(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-529899
(P2024-529899A)
(43)公表日　令和6年8月14日(2024.8.14)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ ＺＮＡ	４Ｃ０７６
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/864 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/864	１００Ｚ	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*19/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*19/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/06		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全217頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-502462(P2024-502462)
(86)(22)出願日　令和4年7月18日(2022.7.18)
(85)翻訳文提出日　令和6年3月15日(2024.3.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/037490
(87)国際公開番号　WO2023/288135
(87)国際公開日　令和5年1月19日(2023.1.19)
(31)優先権主張番号　63/222,972
(32)優先日　令和3年7月17日(2021.7.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/300,822
(32)優先日　令和4年1月19日(2022.1.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/US2021/042100
最終頁に続く

(71)出願人　523014795
オーソバイオ・セラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国コロラド州８１６５７，ベール，ノース・フロンテージ・ロード・ウエスト １３００，ボックス ５９３７
(71)出願人　524019553
ジョージ・ゲンチュ
英国 シービー４・１ユーエイ ケンブリッジ，レンツ・ウェイ １２
(74)代理人　100118902
弁理士　山本 修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前 徹
(74)代理人　100196508
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　関節機能を改善する遺伝子編集

(57)【要約】
本開示は、炎症成分によって特徴付けられる関節障害を治療するための組成物及び方法を提供する。いくつかの態様では、組成物及び方法は、変形性関節炎及び他の関節炎の進行を予防し、哺乳動物関節における変形性関節炎及び他の関節炎を治療するためのものである。
【選択図】図３３Ｃ

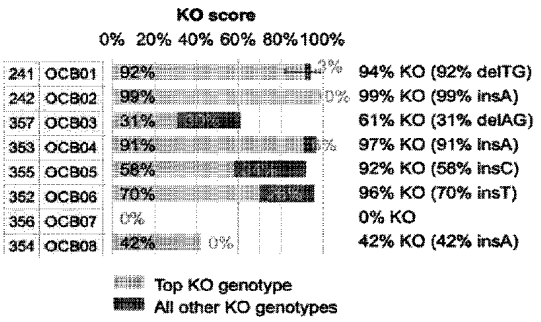


FIG. 33C

【特許請求の範囲】
【請求項１】
関節の疾患又は状態の治療又は予防のための組成物であって、
（ｉ）ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又はＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸と、
（ｉｉ）ＩＬ－１α若しくはＩＬ－１β遺伝子を標的とする少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする核酸であって、前記ガイドＲＮＡが、Ｃａｓ９タンパク質のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列に隣接している標的配列に特異的に結合する、少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする核酸と、を含む、組成物。
【請求項２】
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とする、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
少なくとも１つのガイドが、前記ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６を標的とする、請求項２に記載の組成物。
【請求項４】
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、配列番号１６８～１８７、２９８～３８７、及び６８１～７１０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９５％の同一性、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む、請求項２に記載の組成物。
【請求項５】
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とする、請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
少なくとも１つのガイドが、前記ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６を標的とする、請求項５に記載の組成物。
【請求項７】
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９５％の同一性、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む、請求項５に記載の組成物。
【請求項８】
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とする、請求項１に記載の組成物。
【請求項９】
少なくとも１つのガイドが、前記イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６を標的とする、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、配列番号２０２～２１６、５５２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９５％の同一性、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む、請求項８に記載の組成物。
【請求項１１】
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とする、請求項１に記載の組成物。
【請求項１２】
前記少なくとも１つのガイドが、前記イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６を標的とする、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】

前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９５％の同一性、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む、請求項１１に記載の組成物。

【請求項１４】

前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、ウマＩＬ－１α遺伝子を標的とする、請求項１に記載の組成物。

【請求項１５】

前記少なくとも１つのガイドが、前記ウマＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６を標的とする、請求項１４に記載の組成物。

【請求項１６】

前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、配列番号２３６～２５５及び８０１～８３０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９５％の同一性、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む、請求項１４に記載の医薬組成物。

