0101gとHLA-DRB1*0301、HLA-B*0801gとHLA-DRB1*0301)の多重破壊(例えば、ノックアウト)による5/6マッチの生成。

(c) 3つの対立遺伝子(例えば、HLA-A*0101g、HLA-B*0801gおよびHLA-DRB1*0301)の多重破壊(例えば、ノックアウト)による6/6マッチの生成。

【0965】

10

20

30

40

50

【表 8 2】

表 40.

	ドナー			レシピエント		
	HLA クラス I		HLA クラス II	HLA クラス I		HLA クラス II
	HLA-A*	HLA-B*	HLA-A*	HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*
対立遺伝子 1	3001	4201	0302	3001	4201	0302
対立遺伝子 2	0101g	0801g	0301	いずれかの非マッチ対立遺伝子、例えば、2402g	いずれかの非マッチ対立遺伝子、例えば、3543g	いずれかの非マッチ対立遺伝子、例えば、0407

10

【0966】

例えば、ドナーとレシピエントが、以下に挙げる H L A 遺伝子型（表 4 1）を有しており、ここで、ドナー H L A 遺伝子型が、2つの最も一般的なアジア系ハプロタイプを含み、かつレシピエントが、対立遺伝子 1 にハプロタイプマッチを、また対立遺伝子 2 にいずれかの非マッチハプロタイプを有する場合、本明細書に記載される方法を用い、以下によって H L A マッチング度を高めることができる：

20

（a）単一对立遺伝子（例えば、H L A - A * 0 2 0 7 g、H L A - B * 4 6 0 1 または H L A - D R B 1 * 0 9 0 1）の破壊（例えば、ノックアウト）による 4 / 6 H L A マッチの生成。

（b）2つの対立遺伝子（例えば、H L A - A * 0 2 0 7 g と H L A - B * 4 6 0 1、H L A - A * 0 2 0 7 g と H L A - D R B 1 * 0 9 0 1、H L A - B * 4 6 0 1 と H L A - D R B 1 * 0 9 0 1）の多重破壊（例えば、ノックアウト）による 5 / 6 マッチの生成。

（c）3つの対立遺伝子（例えば、H L A - A * 0 2 0 7 g、H L A - B * 4 6 0 1、および H L A - D R B 1 * 0 9 0 1）の多重破壊（例えば、ノックアウト）による 6 / 6 マッチの生成。

【0967】

30

【表 8 3】

表 41.

	ドナー			レシピエント		
	HLA クラス I		HLA クラス II	HLA クラス I		HLA クラス II
	HLA-A*	HLA-B*	HLA-A*	HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*
対立遺伝子 1	3303	5801g	0301	3303	5801g	0301
対立遺伝子 2	0207g	4601	0901	いずれかの非マッチ対立遺伝子、例えば、1101g	いずれかの非マッチ対立遺伝子、例えば、5201g	いずれかの非マッチ対立遺伝子、例えば、1501

40

【0968】

例えば、ドナーとレシピエントが、以下に挙げる H L A 遺伝子型（表 4 2）を有しており、ここで、ドナー H L A 遺伝子型が、2つの最も一般的なヒスパニック系 / ラテンアメリカ人ハプロタイプを含み、かつレシピエントが、対立遺伝子 1 にハプロタイプマッチを、また対立遺伝子 2 にいずれかの非マッチハプロタイプを有する場合、本明細書に記載される方法を用い、以下によって H L A マッチング度を高めることができる：

（a）単一对立遺伝子（例えば、H L A - A * 0 1 0 1 g、H L A - B * 0 8 0 1 g または H L A - D R B 1 * 0 3 0 1）の破壊（例えば、ノックアウト）による 4 / 6 H L A

50

マッチの生成。

(b) 2つの対立遺伝子（例えば、HLA-A*0101gとHLA-B*0801g、HLA-A*0101gとHLA-DRB1*0301、HLA-B*0801gとHLA-DRB1*0301）の多重破壊（例えば、ノックアウト）による5／6マッチの生成。

(c) 3つの対立遺伝子（例えば、HLA-A*0207g、HLA-B*4601、およびHLA-DRB1*0301）の多重破壊（例えば、ノックアウト）による6／6マッチの生成。

【0969】

【表84】

10

表 42.

	ドナー			レシピエント		
	HLA クラス I		HLA クラス II	HLA クラス I		HLA クラス II
	HLA-A*	HLA-B*	HLA-A*	HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*
対立遺伝子 1	2902	4403	0701	2902	4403	0701
対立遺伝子 2	0101g	0801g	0301	いずれかの非マッチ対立遺伝子、例えば、3102	いずれかの非マッチ対立遺伝子、例えば、3501g	いずれかの非マッチ対立遺伝子、例えば、0407

20

【0970】

以下に示すように、本明細書に記載される方法は、レシピエントに対して4／6HLA対立遺伝子でマッチするいずれのドナー細胞にも適用することができる。例えば、ドナーとレシピエントが、以下に挙げるHLA遺伝子型（表43）を有しており、ここで、ドナーHLA遺伝子型が、2つの最も一般的なヒスパニック系／ラテンアメリカ人ハプロタイプを含み、かつレシピエントが、対立遺伝子1にハプロタイプマッチを、また対立遺伝子2（例えば、HLA-A）にいずれかの非マッチハプロタイプを有する場合、本明細書に記載される方法を用いて、以下によりHLAマッチング度を高めることができる：

30

(a) 単一对立遺伝子（例えば、HLA-B*0801gまたはHLA-DRB1*0301）の破壊（例えば、ノックアウト）による5／6マッチの生成。

(b) 2つの対立遺伝子（例えば、HLA-B*0801gとHLA-DRB1*0301）のT多重破壊（例えば、ノックアウト）による6／6マッチの生成。

【0971】

【表85】

表 43.

	ドナー			レシピエント		
	HLA クラス I		HLA クラス II	HLA クラス I		HLA クラス II
	HLA-A*	HLA-B*	HLA-A*	HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*
対立遺伝子 1	2902	4403	0701	2902	4403	0701
対立遺伝子 2	0101g	0801g	0301	0101g	1402	0405

40

【0972】

以下に示すように、本明細書に記載される方法は、レシピエントに対して5／6HLA対立遺伝子でマッチするいずれのドナー細胞にも適用することができる。例えば、ドナーとレシピエントが、以下に挙げるHLA遺伝子型（表44）を有しており、ここで、ドナ

50

ーHLA遺伝子型が、2つの最も一般的なヒスパニック系／ラテンアメリカ人ハプロタイプを含み、かつレシピエントが、対立遺伝子1にハプロタイプマッチを、また対立遺伝子2の3つのHLA遺伝子座の2つでマッチするいずれかのハプロタイプを有する場合、本明細書に記載される方法を用い、以下によってHLAマッチング度を高めることができる：

(a) 単一对立遺伝子（例えば、HLA-DRB1*0301）の破壊（例えば、ノックアウト）による6／6マッチの生成。

【0973】

【表86】

表 44.

	ドナー			レシピエント		
	HLA クラス I		HLA クラス II	HLA クラス I		HLA クラス II
	HLA-A*	HLA-B*	HLA-A*	HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*
対立遺伝子 1	2902	4403	0701	2902	4403	0701
対立遺伝子 2	0101g	0801g	0301	いずれかの 非マッチ 対立遺伝子、 例えば、0101g	いずれかの 非マッチ 対立遺伝子、 例えば、0801g	いずれかの 非マッチ 対立遺伝子、 例えば、1303

【0974】

実施例 16：マイノリティまたは少数集団において、マッチしない可能性が非常に高いHLA遺伝子座のマッチングを促進するためのHLA対立遺伝子の遺伝子破壊（例えば、ノックアウト）

以下の記述および表は、ドナー組織またはHSCTを必要とするレシピエントで最も一般的にマッチしないHLAハプロタイプにおいて向上したHLAマッチを生成するための、ドナー細胞中の1、2もしくは3HLA遺伝子座のノックアウトを説明する。

【0975】

例えば、下記のHLAハプロタイプは、アジア系統の個体に一般的であり、全米骨髄バンク（United States National Marrow Donor Program）（NMDP）におけるその他全ての対象では稀である（表45）。従って、アジア系統および／または下記ハプロタイプのいずれかを有するレシピエントは、NMDP内で6／6HLAマッチを見出すことはできない。

【0976】

【表 8 7】

表 45. アジア系統の個体に一般的で、且つ NMDP の一般的ドナープールにおいて稀な HLA ハプロタイプ

HLA クラス I		HLA クラス II
HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*
2	46	09:01
33	44	13:02
11	75	12:02
24	35	12:02
2	46	08:03
11	62	04:06
24	54	04:05
24	38	15:02
24	75	12:02
11	46	09:01
2	13	12:02

10

【0 9 7 7】

例えば、下記の HLA ハプロタイプは、アフリカ系アメリカ人系統の個体に共通し、全米骨髄バンク (United States National Marrow Donor Program) (NMDP) におけるその他全ての対象では稀である (表 4 6)。従って、アフリカ系アメリカ人系統および／または下記ハプロタイプのいずれかを有するレシピエントは、NMDP 内で 6 / 6 HLA マッチを見出すことはできない。

20

【0 9 7 8】

【表 8 8】

表 46: アフリカ系アメリカ人系統の個体に一般的で、且つ NMDP の一般的ドナープールにおいて稀な HLA ハプロタイプ

HLA クラス I		HLA クラス II
HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*
68	58	1201
36	53	1101
34	44	1503
30	42	0804
30	57	1301
68	53	1503