【請求項１７】

前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、ウマＩＬ－１β遺伝子を標的とする、請求項１に記載の組成物。

【請求項１８】

前記少なくとも１つのガイドが、前記ウマＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６を標的とする、請求項１７に記載の組成物。

【請求項１９】

前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、配列番号２５６～２６２及び８３１～８６０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９５％の同一性、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む、請求項１７に記載の医薬組成物。

【請求項２０】

前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、ネコＩＬ－１α遺伝子を標的とする、請求項１に記載の組成物。

【請求項２１】

前記少なくとも１つのガイドが、前記ネコＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６を標的とする、請求項２０に記載の組成物。

【請求項２２】

前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、配列番号８６１～８９０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９５％の同一性、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む、請求項２０に記載の医薬組成物。

【請求項２３】

前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、ネコＩＬ－１β遺伝子を標的とする、請求項１に記載の組成物。

【請求項２４】

前記少なくとも１つのガイドが、前記ネコＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６を標的とする、請求項２３に記載の組成物。

【請求項２５】

前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、配列番号８９１～９２０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９５％の同一性、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む、請求項２３に記載の組成物。

【請求項２６】

前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼが、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９（Ｃａｓ９）タンパ

ク質である、請求項１～２５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２７】
前記Ｃａｓ９タンパク質が、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質である、請求項２６に記載の組成物。
【請求項２８】
前記Ｃａｓ９タンパク質が、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９タンパク質である、請求項２６に記載の組成物。
【請求項２９】
前記Ｃａｓ９タンパク質が、増強された特異性Ｃａｓ９バリアントタンパク質である、請求項２６～２８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０】
前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又はＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸が、前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼである、請求項１～２９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１】
前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又はＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸が、前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードするＤＮＡである、請求項１～２９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３２】
前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又はＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸が、前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡである、請求項１～２９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３３】
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は少なく１つのガイドＲＮＡをコードする核酸が、前記少なくとも１つのガイドＲＮＡである、請求項１～３２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３４】
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は少なく１つのガイドＲＮＡをコードする核酸が、前記少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードするＤＮＡである、請求項１～３２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５】
前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼ及び前記少なくとも１つのガイドＲＮＡの両方をコードする核酸を含む、請求項１～３４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３６】
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡが、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、請求項１～３５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３７】
前記組成物が、
（ｉ）前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又は前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする前記核酸と、
（ｉｉ）前記少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は前記少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする前記核酸と、を集合的に封入する１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含む、請求項１～３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３８】
前記１つ以上のＬＮＰが、
前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又はＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸を封入する第１の複数のＬＮＰと、
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする核酸を封入する第２の複数のＬＮＰと、を含む、請求項３７に記載の組成物。
【請求項３９】
前記１つ以上のＬＮＰが、３－（ジドデシルアミノ）－Ｎ１，Ｎ１，４－トリドデシル

－１－ピペラジンエタンアミン（ＫＬ１０）、Ｎ１－［２－（ジドデシルアミノ）エチル］－Ｎ１，Ｎ４，Ｎ４－トリドデシル－１，４－ピペラジンジエタンアミン（ＫＬ２２）、１４，２５－ジトリデシル－１５，１８，２１，２４－テトラアザ－オクタトリアコンタン（ＫＬ２５）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）、２－（｛８－［（３．ベータ．）－コレスト－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ）、（２Ｒ）－２－（｛８－［（３．ベータ．）－コレスト－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ－，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｒ））、（２Ｓ）－２－（｛８－［（３．ベータ）－コレスト－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ－，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｓ））、環状アミン基を含む脂質、及びそれらの混合物からなる群から選択される構成要素を含む、請求項３７又は３８に記載の組成物。

【請求項４０】

前記ＬＮＰが、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＬＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジウンデカノイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＵＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）、１，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０のジエーテルＰＣ）、１－オレオイル－２－コレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＯＣｈｅｍｓＰＣ）、１－ヘキサデシル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（Ｃ１６　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＭＥ１６．０　ＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）ナトリウム塩（ＤＯＰＧ）、スフィンゴミエリン（ＳＭ）、及びそれらの混合物からなる群から選択される構成成分を含む、請求項３７～３９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項４１】

前記ＬＮＰが、ＰＥＧ修飾ホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ修飾ホスファチジン酸、ＰＥＧ修飾セラミド、ＰＥＧ修飾ジアルキルアミン、ＰＥＧ修飾ジアシルグリセロール、ＰＥＧ修飾ジアルキルグリセロール、及びそれらの混合物からなる群から選択される構成成分を含む、請求項３７～４０のいずれか一項に記載の組成物。例えば、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ＤＬＰＥ、ＰＥＧ－ＤＭＰＥ、ＰＥＧ－ＤＰＰＣ、ＰＥＧ－ＤＭＡ、ＰＥＧ－ＤＳＰＥ脂質、及びそれらの混合物であっ

てもよい。
【請求項４２】
前記ＬＮＰが、コレステロール、フェコステロール、スチグマステロール、スチグマスタノール、シトステロール、β－シトステロール、ルペオール、ベツリン、ウルソール酸、オレアノール酸、カンペステロール、フコステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール、９，１１－デヒドロエルゴステロール、トマチジン、トマチン、α－トコフェロール、及びそれらの混合物からなる群から選択される構成要素を含む、請求項３７～４１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４３】
前記組成物が、
（ｉ）前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又は前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする前記核酸と、
（ｉｉ）前記少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は前記少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする前記核酸と、を集合的に封入する１つ以上のリポソームを含む、請求項１～３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４４】
前記１つ以上のリポソームが、
前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又はＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸を封入する第１の複数のリポソームと、
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする核酸を封入する第２の複数のリポソームと、を含む、請求項４３に記載の組成物。
【請求項４５】
前記組成物が、
（ｉ）前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又は前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする前記核酸と、
（ｉｉ）前記少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は前記少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする前記核酸と、を集合的に封入する１つ以上の組換えウイルスを含む、請求項１～３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４６】
前記１つ以上の組換えウイルスが、
前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又はＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸を封入する第１の複数の組換えウイルスと、
前記少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする核酸を封入する第２の複数の組換えウイルスと、を含む、請求項４５に記載の組成物。
【請求項４７】
前記１つ以上の組換えウイルスが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、及び単純ヘルペスウイルス－１から選択される、請求項４５又は４６に記載の組成物。
【請求項４８】
前記１つ以上のウイルスベクターが、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を含む、請求項４５又は４６に記載の組成物。
【請求項４９】
前記組換えＡＡＶが、血清型５（ＡＡＶ５）のものである、請求項４８に記載の組成物。
【請求項５０】
前記組換えＡＡＶが、血清型６（ＡＡＶ６）のものである、請求項４８に記載の組成物。
【請求項５１】
前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又は前記ＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする前記核酸及び前記少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は前記少なくとも１つのガイドＲＮＡをコー

ドする前記核酸が、封入されていない、請求項１～３６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５２】
前記組成物が、非経口投与のために製剤化される、請求項１～５１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５３】
前記組成物が、対象の関節内の関節内注射のために製剤化される、請求項１～５１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５４】
関節の疾患又は状態を治療する方法であって、
それを必要とする対象に、請求項１～５３のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含む、方法。
【請求項５５】
前記関節の疾患又は状態が、関節炎である、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記関節炎が、変形性関節炎である、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記関節の疾患又は障害が、外傷後関節炎、痛風、又は偽痛風である、請求項５４に記載の方法。
【請求項５８】
前記対象が、ヒトである、請求項５４～５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９】
前記対象が、イヌ、ウマ、又はネコである、請求項５４～５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
前記関節の疾患又は障害が、イヌ、ウマ、又はネコの跛行である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
前記投与することが、前記対象の関節への前記組成物の関節内注射を含む、請求項５４～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
前記組成物が、外科手術中に投与される、請求項５４～６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
前記組成物が、外科手術後に投与される、請求項５４～６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４】
前記組成物が、徐放性医薬組成物である、請求項５４～６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５】
関節の疾患又は障害の治療に使用するための、請求項１～５３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６６】
前記関節の疾患又は障害が、関節炎である、請求項６５に記載の組成物。
【請求項６７】
前記関節炎が、変形性関節炎である、請求項６６に記載の組成物。
【請求項６８】
前記関節の疾患又は障害が、外傷後関節炎、痛風、又は偽痛風である、請求項６５に記載の組成物。
【請求項６９】
前記関節の疾患又は障害が、イヌ、ウマ、又はネコの跛行である、請求項６５に記載の