30

【0 9 7 9】

例えば、下記の HLA ハプロタイプは、ヒスパニック系ラテンアメリカ人系統の個体に共通し、全米骨髄バンク (United States National Marrow Donor Program) (NMDP) におけるその他全ての対象では稀である (表 4 7)。従って、ヒスパニック系ラテンアメリカ人系統および／または下記ハプロタイプのいずれかを有するレシピエントは、NMDP 内で 6 / 6 マッチを見出すことはできない。

40

【0 9 8 0】

50

【表 8 9】

表 47. ヒスパニック系統の個体に一般的で、且つ NMDP の一般的ドナープールにおいて稀な HLA ハプロタイプ

HLA クラス I		HLA クラス II
HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*
2	35	0802
68	39	0407
2	39	0407
24	39	1406
2	35	0407
2	62	0802
31	35	0802
24	35	0407
24	61	0802

10

【0 9 8 1】

表 4 5、4 6 および 4 7 に列記される H L A ハプロタイプは、特定の集団内で共通であるが、ドナープール、特に、全米骨髄バンク（United States National Marrow Donor Program）（NMDP）の大部分を占める白色人種個体のドナープールでは、稀である。表 5 6、5 7 または 5 8 に列記されるハプロタイプを有するレシピエントは、NMDP において 6 / 6 マッチを見出す可能性がより少ない。ドナー細胞中の 1 つ、2 つもしくは 3 つの H L A 対立遺伝子の破壊（例えば、ノックアウト）のために本明細書に記載の方法を用いて、特に表 4 5、4 6 および 4 7 に列記される H L A ハプロタイプを有するレシピエントをはじめとするレシピエントに対する H L A マッチングを向上させることができる。

20

【0 9 8 2】

表 4 8 ～ 5 0 は、最も一般的にマッチしないマイノリティハプロタイプ（例えば、表 4 5、4 6 および 4 7 に列記されるハプロタイプ）に適用することができるドナー細胞のための適切な H L A ー遺伝子破壊（例えば、ノックアウト）の例を記載する。表 4 8 ～ 5 0 には、マイノリティ集団（ドナープールにおいて少数しか存在しないため、理想的な 6 / 6 H L A マッチが見出されないリスクがある）で最も一般的なハプロタイプの各々について、最も一般的なハプロタイプマッチが示され、ここで、ドナー細胞中の単一 H L A 遺伝子座の遺伝子破壊（例えば、ノックアウト）が H L A マッチングを向上させる。

30

【0 9 8 3】

40

50

表 48.

アジア系レシビエントの場合:													
例	対立遺伝子	レシビエントハプロタイプ			レシビエント群で N 番目に一般的なハプロタイプ	対立遺伝子 2 上の HLA の破壊 (例えば、ノックアウト)	ドナーハプロタイプ				NMDP登録簿においてN番目に高頻度の対立遺伝子		
		A	B	DRB1			A	B	DRB1	アジア系	AFA	CAU	HIS
	1	3001	1302	701	4		3001	1302	701			10	
	2	2	46	0901	3	HLA-B	2	62	0901	35	1351	257	442
1	2	2	46	0901	3	HLA-B	2	51	0901	53	679	265	423
2	2	2	46	0901	3	HLA-B	2	60	0901	19	1625	322	1660
3	2	2	46	0901	3	HLA-B	2	7	0901	1159	344	353	982
4	2	2	46	0901	3	HLA-B	2	44	0901	1353	1485	537	331
5	2	33	44	1302	5	HLA-DRB1	33	44	0102		1171	889	
6	2	33	44	1302	5	HLA-DRB1	33	44	0701		440	1023	
7	2	33	44	1302	5	HLA-DRB1	33	44	1503		324	11884	
8	2	11	75	1202	9	HLA-DRB1	11	75	1502	692	6066	5855	17589
9	2	11	75	1202	9	HLA-DRB1	11	75	0901	228	18040	8520	17598
10	2	11	75	1202	9	HLA-DRB1	11	75	1501	51	6689	16385	4740
11	2	11	75	1202	9	HLA-A	2	75	1202	30	4233	7386	4105
12	2	11	75	1202	9	HLA-A	24	75	1202	18	4411	7615	3425
13	2	11	75	1202	9	HLA-A	74	75	1202	3311	2889	28016	28169
14	2	11	75	1202	9	HLA-A	2	35	1202	481	4388	5771	14775
15	2	24	35	1202	11	HLA-A	24	35	1104	84	670	25	12
16	2	24	35	1202	11	HLA-DRB1	24	35	0103	3573	1159	146	689
17	2	24	35	1202	11	HLA-DRB1	24	35	1401	317	1144	167	184
18	2	24	35	1202	11	HLA-DRB1	24	35	0101	620	908	179	496
19	2	24	35	1202	11	HLA-DRB1	24	35	1202	11	554	4308	2171
20	2	24	35	1202	11	HLA-DRB1	24	62	1202	100	3786	5038	2488
21	2	24	35	1202	11	HLA-B	24	27	1202	210	18924	7567	5083
22	2	24	35	1202	11	HLA-B	24	75	1202	18	4411	7615	3425
23	2	24	35	1202	11	HLA-B	24	13	1202	108	18812	8609	9014
24	2	2	46	0803	12	HLA-B	2	51	0803	263	2501	347	827
25	2	2	46	0803	12	HLA-B	2	38	0803	89	14962	3782	14824
26	2	2	46	0803	12	HLA-B	2	46	0803	12	11738	4401	5619
27	2	2	46	0803	12	HLA-B	2	46	0803	12	11738	4401	5619

表 49.

アフリカ系アメリカ人 レシビエントの場合:

例	対立 遺伝子	レシビエント ハプロタイプ				レシビエント群で N番目に 一般的な ハプロタイプ	対立遺伝子上の HLAの破壊 (例えば、 ノックアウト)	ドナーハプロタイプ				NMDP登録簿においてN番目に高頻度の 対立遺伝子			
		A	B	DRB1				A	B	DRB1		アジア系	AFA	CAU	HIS
	1	0101g	0801g	301	2		N/A	0101g	0801g	301		40	2	1	2
29	2	36	53	1101	6		HLA-DRB1	36	53	0301		9169	240	12182	3646
30	2	36	53	1101	6		HLA-DRB1	36	53	0804		24834	192	12184	4206
31	2	36	53	1101	6		HLA-DRB1	36	53	1101		4434	6	3758	431
32	2	36	53	1101	6		HLA-DRB1	36	53	1503		24833	123	9287	1396
33	2	34	44	1503	7		HLA-DRB1	34	44	1302		2886	366	12047	1365
34	2	34	44	1503	7		HLA-DRB1	34	44	0701		1832	656	3866	1782
35	2	34	44	1503	7		HLA-DRB1	34	44	1301		6439	1364	3654	12872
36	2	34	44	1503	7		HLA-B	34	53	1503		24221	49	7996	1572
37	2	30	42	0804	7		HLA-B	30	35	0804		20439	948	2604	21750
38	2	30	42	0804	7		HLA-B	30	53	0804		7587	62	5635	1419
39	2	30	42	0804	7		HLA-DRB1	30	42	0302		2148	1	1353	62
40	2	30	57	1301	15		HLA-DRB1	30	57	0701		2029	232	854	1651
41	2	30	57	1301	15		HLA-DRB1	30	57	1503		20944	100	5094	1524
42	2	30	57	1301	15		HLA-B	30	13	1301		594	2367	1041	946
43	2	30	57	1301	15		HLA-B	30	58	1301		3798	478	6477	1158
44	2	30	57	1301	15		HLA-A	1	57	1301		452	1004	140	672
45	2	68	53	1503	20		HLA-DRB1	68	53	1501		26442	2181	1903	2341
46	2	68	53	1503	20		HLA-DRB1	68	53	1302		1998	54	185	120
47	2	68	53	1503	20		HLA-DRB1	68	53	1303		11416	38	4379	867
48	2	68	53	1503	20		HLA-B	68	7	1503		5433	24	7199	365

【表 9 2】

表 50.

ヒスパニック系レシピエントの場合:

	対立遺伝子	レシピエントハプロタイプ			レシピエント群でN番目に一般的なハプロタイプ	対立遺伝子2上のHLAの破壊(例えば、ノックアウト)	ドナーハプロタイプ			NMDP登録簿においてN番目に高頻度の対立遺伝子			
		A	B	DRB1			A	B	DRB1	アジア系	AFA	CAU	HIS
	1	2902	4403	701	1		2902	4403	701	1307	9	5	1
50	2	2	35	0802	3	HLA-DRB1	2	62	0802	642	3771	1194	14
51	2	2	35	0802	3	HLA-DRB1	2	39	0802	273	1981	1620	41
52	2	2	35	0802	3	HLA-DRB1	2	61	0802	201	2971	2146	22
53	2	68	39	0407	5	HLA-B	68	35	0407	5184	1810	1357	31
54	2	2	39	0407	6	HLA-DRB1	2	39	0101	1793	1329	235	576
55	2	24	39	1406	8	HLA-A	2	39	1406	2087	4227	3406	51
56	2	2	35	0407	10	HLA-A	24	35	0407	2307	723	1167	18
57	2	2	62	0802	14	HLA-B	2	35	0802	278	1161	952	3
58	2	31	35	0802	16	HLA-A	2	35	0802	278	1161	952	3
59	2	24	35	0407	18	HLA-A	2	35	0407	945	882	862	10
60	2	24	61	0802	19	HLA-B	24	39	0802	1446	3425	2947	82
61	2	24	61	0802	19	HLA-A	2	61	0802	201	2971	2146	22