組成物。
【請求項７０】
関節の疾患又は障害の治療するための薬剤の製造における、請求項１～５３のいずれか一項に記載の組成物の使用。
【請求項７１】
前記関節の疾患又は障害が、関節炎である、請求項７０に記載の使用。
【請求項７２】
前記関節炎が、変形性関節炎である、請求項７１に記載の使用。
【請求項７３】
前記関節の疾患又は障害が、外傷後関節炎、痛風、又は偽痛風である、請求項７０に記載の使用。
【請求項７４】
前記関節の疾患又は障害が、イヌ、ウマ、又はネコの跛行である、請求項７０に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年７月１７日出願の米国仮特許出願第６３／２２２，９７２号、２０２２年１月１９日出願の米国仮特許出願第６３／３００，８２２号、２０２２年４月１日出願の米国仮特許出願第６３／３２６，５７１号、及び２０２１年７月１６日出願の国際出願第２０２２／０１６１２１号に対する優先権を主張するものであり、それらの内容は、参照によりそれらの全体が全ての目的のために本明細書に組み込まれる。
【０００２】
滑膜関節機能障害を治療するための組成物及び方法が本明細書に説明される。加えて、変形性関節炎などの疾患の治療における、滑膜細胞並びに／又は滑膜細胞、軟骨細胞、滑膜マクロファージ、及び滑膜線維芽細胞を遺伝子編集するための方法と、遺伝子編集された滑膜細胞並びに／又は滑膜細胞、軟骨細胞、滑膜マクロファージ、及び滑膜線維芽細胞の使用が本明細書に開示される。
【背景技術】
【０００３】
変形性関節炎、変形性関節疾患、及び他の関節機能障害の治療は複雑であり、症候性緩和又は関節機能回復のための長期的な選択肢はほとんど存在しない。変形性関節炎（ＯＡ）は、疼痛に起因する障害の主な原因である。Ｎｅｏｇｉ，Ｏｓｔｅｏａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｃａｒｔｉｌａｇｅ　２０１３；２１：１１４５－５３。全ての哺乳動物種が影響を受けている：使役動物、家畜、及びそれらの所有者は、全て、疾患進行の程度に応じて、ＯＡ関連の不快感、疼痛、及び障害に苦しむ。
【０００４】
ＯＡは、進行性の障害の経過によって特徴付けられる複雑な疾患である。全身性炎症は、ＯＡ及びＯＡ疾患進行と関連付けられている。炎症は、増加した炎症誘発性サイトカインのレベルによって引き起こされる。この疾患を治療するための新しい方法及び組成物が、緊急に必要とされている。本明細書では、ＯＡ並びに他の炎症性関節障害の治療に有用な組成物及び方法が開示される。
【発明の概要】
【０００５】
本開示は、炎症成分によって特徴付けられる関節障害を治療するための組成物及び方法を提供する。いくつかの態様では、組成物及び方法は、変形性関節炎及び他の関節炎の進行を予防し、哺乳動物関節における変形性関節炎及び他の関節炎を治療するためのものである。例示的な実施形態によると、関節滑膜細胞及び／又は滑膜細胞、軟骨細胞、滑膜マクロファージ、又は滑膜線維芽細胞の少なくとも一部分は、炎症性サイトカインの発現を

減少させるために遺伝子編集される。いくつかの態様では、関節滑膜細胞及び／又は滑膜細胞、軟骨細胞、滑膜マクロファージ、若しくは滑膜線維芽細胞の少なくとも一部分が、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、又はＩＬ－１α、ＩＬ－１βの両方の発現を低減するように遺伝子編集される。

【０００６】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集が、哺乳動物関節を含む細胞の少なくとも一部分において、１つ以上のサイトカイン及び／又は成長因子遺伝子の発現をサイレンシング又は低減させる。いくつかの態様では、細胞が、滑膜細胞である。いくつかの態様では、細胞が、滑膜線維芽細胞である。いくつかの態様では、細胞が、滑膜細胞である。いくつかの態様では、細胞が、軟骨細胞である。いくつかの態様では、細胞が、滑膜マクロファージである。

【０００７】

いくつかの実施形態では、１つ以上のサイトカイン及び／又は成長因子遺伝子は、ＩＬ－１α及びＩＬ－１βを含む群から選択される。

【０００８】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、１つ以上のサイトカイン及び／又は成長因子遺伝子で二本鎖又は一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能ヌクレアーゼの使用を含む。

【０００９】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ジンクフィンガー法、及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を含む。

【００１０】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ法を含む。

【００１１】

いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ法が、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９法である。

【００１２】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＴＡＬＥ法を含む。

【００１３】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ジンクフィンガー法を含む。

【００１４】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、関節を含む細胞の少なくとも一部分において、１つ以上のサイトカイン及び／又は成長因子遺伝子の発現をサイレンシング又は低減させる。いくつかの実施形態では、編集された細胞の部分は、滑膜細胞である。一態様では、編集された細胞の部分は、滑膜線維芽細胞である。いくつかの実施形態では、編集された細胞の部分は、滑膜細胞である。いくつかの実施形態では、編集された細胞の部分は、軟骨細胞である。いくつかの実施形態では、編集された細胞の部分は、滑膜マクロファージである。

【００１５】

いくつかの実施形態では、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）送達システムは、遺伝子編集システムを送達するために使用される。いくつかの実施形態では、ＡＡＶ送達システムは、関節内に注射される。

【００１６】

本開示のいくつかの態様は、遺伝子編集システム及び薬学的に許容される担体を含む関節の疾患又は状態の治療又は予防のための医薬組成物を提供する。一態様では、遺伝子編集システムは、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ＩＬ－６、ＩＬ－８、及びＩＬ－１８からなる群から選択される１つ以上の遺伝子座を標的とする１つ以上の核酸を含む。

【００１７】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムは、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又はＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸、及びＩＬ－１α若しくはＩＬ－１β遺伝子を標的とする少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする

核酸を含む、関節の疾患又は状態の治療又は予防のための組成物を含み、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓ９タンパク質のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列に隣接する標的配列に特異的に結合する。

【００１８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１αを標的とし、配列番号１６８～１８７、２９８～３８７、及び６８１～７１０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。

【００１９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。

【００２０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号２０２～２１６、５５２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。

【００２１】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、又は１００％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムは、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又はＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸、及び少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする核酸を集合的に含む、１つ以上の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含む。

【００２３】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、ＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸を封入する第１の核酸を含む第１の複数のＬＮＰと、少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする核酸を封入する第２の核酸を含む第２の複数のＬＮＰとを含む。

【００２４】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、ＲＮＡガイドヌクレアーゼを封入する第１の複数のＬＮＰと、少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする核酸を封入する第２の核酸を含む第２の複数のＬＮＰとを含む。

【００２５】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、単一の核酸を含み、単一の核酸は、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ及び少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする。

【００２６】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムは、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ又はＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸、及び少なくとも１つのガイドＲＮＡ又は少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする核酸を集合的に含む、１つ以上のリポソームを含む。