【0986】

一般的に存在するハプロタイプを、例えば、1つ、2つ、もしくは3つのHLA対立遺伝子の破壊（例えば、ノックアウト）による修飾のために選択することによって、少数しか存在しないレシピエントとマッチする尤度が高められる。別のNMDPベースのデータベースを作成して、例えば、1つ、2つもしくは3つのHLA対立遺伝子の破壊（例えば、ノックアウト）による最も適切なHLA修飾の決定を容易にすることができ、これは、極めて多数のレシピエントへの移植に使用することができる。方法およびドナー細胞は、ドナー組織の利用可能性、レシピエントハプロタイプ、および特異的HLAノックアウトの予測効果に基づいて選択される。

【0987】

例えば、遺伝子型HLA-A68、HLA-B53、HLA-DRB1-1503；HLA-A0101g、HLA-B0801g、HLA-DRB1*0301を有するアフリカ系アメリカ人レシピエントが、HSCを必要とする場合、遺伝子型HLA-A68、HLA-B53、HLA-DRB1*1302；HLA-A0101g、HLA-B0801g、HLA-DRB1-0301を有する白色人種ドナーが利用可能であると考えられる。何故なら、これらのハプロタイプは、白色人種ドナープールにおいて、それぞれ、185番目および1番目に一般的なハプロタイプであるからである。本明細書に記載される方法を用いて、ドナー細胞中のミスマッチHLA-DRB1*1302対立遺伝子の遺伝子破壊（例えば、ノックアウト）によって、有効な6/6HLAマッチが生成されるであろう。あるいは、HLA-B遺伝子座での遺伝子破壊が望ましい（例えば、高い生存率または低いGVHD発生率のために）場合には、別のドナーを選択してもよい。遺伝子型HLA-A68、HLA-B7、HLA-DQ-1503；HLA-A0101g、HLA-B0801g、HLA-DQ-0301を有するドナーHSCにおける生体外HLA-B7遺伝子破壊（例えば、ノックアウト）は、これらのハプロタイプが、アフリカ系アメリカ人ドナープールにおいて、それぞれ、24番目および2番目に一般的なハプロタイプであるため、これらを使用してもよい。

10

【0988】

NMDPデータベース、または任意の臓器ドナーデータベースから、共通のHLAハプロタイプを見出すこともでき、これらのハプロタイプを、1つまたは複数の遺伝子座（例えば、HLA-A、HLA-BもしくはHLA-DRB1）で破壊（例えば、ノックアウト）すれば、最大集団のためのマッチドナー細胞が得られるであろう。あるいは、NMDPデータベース、または任意の臓器ドナーデータベースから、共通のHLAハプロタイプを見出すこともでき、これらのハプロタイプを、単一遺伝子座（例えば、HLA-A、HLA-BもしくはHLA-DRB1）で破壊（例えば、ノックアウト）すれば、マッチするドナー組織もしくはHSCを見出す可能性が最も低いレシピエントのためのマッチドナー細胞が得られるであろう。

20

【0989】

例えば、3/6HLA対立遺伝子でマッチを有することが判明しているレシピエントの場合、本明細書に記載される方法を用いて、以下のことができる：

30

(a) ドナー細胞の単一对立遺伝子（例えば、HLA-A、HLA-BもしくはHLA-DRB1）を破壊（例えば、ノックアウト）して、外来抗原認識に関して有効な4/6マッチのために、3/6HLA対立遺伝子（1/6ドナー対立遺伝子は発現されない）でレシピエントに対するドナーのHLAマッチを生成する。単一HLAドナー対立遺伝子の破壊は、4/6マッチを有効に生成し、これは、レシピエントにおけるGVHDの発生リスクおよび/またはその重症度を低減し得る。

(b) ドナー細胞の2つの対立遺伝子（例えば、HLA-A対立遺伝子とHLA-B対立遺伝子、HLA-A対立遺伝子とHLA-DRB1対立遺伝子、もしくはHLA-B対立遺伝子とHLA-DRB1対立遺伝子）を破壊（例えば、ノックアウト）して、外来抗原認識に関して有効な5/6マッチのために、3/6HLA対立遺伝子（2/6ドナー対立遺伝子は発現されない）でレシピエントに対するドナーのHLAマッチを生成する。2つのHLAドナー対立遺伝子の破壊は、5/6マッチを有効に生成し、これは、レシピエントにおけるGVHDの発生リスクおよび/またはその重症度を低減し得る。

40

(c) ドナー細胞の3つの対立遺伝子（例えば、HLA-A対立遺伝子、HLA-B対立遺伝子、およびHLA-DRB1対立遺伝子）を破壊（例えば、ノックアウト）して、外来抗原認識に関して有効な6/6マッチのために、3/6HLA対立遺伝子（3/6ドナー対立遺伝子は発現されない）でレシピエントに対するドナーのHLAマッチを生成する。3つのHLAドナー対立遺伝子の破壊は、6/6マッチを有効に生成し、これは、レシピエントにおけるGVHDの発生リスクおよび/またはその重症度を低減し得る。

【0990】

50

例えば、4／6 HLA対立遺伝子でマッチを有することが判明しているレシピエントの場合、本明細書に記載される方法を用いて、以下のことができる：

(a) ドナー細胞の単一对立遺伝子（例えば、HLA-A、HLA-BもしくはHLA-DRB1）を破壊（例えば、ノックアウト）して、外来抗原認識に関して有効な5／6マッチのために、4／6 HLA対立遺伝子（1／6 ドナー対立遺伝子は発現されない）でレシピエントに対するドナーのHLAマッチを生成する。単一HLAドナー対立遺伝子の破壊は、5／6 マッチを有効に生成し、これは、レシピエントにおけるGVHDの発生リスクおよび／またはその重症度を低減し得る。

(b) ドナー細胞の2つの対立遺伝子（例えば、HLA-A対立遺伝子とHLA-B対立遺伝子、HLA-A対立遺伝子とHLA-DRB1対立遺伝子、もしくはHLA-B対立遺伝子とHLA-DRB1対立遺伝子）を破壊（例えば、ノックアウト）して、外来抗原認識に関して有効な6／6マッチのために、4／6 HLA対立遺伝子（2／6 ドナー対立遺伝子は発現されない）でレシピエントに対するドナーのHLAマッチを生成する。2つのHLAドナー対立遺伝子の破壊は、6／6 マッチを有効に生成し、これは、レシピエントにおけるGVHDの発生リスクおよび／またはその重症度を低減し得る。

【0991】

例えば、レシピエントが、遺伝子型HLA-A2 HLA-B46 HLA-DRB1 0901：HLA-A33 HLA-B44 HLA-DRB1*1302を有し、かつ遺伝子型HLA-A2 HLA-B62 HLA-DRB1 0901：HLA-A33 HLA-B58 HLA-DRB1*1302を有するドナーが見出された場合、ドナーとレシピエントの間で4／6 HLA対立遺伝子がマッチする。ドナー細胞中のHLA-B62の破壊（例えば、ノックアウト）によって、4／6 マッチ対立遺伝子、1つの非発現（ヌル）対立遺伝子、および1つのミスマッチ対立遺伝子が生成される。こうした状況において有効なHLAマッチは、5／6であり、これは、4／6 HLAマッチと比較して、レシピエントにおけるGVHDの発生リスクおよび／またはその重症度を低減し得る。

【0992】

例えば、5／6 HLA対立遺伝子でマッチを有することが判明しているレシピエントの場合、本明細書に記載される方法を用いて、以下のことができる：

(c) ドナー細胞の単一对立遺伝子（例えば、HLA-A、HLA-BもしくはHLA-DRB1）を破壊（例えば、ノックアウト）して、外来抗原認識に関して有効な6／6マッチのために、5／6 HLA対立遺伝子（1／6 ドナー対立遺伝子は発現されない）でレシピエントに対するドナーのHLAマッチを生成する。単一HLAドナー対立遺伝子の破壊は、6／6 マッチを有効に生成し、これは、レシピエントにおけるGVHDの発生リスクおよび／またはその重症度を低減し得る。

【0993】

例えば、レシピエントが、ハプロタイプHLA-A2 HLA-B46 HLA-DR 0901：HLA-A33 HLA-B44 HLA-DR1302を有し、かつハプロタイプHLA-A2 HLA-B62 HLA-DR 0901：HLA-A33 HLA-B44 HLA-DR1302を有するドナーが見出された場合、ドナーとレシピエントの間で5／6 HLA対立遺伝子がマッチする。ドナー細胞中のHLA-B62の破壊（例えば、ノックアウト）によって、5／6 マッチ対立遺伝子と、1つの非発現（ヌル）対立遺伝子が生成される。こうした状況において有効なHLAマッチは、6／6であり、これは、5／6 HLAマッチと比較して、レシピエントにおけるGVHDの発生リスクおよび／またはその重症度を低減し得る。

【0994】

例えば、遺伝子型HLA-A*3001 2、HLA-B*1302 46、HLA-DRB1*701 0901を有するアジア系レシピエントは、ドナー細胞中のHLA-B62の体外破壊（例えば、ノックアウト）後に、次の遺伝子型：HLA-A*3001 2、HLA-B*1302 62、HLA-DRB1*701 0901を有するドナーからのドナーHSC移植を受けることができる。ドナー細胞は、レシピエント遺伝子型HL