【００２７】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドヌクレアーゼをコードする核酸及び／又は少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする核酸は、裸状態で存在する。

【００２８】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムにおけるＲＮＡガイドヌクレアーゼは、Ｃａｓ９タンパク質である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、ｓｐＣａ

ｓ９である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、ｅｓｐＣａｓ９である。他の実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、ｓａＣａｓ９である。

【００２９】

実施形態は、イヌの跛行を治療する方法を提供し、方法は、遺伝子編集組成物を投与することを含み、組成物は、ＩＬ－１α及びＩＬ－１βの発現を、跛行関節の滑膜細胞、軟骨細胞、滑膜マクロファージ、又は滑膜線維芽細胞の一部分においてサイレンシング又は低減させる。

【００３０】

一実施形態は、関節の疾患又は状態を治療することを必要とする対象においてそれを行うための方法を提供する。いくつかの実施形態では、関節の疾患又は状態は、関節炎である。いくつかの実施形態では、関節の疾患又は状態は、変形性関節炎である。

【００３１】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集組成物は、非経口投与のために製剤化される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集組成物は、対象の関節内の関節内注射のために製剤化される。

【００３２】

いくつかの実施形態では、上記の方法は、本明細書に記載される方法及び組成物のいずれかに列挙された１つ以上の特徴を更に含む。

【図面の簡単な説明】

【００３３】

本開示の実施形態は、添付図面を参照して更に説明される。示される図面は、必ずしも縮尺どおりではなく、その代わりに、概して、本開示の実施形態の原理を例示することに重点を置く。

【００３４】

【図１Ａ】０．５μｇのＳｐｙＣａｓ９（ＴｒｕｅＣｕｔ（商標）Ｃａｓ９タンパク質ｖ２、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって切断された、Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ　Ｉｌ１ａ及びＩｌ１ｂ遺伝子に対して設計された１００ｎｇのマウスＤＮＡ（ｇＢｌｏｃｋｓ、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、並びにＩｌ１ａ遺伝子（＃４３～４６）及びＩｌ１ｂ遺伝子（＃４７～５０）に対して標的化された２００ｎｇのホスホロチオエート修飾されたシングルガイド（ｓｇ）ＲＮＡのインビトロにおけるアガロースゲル電気泳動分析を例示する。

【図１Ｂ】０．５μｇのＳａｕＣａｓ９（ＧｅｎｅＳｎｉｐｐｅｒ（商標）Ｃａｓ９、ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ）によって切断された、Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ　Ｉｌ１ａ及びＩｌ１ｂ遺伝子に対して設計された１００ｎｇのマウスＤＮＡ（ｇＢｌｏｃｋｓ、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、並びにＩｌ１ａ遺伝子（＃５１～５３）及びＩＬ１ｂ遺伝子（＃５４～５６）に対する２００ｎｇのホスホロチオエート修飾されたガイドｓｇＲＮＡのアガロースゲル電気泳動分析を例示する。

【図２Ａ】Ｊ７７４．２（「Ｊ」）及びＮＩＨ３Ｔ３（「Ｎ」）細胞のガイドＲＮＡの範囲で使用されるＳｐｙＣａｓ９及びＳａｕＣａｓ９の編集効率を表示するグラフを集合的に例示し、図２Ａは、２つの細胞株ＮＩＨ　３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で４×ｓｇＲＮＡ（ＳｐｙＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ａのインビボ切断であり、図２Ｂは、２つの細胞株ＮＩＨ３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で４×ｓｇＲＮＡ（ＳｐｙＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ｂのインビボ切断であり、図２Ｃは、２つの細胞株ＮＩＨ　３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で３×ｓｇＲＮＡ（ＳａＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ａのインビボ切断であり、編集効率は、各プールのＳａｎｇｅｒシーケンシングトレース（ＩＣＥツール、Ｓｙｎｔｈｅｇｏ）の逆畳み込みを使用して決定される。