10

20

30

40

50

A-A*3001 2、HLA-B*1302 46、HLA-DRB1*701 0901との有効な6/6マッチのために、遺伝子型HLA-A*3001 2、HLA-B*1302/-、HLA-DRB1*701 0901を有することになる。ハプロタイプHLA-A*3001、HLA-B*1302、HLA-DRB1*701を有するドナーHSCは、NMDPで利用可能な白色人種系統のハプロタイプの中で10番目に頻度の高いHLAハプロタイプである。ハプロタイプHLA-A2、HLA-B62、およびHLA-DRB1-0901を有するドナーHSCは、NMDPで利用可能な白色人種系統のハプロタイプの中で62番目に頻度の高いHLAハプロタイプである。従って、ドナー遺伝子型HLA-A*3001 2、HLA-B*1302 62、HLA-DRB1*701 0901のドナー遺伝子型が、レシピエントへの供与に利用可能であると考えられる。

10

【0995】

例えば、遺伝子型HLA-A*3001、HLA-B*1302、HLA-DRB1*701；HLA-A2、HLA-B46、HLA-DRB1-0901を有するアジア系レシピエントは、ドナー細胞中のHLA-Bの体外破壊（例えば、ノックアウト）後に、次の遺伝子型：HLA-A*3001、HLA-B*1302、HLA-DRB1*701；HLA-A2、HLA-B60、HLA-DRB1-0901を有するドナーからのドナーHSC移植を受けることができる。ドナー細胞は、レシピエント遺伝子型HLA-A*3001、HLA-B*1302、HLA-DRB1*701；HLA-A2、HLA-B46、HLA-DRB1-0901との有効な6/6マッチのために、遺伝子型A-A*3001、HLA-B*1302、HLA-DRB1*701；HLA-A2、HLA-B-、HLA-DRB1-0901を有することになる。ハプロタイプHLA-A*3001、HLA-B*1302、HLA-DRB1*701を有するドナーHSCは、NMDPで利用可能な白色人種系統のハプロタイプの中で10番目に頻度の高いHLAハプロタイプである。ハプロタイプHLA-A2、HLA-B60、およびHLA-DRB1-0901を有するドナーHSCは、NMDPで利用可能なアジア系統のハプロタイプの中で19番目に頻度の高いHLAハプロタイプである。従って、ドナー遺伝子型HLA-A*3001、HLA-B*1302、HLA-DRB1*701、HLA-B60、HLA-DRB1-0901のドナー遺伝子型が、レシピエントへの供与に利用可能であると考えられる。

20

30

【0996】

40

50

【表 9 3】

例えば、遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	0101g	0801g	301
2	36	53	1101

を有するアフリカ系アメリカ人レシピエントは、ドナー細胞中のHLA-DRB1*0804の体外破壊(例えば、ノックアウト)後に、

次の遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	0101g	0801g	301
2	36	53	0804

を有するドナーからのドナーHSC移植を受けることができる。ドナー細胞は、レシピエント遺伝子型との有効な6/6マッチのために、

遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	0101g	0801g	301
2	36	53	ヌル

を有することになる。

【0 9 9 7】

【表 9 4】

例えば、遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	0101g	0801g	301
2	68	53	1503

を有するアフリカ系アメリカ人レシピエントは、ドナー細胞中のHLA-DRB1*1503の体外破壊(例えば、ノックアウト)後に、

次の遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	0101g	0801g	301
2	68	7	1503

を有するドナーからのドナーHSC移植を受けることができる。ドナー細胞は、レシピエント遺伝子型との有効な6/6マッチのために、

遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	0101g	0801g	301
2	36	53	ヌル

を有することになる。

【0 9 9 8】

10

20

30

40

50

【表 9 5】

例えば、遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	2	35	0802

を有するヒスパニック系ラテンアメリカ人レシピエントは、ドナー細胞中のHLA-B*62の体外破壊(例えば、ノックアウト)後に、次の遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	2	62	0802

を有するドナーからのドナーHSC移植を受けることができる。ドナー細胞は、レシピエント遺伝子型との有効な6/6マッチのために、遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	2	ヌル	0802

を有することになる。

【0 9 9 9】

【表 9 6】

例えば、遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	68	39	0407

を有するヒスパニック系ラテンアメリカ人レシピエントは、ドナー細胞中のHLA-B*35の体外破壊(例えば、ノックアウト)後に、次の遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	68	35	0407

を有するドナーからのドナーHSC移植を受けることができる。ドナー細胞は、レシピエント遺伝子型との有効な6/6マッチのために、遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	2	ヌル	0802

を有することになる。

【1 0 0 0】

10

20

30

40

50

【表 9 7】

例えば、遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	24	39	1406

を有するヒスパニック系レシピエントは、ドナー細胞中のHLA-A*2の体外破壊(例えば、ノックアウト)後に、次の遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	2	39	1406

10

を有するドナーからのドナーHSC移植を受けることができる。ドナー細胞は、レシピエント遺伝子型との有効な6/6マッチのために、
遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	ヌル	39	1406

を有することになる。

20

【1 0 0 1】

【表 9 8】

例えば、遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	2	35	0407

を有するヒスパニック系レシピエントは、ドナー細胞中のHLA-A*24の体外破壊(例えば、ノックアウト)後に、次の遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	24	35	0407

30

を有するドナーからのドナーHSC移植を受けることができる。ドナー細胞は、レシピエント遺伝子型との有効な6/6マッチのために、
遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	ヌル	35	0407

を有することになる。

40

【1 0 0 2】

50

【表 99】

例えば、遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	2	62	0802

を有するヒスパニック系レシピエントは、ドナー細胞中のHLA-B*35の体外破壊(例えば、ノックアウト)後に、次の遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	2	35	0802

を有するドナーからのドナーHSC移植を受けることができる。ドナー細胞は、レシピエント遺伝子型との有効な6/6マッチのために、
遺伝子型:

対立遺伝子	A	B	DRB1
1	2902	4403	701
2	2	ヌル	0802

を有することになる。

【1003】

また、本明細書に記載される方法を用いて、いくつかの異なるドナー由来の細胞（例えば、HSC）において少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つもしくは6つ）のHLA対立遺伝子（例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRB1対立遺伝子）を体外破壊（例えば、ノックアウト）し、ドナー細胞（遺伝子破壊前または破壊後）をプールして、特定のレシピエントに対する1つまたは複数のマッチHLA対立遺伝子（例えば、HLA-A- / common allele、HLA-B- / common allele、HLA-DR- / common allele 遺伝子型）を有するドナー細胞を生成することもできる。これらの細胞を最も一般的なHLA（例えば、HLA-A、HLA-BもしくはHLA-DR）遺伝子型のために作製して、1または複数のレシピエントに使用するために維持してもよい。

【1004】

当業者は、これらの方法を用いて、他のHLA遺伝子座（例えば、HLA-CおよびHLA-DQ）を破壊（例えば、ノックアウト）することもできることは容易に見極められよう。例えば、ドナーと8 / 10 HLAマッチを有する特定のHLAハプロタイプを有するレシピエントの場合、近縁の非マッチドナー対立遺伝子をノックアウトして、ドナー-レシピエントマッチを実質的に9 / 10にすることができる。例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-CおよびHLA-DRでハプロタイプがマッチするが、単一HLA-DQ対立遺伝子ではマッチしなかったドナー組織における単一HLA-DQ対立遺伝子の破壊（例えば、ノックアウト）を実施して、有効な9 / 10ハプロタイプマッチを生成することができ、ミスマッチHLA-DQ対立遺伝子は発現されないため、これは、ドナー-レシピエントHLAマッチを実質的に10 / 10にすることができる。

【1005】

参照による援用

本明細書で言及される全ての出版物、特許、および特許出願は、あたかも個々の出版物、特許または特許出願が、具体的にそして個別に、参照により援用されると示されるかのよう、その内容全体を参照により本明細書に援用する。矛盾する場合は、本明細書のあらゆる定義を含め、本出願が優先される。

【1006】

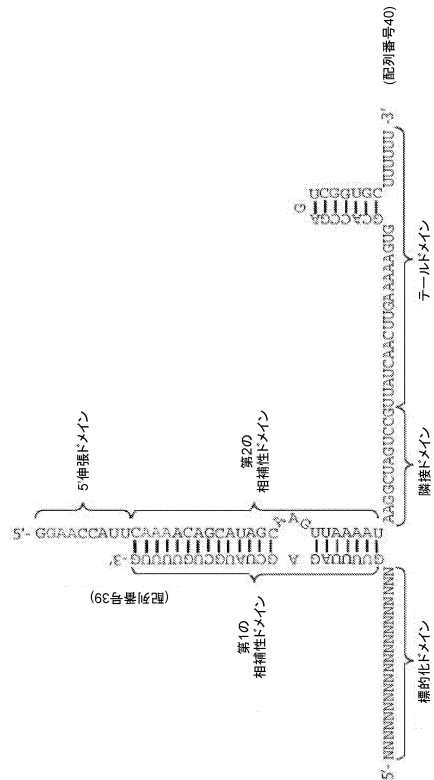
同等物

当業者は、単に通例の実験法を使用して、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態の多くの同等物を認識し、または見極めることができるであろう。このような同等物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