【図２Ｂ】Ｊ７７４．２（「Ｊ」）及びＮＩＨ３Ｔ３（「Ｎ」）細胞のガイドＲＮＡの範

囲で使用されるＳｐｙＣａｓ９及びＳａｕＣａｓ９の編集効率を表示するグラフを集合的に例示し、図２Ａは、２つの細胞株ＮＩＨ　３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で４×ｓｇＲＮＡ（ＳｐｙＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ａのインビボ切断であり、図２Ｂは、２つの細胞株ＮＩＨ３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で４×ｓｇＲＮＡ（ＳｐｙＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ｂのインビボ切断であり、図２Ｃは、２つの細胞株ＮＩＨ　３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で３×ｓｇＲＮＡ（ＳａＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ａのインビボ切断であり、編集効率は、各プールのＳａｎｇｅｒシーケンシングトレース（ＩＣＥツール、Ｓｙｎｔｈｅｇｏ）の逆畳み込みを使用して決定される。

【図２Ｃ】Ｊ７７４．２（「Ｊ」）及びＮＩＨ３Ｔ３（「Ｎ」）細胞のガイドＲＮＡの範囲で使用されるＳｐｙＣａｓ９及びＳａｕＣａｓ９の編集効率を表示するグラフを集合的に例示し、図２Ａは、２つの細胞株ＮＩＨ　３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で４×ｓｇＲＮＡ（ＳｐｙＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ａのインビボ切断であり、図２Ｂは、２つの細胞株ＮＩＨ３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で４×ｓｇＲＮＡ（ＳｐｙＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ｂのインビボ切断であり、図２Ｃは、２つの細胞株ＮＩＨ　３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で３×ｓｇＲＮＡ（ＳａＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ａのインビボ切断であり、編集効率は、各プールのＳａｎｇｅｒシーケンシングトレース（ＩＣＥツール、Ｓｙｎｔｈｅｇｏ）の逆畳み込みを使用して決定される。

【図２Ｄ】Ｊ７７４．２（「Ｊ」）及びＮＩＨ３Ｔ３（「Ｎ」）細胞のガイドＲＮＡの範囲で使用されるＳｐｙＣａｓ９及びＳａｕＣａｓ９の編集効率を表示するグラフを集合的に例示し、図２Ａは、２つの細胞株ＮＩＨ　３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で４×ｓｇＲＮＡ（ＳｐｙＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ａのインビボ切断であり、図２Ｂは、２つの細胞株ＮＩＨ３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で４×ｓｇＲＮＡ（ＳｐｙＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ｂのインビボ切断であり、図２Ｃは、２つの細胞株ＮＩＨ　３Ｔ３（「Ｎ」）及びＪ７７４．２（「Ｊ」）にわたる、２つの別個のプール（Ｐｏｏｌ１及び２）で３×ｓｇＲＮＡ（ＳａＣａｓ９）を用いて編集されたＩｌ１ａのインビボ切断であり、編集効率は、各プールのＳａｎｇｅｒシーケンシングトレース（ＩＣＥツール、Ｓｙｎｔｈｅｇｏ）の逆畳み込みを使用して決定される。

【図３】ＩＶＩＳシステムを使用して測定されたＧＦＰ発現を例示する。フラックス値は、動物の注射された膝関節を中心とする関心対象の領域に基づいていた。データは、群当たり４つの標本の平均（ＳＤ）として提示される。

【図４】本開示の実施例５に説明される研究の設計を例示する。

【図５】本開示の実施例５に説明される研究で取得された生存転帰測定値を例示する。

【図６】本開示の実施例５に説明される研究において、ＰＢＳ、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－６、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－６、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－５、又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－５の関節内（ＩＡ）注射で処理されたマウスの体重変化を例示する。