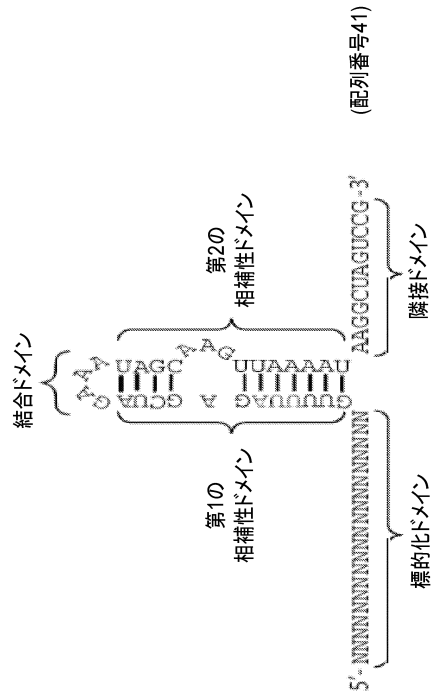
【図面】

【図 1 A】

【図 1 B】



1A



【図 4 A】

Chylinski et al.に開示されているHMH様ドメインのアライメント (MAFFT(v7.058b))によるGUSTALフォーマットアライメント	
1, 12	D-----IGTNSVGNVAVT
3, 20	D-----MGTNSVGNVAVT
15	D-----VGTSSVGNVAVT
4	D-----IGTASVGNVAVT
7	D-----VGTSSVGNVAVT
6	D-----IGTASVGNVAVT
5	D-----IGTNSVGNVAVT
8	D-----IGTNSVGNVAVT
9	D-----IGTNSVGNVAVT
10	D-----IGTNSVGNVAVT
11	D-----IGTNSVGNVAVT
42	D-----IGTNSVGNVAVT
48	D-----IGTNSVGNVAVT
43	D-----IGTNSVGNVAVT
14	D-----IGTNSVGNVAVT
15	D-----IGTNSVGNVAVT
16	D-----IGTNSVGNVAVT
8	D-----IGTNSVGNVAVT
22	D-----IGTNSVGNVAVT
23	D-----IGTNSVGNVAVT
24	D-----IGTNSVGNVAVT
25	D-----IGTNSVGNVAVT
26	D-----IGTNSVGNVAVT
66	D-----IGTNSVGNVAVT
59	D-----IGTNSVGNVAVT
61	D-----IGTNSVGNVAVT
64	D-----IGTNSVGNVAVT
67	D-----IGTNSVGNVAVT
32	D-----IGTNSVGNVAVT
28	D-----IGTNSVGNVAVT
29	D-----IGTNSVGNVAVT
63	D-----IGTNSVGNVAVT

図 4A

【図 4 B】

37	D-----VGTSSVGNVAVT
39	D-----MGTNSVGNVAVT
34	D-----VGTSSVGNVAVT
50	D-----IGTASVGNVAVT
54	D-----VGTSSVGNVAVT
49	D-----IGTASVGNVAVT
51	D-----IGTNSVGNVAVT
58	D-----IGTNSVGNVAVT
21	D-----IGTNSVGNVAVT
45	D-----IGTNSVGNVAVT
25	D-----IGTNSVGNVAVT
30	D-----IGTNSVGNVAVT
44	D-----IGTNSVGNVAVT
47	D-----IGTNSVGNVAVT
31	D-----IGTNSVGNVAVT
40	D-----IGTNSVGNVAVT
53	D-----IGTNSVGNVAVT
55	D-----IGTNSVGNVAVT
37	D-----IGTNSVGNVAVT
19	D-----IGTNSVGNVAVT
36	D-----IGTNSVGNVAVT
37	D-----IGTNSVGNVAVT
13	D-----IGTNSVGNVAVT
60	D-----IGTNSVGNVAVT
59	D-----IGTNSVGNVAVT
73	D-----IGTNSVGNVAVT
74	D-----IGTNSVGNVAVT
71	D-----IGTNSVGNVAVT
72	D-----IGTNSVGNVAVT

図 4B

【図 5 A】

Chylinski et al.に開示されているHMH様ドメインのアライメント (MAFFT(v7.058b))によるGUSTALフォーマットアライメント	
1	YDHIIPPS-LTKD-----DSF-DNLVLKERTAN
2	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
3	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
4	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
5	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
6	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
7	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
8	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
9	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
10	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
11	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
12	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
13	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
14	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
15	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
16	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
17	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
18	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
19	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
20	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
21	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
22	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
23	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
24	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
25	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
26	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN

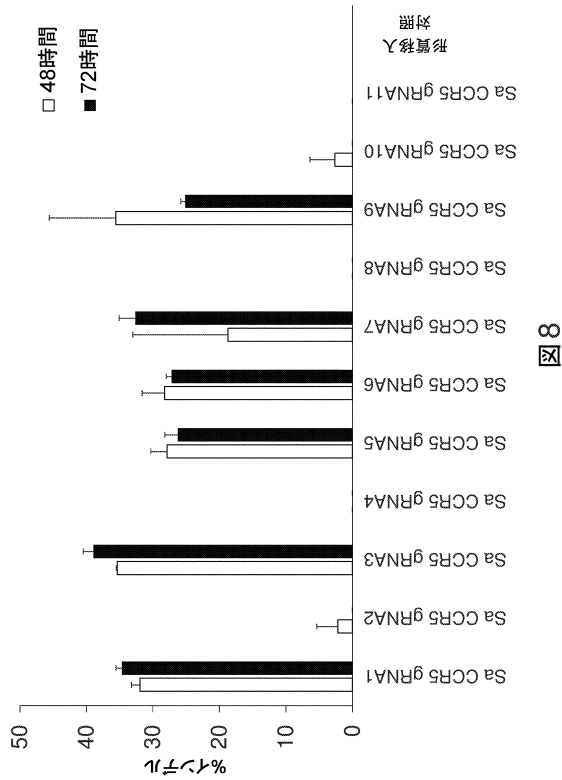
図 5A

【図 5 B】

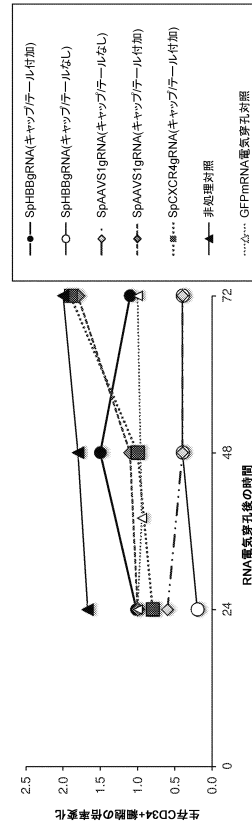
Chylinski et al.に開示されているHMH様ドメインのアライメント (MAFFT(v7.058b))によるGUSTALフォーマットアライメント	
29	EVDHIIPPS-ISFD-----NSV-SNKVLVTSQEN
57	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
58	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
51	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
55	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
57	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
56	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
54	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
31	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
45	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
53	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
60	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
21	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
22	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
46	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
33	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
42	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
43	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
44	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
20	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
66	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
47	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
45	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
48	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
50	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
39	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
41	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
40	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
36	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
37	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
38	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
70	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
71	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN
73	DIDHIIPPS-KIKD-----DSF-DNLVLKERTAN

図 5B

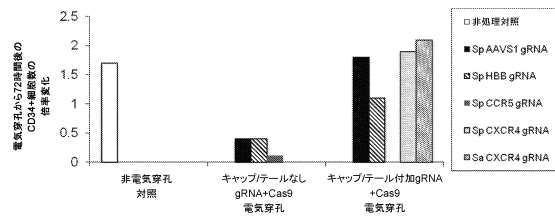
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【図 11】

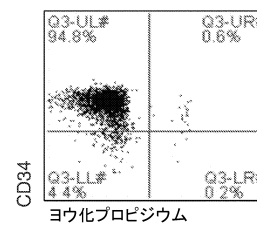


図10

図11

10

20

30

40

50

【図 1 2】

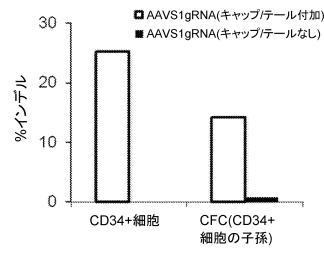


図12

【図 1 3】

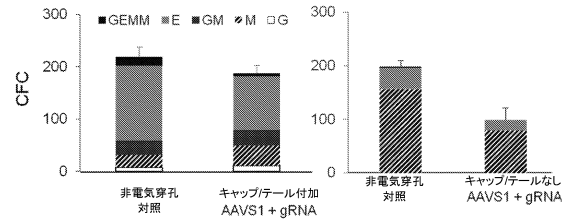


図13

10

【図 1 4 A】

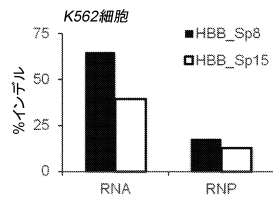


図14A

【図 1 4 B】

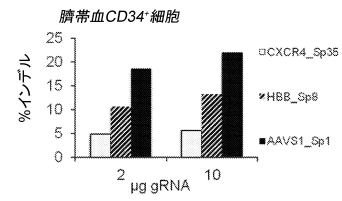


図14B

20

30

40

50

【図 1 4 C】

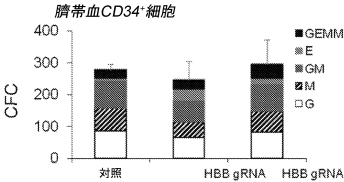


図14C

【図 1 5 A】

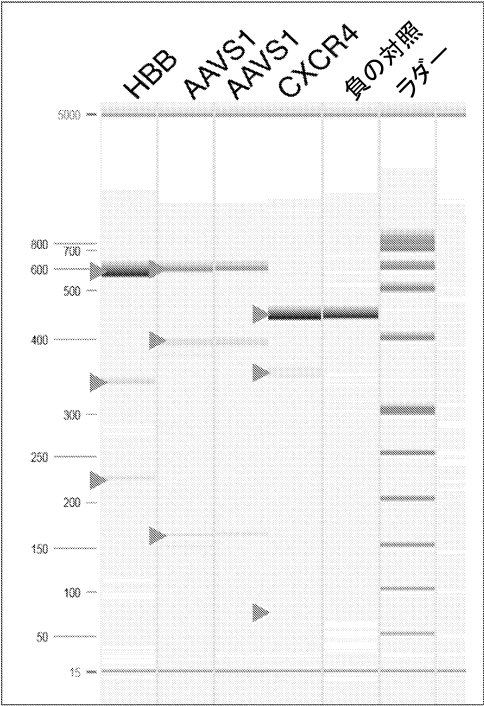


図15A

【図 1 5 B】

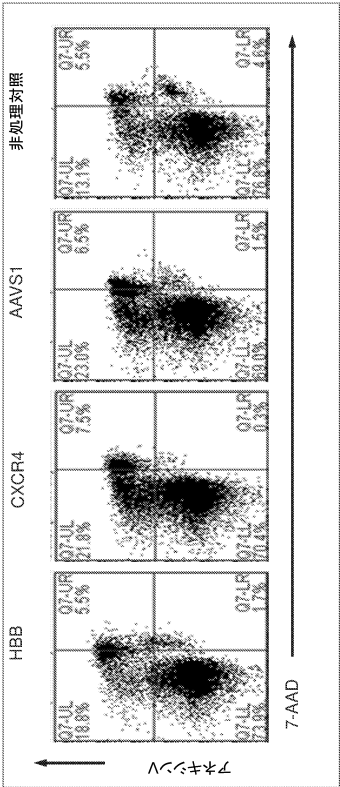


図15B

【図 1 6 A】

遺伝子	対立遺伝子		
	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1
ヨーロッパ系 アメリカ人 (白人多数) UCSFナース	A*29:02:01:01	B*44:03	DRB1*07:01
	A*02:01:01:01	B*08:01:0	DRB1*03:01
	A*01:01:01:01	B*08:01:01	DRB1*03:01
アフリカ系 アメリカ人 レンビント	A*29:02:01:01	B*44:03	DRB1*07:01

図16A

10

20

30

40

50

【図 1 6 B】

A*01:01:01:01 1098 bp (配列番号362)
ATGGCCGTCATGGGCGCCGAAACCCCTCCTCTGCTACTCTCTGGGGGCGCTGGCCCTGAGCC
CAGACCTGGGCGGCGCTCCGACCTCCATGAGGTATTTCTTACATCCGCTGTCCCGGCGCGGC
CGCGGGAGCCCCGCTTCATCGCGTGGGCTACGTGGACGACGAGTCTGTGGCTTC
GACAGGACGCGCGAGCGGAGATGGAGCGCGGCGCGCTGGATAGAGCAGAGGGG
CCGGATATTGGGACGAGAGACAGGAATATGAAGGCCCACTCAGAGTACCGGAGCG
AACCTGGGACCCCTCGCGGCTACTACAACAGAGGAGGAGCGTTCTCACACCATCCAG
ATAATGATGGCTCGAGCTGGGCGGAGCGGCGCTTCTCGCGGCTACCGCGAGGAC
GCCTACGAGCGGCAAGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGGCTTTGGACCGGGCG
GACATGGCAGCTCAGATCACAAAGCCAACTGGAGGCGGTCCATCGCGGAGCAGCGG
AGAGTCTACTGGAGGCGGCTGGTGGAGCGGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAAG
GAGACGCTGACGCGACGCGCCGCCAAGACACATATGACCCACCCACCCCTCTGTAC
CATGAGGCCACCTGAGTGTGGGCTTCTACCTGGGAGATCAGACTGACC
TGGCAGCGGGATGGGAGGACAGACCCAGGACACGAGCTCGTGGAGACGAGGCTGCA
TCTTCCAGCCACCATGCCATCGTGGGCATCATGTGGCTGTCTCTGGAGCTG
GTGATCACTGGAGCTGTGGCTGCGGTGATGTGGAGGAGGAGAGCTCAGATAGAAA
GGAGGAGTACACTCAGGCTGCAAGCAGTACAGTGCCAGGCTCTGATGTCTCTC
ACAGCTTGTAAAGTGTGA

図16B

【図 1 7 A】

遺伝子 →	対立遺伝子 ↓		
	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1
ヨーロッパ系 アメリカ人 (白色人種) UCBトナー	A*29:02:01:01	B*44:03	DRB1*07:01
	A*02:01:01:01	B*08:01:01	DRB1*03:01
	A*01:01:01:01	B*08:01:01	DRB1*03:01
ヒスパニック系 (プエルトリコ人) レシビエント	A*23:01:01	B*44:03	DRB1*07:01

図17A

10

20

【図 1 7 B】

A*23:01:01 1098 bp (配列番号363)
ATGGCCGTCATGGGCGCCGAAACCCCTCCTCTGCTACTCTCTGGGGGCGCTGGCCCTGAGCC
CAGACCTGGGCGGCGCTCCGACCTCCATGAGGTATTTCTTACATCCGCTGTCCCGGCGCGGC
CGCGGGAGCCCCGCTTCATCGCGTGGGCTACGTGGACGACGAGTCTGTGGCTTC
GACAGGACGCGCGAGCGGAGATGGAGCGCGGCGCGCTGGATAGAGCAGAGGGG
CCGGATATTGGGACGAGGAGACAGGAATATGAAGGCCCACTCAGAGTACCGGAGCG
AACCTGGGATCGGCTCCGCTACTACAACAGAGGAGGCGGTTCTCACACCATCCAG
ATGATGTTGGCTCGAGCTGGGCTGGAGCGGCGCTTCTCGCGGCTACCGAGTAC
GCCTACGAGCGGCAAGATTACATCGCCCTGAAGAGGACCTGGCTTTGGACCGGGCG
GACATGGGCGCTCAGATCACCAAGCCAACTGGAGGCGGCGCTTCTGGAGGAGCTTG
AGAGCTACTGGAGGCGAGTGGTGGAGCGGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAAG
GAGACGCTGAGGCGACGCGACCCGCCAAGACACATATGACCCACCCACCCCTCTGTAC
CATGAGGCCACTGAGATGCTGGGCGCTGGGCTTCTACCTGGGAGATCAGACTGACC
TGGCAGCGGGATGGGAGGACAGACCCAGGACACGAGCTTGTGGAGACGAGGCTGCA
GGGATGGAACTTCAGAAAGTGGGAGCTGTGGTGTACTTCTGGAGGAGCAGAGA
TACACCTGCCATGTGACGATGAGGCTGTGCCCAAGCCCTCACCTGAGATGGAGCGA
TCTTCCAGCCACCGCTCCACATCGTGGGCATCATGTGGCTGTCTCTGGAGCT
GTGATCACTGGAGCTGTGGCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAGACAGCTCAGATAGAAA
GGAGGAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTACAGTGCCAGGCTCTGATGTCTCTC
ACAGCTTGTAAAGTGTGA

図17B

【図 1 8 A】

遺伝子 →	対立遺伝子 ↓		
	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1
ヨーロッパ系 アメリカ人 (白色人種) UCBトナー	A*29:02:01:01	B*44:03	DRB1*07:01
	A*02:01:01:01	B*08:01:01	DRB1*03:01:01:01
	A*29:02:01:01	B*44:03	DRB1*03:01
ヒスパニック系(プエルトリコ人) レシビエント	A*03:01:01:01	B*07:02:01	DRB1*15:01:01:01

図18A

30

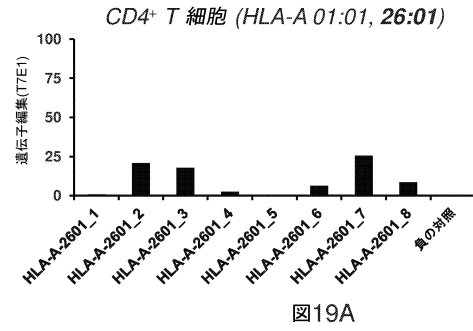
40

50

【図 18 B】

[illegible]

【図 19 A】



18B

10

20

【図 19 B】

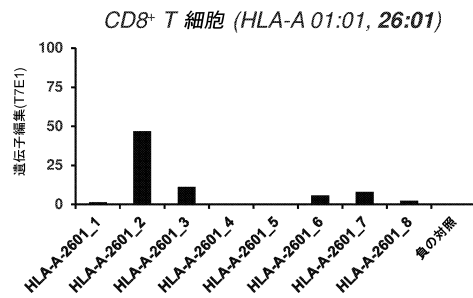


図19B

【図 20 A】

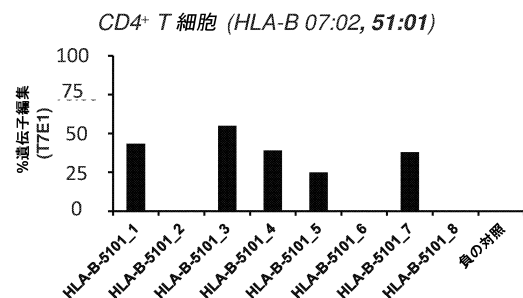


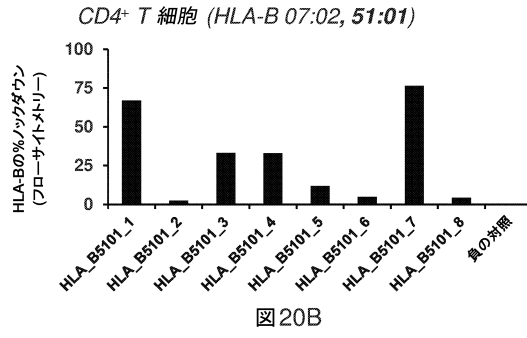
図 20A

30

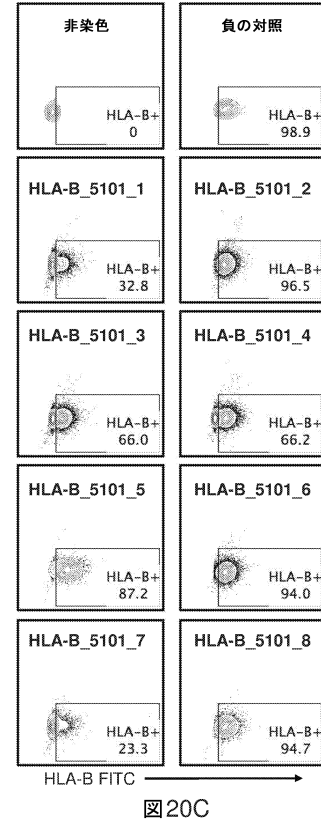
40

50

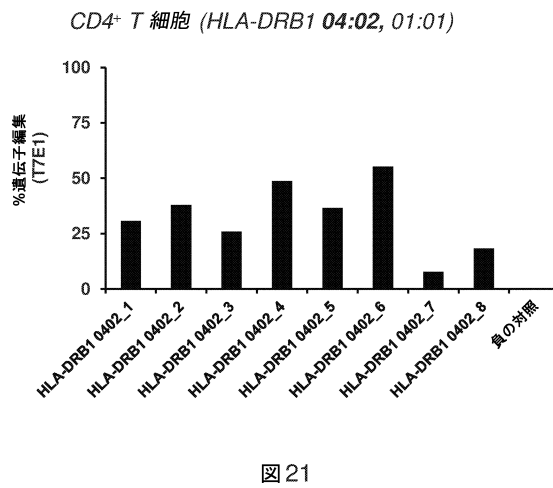
【図 20 B】



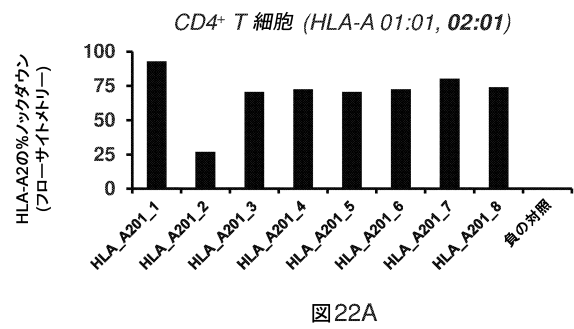
【図 20 C】



【図 2 1】



【図 2 2 A】



10

20

30

40

50

【図 2 2 B】

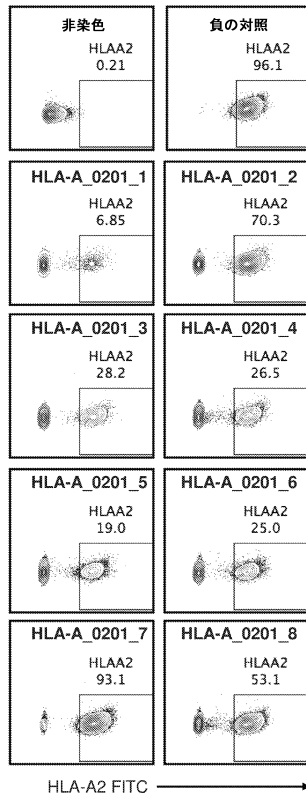


図 22B

【図 2 3】

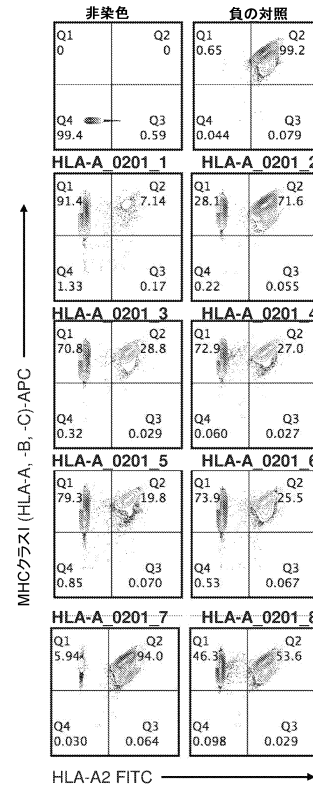


図 23

【図 2 4】

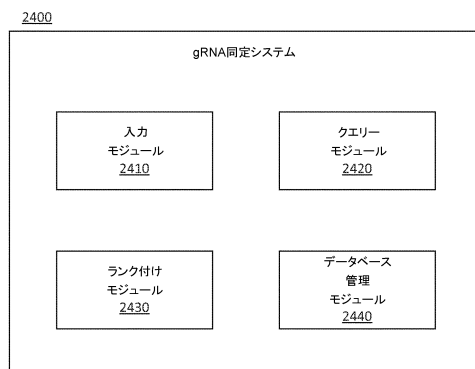


図 24

【図 2 5】

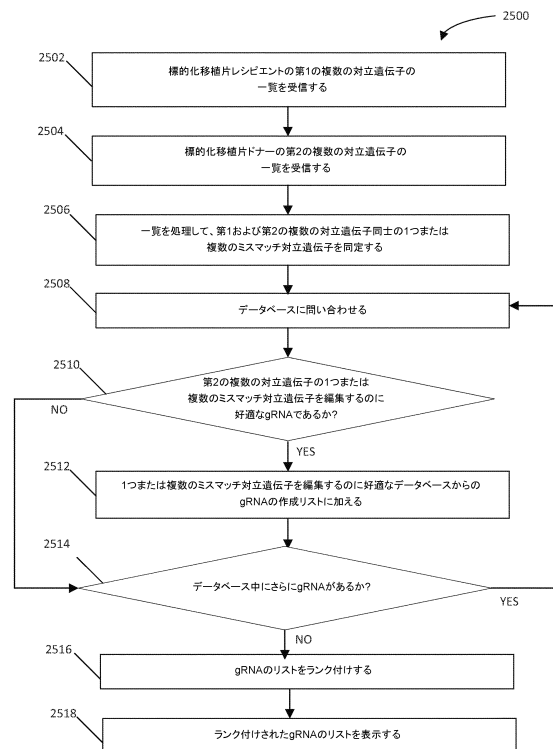


図 25

【図 26】

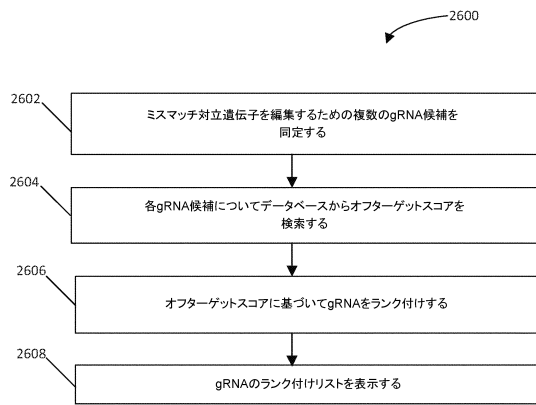


図26

【図 27 A】

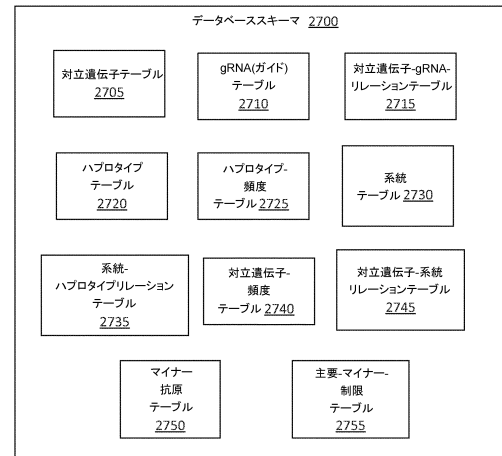
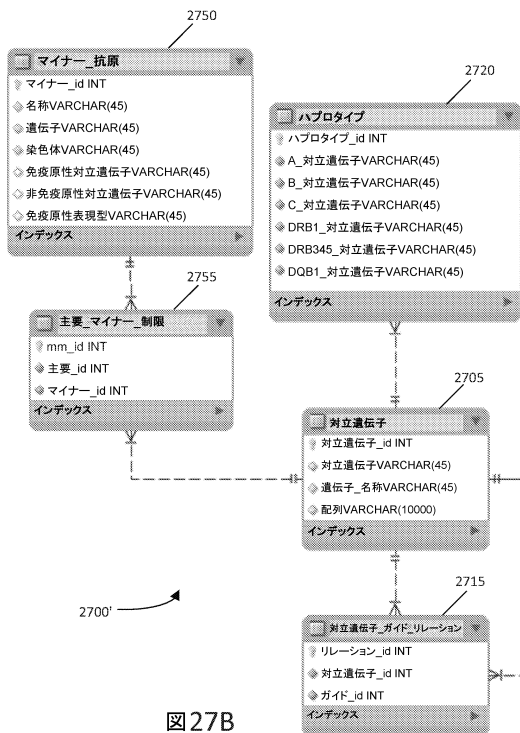


図27A

【図 27 B】



【図 27 C】

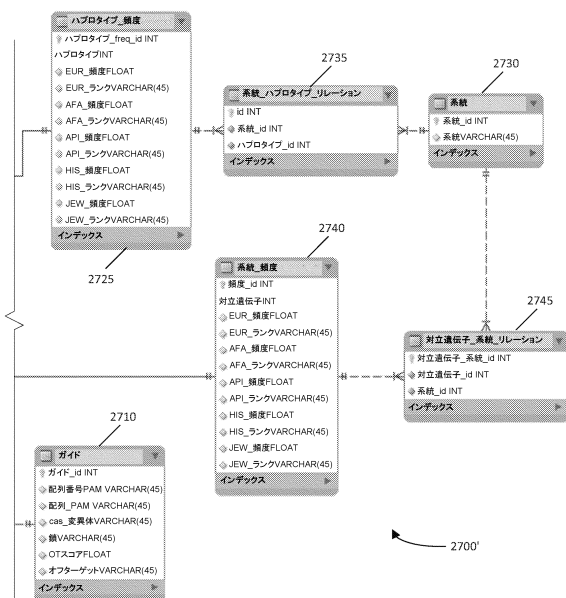


図27C

10

20

30

40

50

【図 28 A】

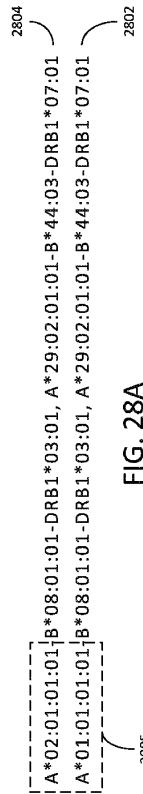


FIG. 28A

【図 28 B】

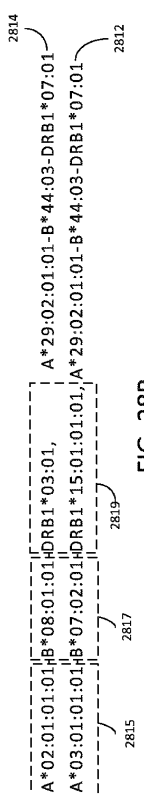


FIG. 28B

【図 28 C】

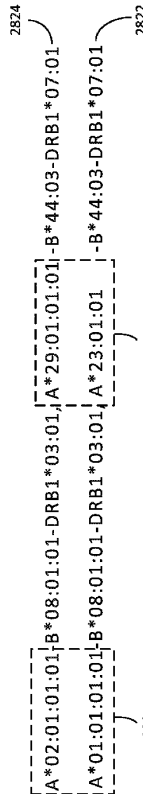


FIG. 28C

【図 29】

クエリー例/入力:
ドナー: A*02:01:01:01 - B*08:01:01 - DRB1*03:01:01:01,
A*29:02:01:01 - B*44:03:01 - DRB1*07:01:01:01
患者: A*01:01:01:01 - B*08:01:01 - DRB1*03:01:01:01,
A*23:01:01 - B*44:03:01 - DRB1*07:01:01:01

2900

2950

標的: A*02:01:01:01, A*29:02:01:01				
除外: B*44:03:01, B*08:01:01, DRB1*03:01:01:01, DRB1*07:01:01:01				
gRNA ID	gRNA配列	タイプ	鎖	OT-スコア
5313	GAGAGTAGCTCCCTCCTTTCTAT	sa24	-	49.39
10721	CAGGCTGCAAGCAGTGACAGTGCC	sa24	+	215.18
84971	GGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGGC	sa24	-	1343.83
22084	AGGAAGAGCTCAGATAGAAAAGGA	sa24	+	2806.08
85367	GCACTGTCACTGCTTGCAAG	sa20	-	19300
23351	TGTGAGAACCGCCTCGCTC	spy20	-	112250
59952	CTGCAAGCAGTGACAGTGCC	sa20	+	146450
8253	TGCAAGCAGTGACAGTGCCC	spy20	+	167650
36332	GAAGAGCTCAGATAGAAAAG	sa20	+	296400
22286	AGGAAGAGCTCAGATAGAAA	sa20	+	424800
51658	GAGCCCGCCAGGTCTGGGT	sa20	-	546350
30580	AAGAGCTCAGATAGAAAAGG	spy20	+	852200
100025	GCAAGCAGTGACAGTGCCCA	spy20	+	1281550
38840	GAGAACCGGCCTCGCTC	spy17	-	7263000
83009	GCCCGCCAGGTCTGGGTCA	spy20	-	43085400

2905 2915 2920 2910

図 29

10

20

30

40

50

【図 30】

[illegible]

☒ 30

【図 3 1 A】

	A	B	DRB1	EUR_頻度	EUR_ランク	AFA_頻度	AFA_ランク	API_頻度	API_ランク	HIS_頻度	HIS_ランク
0201g	4403	0301	0.00029	542	0.00000	NA	0.00000	NA	0.00000	NA	
2902	4403	0301	0.00007	1405	0.00000	NA	0.00000	NA	0.00078	232	

图 31A

【図 3 1 B】

対立遺伝子	EUR_頻度	EUR_ランク	AFA_頻度	AFA_ランク	API_頻度	API_ランク	HIS_頻度	HIS_ランク
A*0201g	0.29604	1	0.12458	1	0.09458	3	0.19403	1
A*2802	0.03279	6	0.03640	12	0.00141	30	0.04167	8
B*4403	0.04963	7	0.05373	6	0.04244	6	0.06078	2
DRB1*0301	0.12916	3	0.07069	4	0.05373	7	0.07329	2

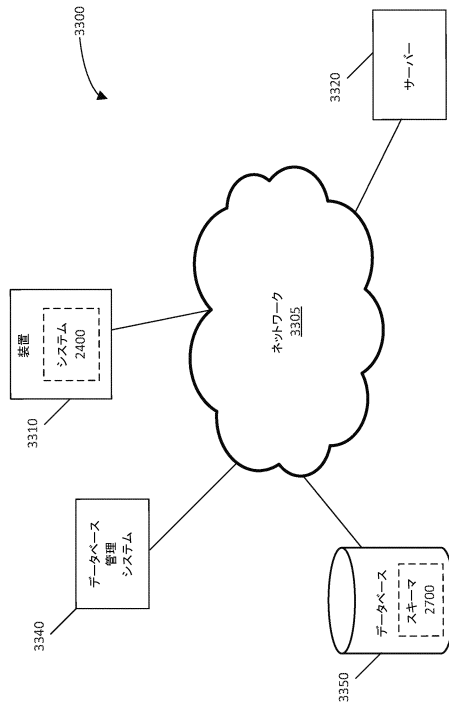
31B

【図 3 2】

HLA制限	マイナーH抗原
HLA-A*01	HA-3
HLA-A*02	HA-1/A2
HLA-A*02	HA-2
HLA-A*02	HA-8
HLA-A*02	HER2
HLA-A*02	LB-ADIR-1
HLA-A*02	LB-NISCH-A1
HLA-A*02	LB-PRCP-1Db
HLA-A*02	LB-SSR1-1S
HLA-A*02	LB-WNK1-1I
HLA-A*02	T4A
HLA-A*02	TRIM22c
HLA-A*02	UGT2B17d
HLA-A*02	UT2A-1
HLA-A*23	NA
HLA-A*29	P2RX7
HLA-A*29	UGT2B17d

図32

【図 3 3】



【図 3 4】

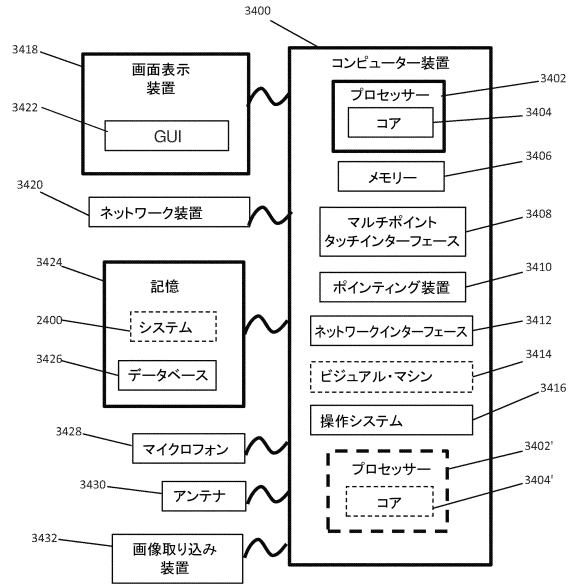


図 33

図 34

【配列表】

0007396783000001.app

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 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/173,321

(32)優先日 平成27年6月9日(2015.6.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

1 4 8, マルティン, サマー ストリート 1 0, アパートメント 3 0 9

(72)発明者 ジャヤラム, ハリハラン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, レイモンド ストリート 1 8
4, ナンバー 4

(72)発明者 オドネル, ペンローズ

アメリカ合衆国 メイン 0 4 0 9 6, ヤーマス, リトルジョン ロード 3 1 4

合議体

審判長 上條 肇

審判官 藤井 美穂

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第2014/165177 (WO, A1)

国際公開第2014/186585 (WO, A2)

Blood, 2013年, vol. 122, no. 8, p. 1341-1349

小川 公明, Major Histocompatibility Complex, 20
16年, 23 (3), pp. 185-192

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)