【図７Ａ】本開示の実施例５に説明される研究において、ＰＢＳ、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－６、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－６、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－５、又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－５の関節内（ＩＡ）注射で処理されたマウスにおける（Ａ）経時的なマウス関節のベースラインからの膝キャリパー測定値の変化、及び（Ｂ）ＡＵＣによる足首キャリパー測定値の平均差を集合的に例示する。

【図７Ｂ】本開示の実施例５に説明される研究において、ＰＢＳ、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－６、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－６、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－５、又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－５の関節内（ＩＡ）注射で処理されたマウスにおける（Ａ）経時的なマウス関節のベースラインからの膝キャリパー測定値の変化、及び（Ｂ）ＡＵＣによる足首キャリパー測定値の平均差を集合的に例示する。

【図８Ａ】本開示の実施例５に説明される研究において、ＰＢＳ、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－６、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－６、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－５、又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－５の関節内（ＩＡ）注射で処理されたマウスから取得された（Ａ）ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ測定値の変化、及び（Ｂ）ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ測定値の平均絶対閾値を集合的に例示する。

【図８Ｂ】本開示の実施例５に説明される研究において、ＰＢＳ、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－６、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－６、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－５、又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－５の関節内（ＩＡ）注射で処理されたマウスから取得された（Ａ）ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ測定値の変化、及び（Ｂ）ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ測定値の平均絶対閾値を集合的に例示する。

【図９】本開示の実施例５に説明される研究において、ＰＢＳ、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－６、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－６、スクランブルベクターを含むＡＡＶ－５、又はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓガイド１及び２を含むＡＡＶ－５の関節内（ＩＡ）注射で処理されたマウスから取得された滑液におけるＩＬ－１β発現のためのｑＰＣＲアッセイの結果を例示する。

【図１０Ａ】ＰＢＳで前処置された（Ａ、Ｂ）、及びＣＲＩＳＰＲで処理された（Ｃ、Ｄ）ＭＳＵ注射された動物の滑膜組織におけるマウスＩＬ－１βについての免疫組織化学を集合的に例示する。図１０Ｂ及び図１０Ｄは、それぞれ、図１０Ａ及び図１０Ｃの各々に対するアイソタイプ対照を示す。

【図１０Ｂ】ＰＢＳで前処置された（Ａ、Ｂ）、及びＣＲＩＳＰＲで処理された（Ｃ、Ｄ）ＭＳＵ注射された動物の滑膜組織におけるマウスＩＬ－１βについての免疫組織化学を集合的に例示する。図１０Ｂ及び図１０Ｄは、それぞれ、図１０Ａ及び図１０Ｃの各々に対するアイソタイプ対照を示す。

【図１０Ｃ】ＰＢＳで前処置された（Ａ、Ｂ）、及びＣＲＩＳＰＲで処理された（Ｃ、Ｄ）ＭＳＵ注射された動物の滑膜組織におけるマウスＩＬ－１βについての免疫組織化学を集合的に例示する。図１０Ｂ及び図１０Ｄは、それぞれ、図１０Ａ及び図１０Ｃの各々に対するアイソタイプ対照を示す。

【図１０Ｄ】ＰＢＳで前処置された（Ａ、Ｂ）、及びＣＲＩＳＰＲで処理された（Ｃ、Ｄ）ＭＳＵ注射された動物の滑膜組織におけるマウスＩＬ－１βについての免疫組織化学を集合的に例示する。図１０Ｂ及び図１０Ｄは、それぞれ、図１０Ａ及び図１０Ｃの各々に対するアイソタイプ対照を示す。

【図１１Ａ】マウス、ヒト、ウマ、ネコ、及びイヌＩＬ－１アルファ遺伝子間のアライメントを集合的に例示する。

【図１１Ｂ】マウス、ヒト、ウマ、ネコ、及びイヌＩＬ－１アルファ遺伝子間のアライメントを集合的に例示する。

【図１１Ｃ】マウス、ヒト、ウマ、ネコ、及びイヌＩＬ－１アルファ遺伝子間のアライメントを集合的に例示する。

【図１２Ａ】マウス、ヒト、ウマ、ネコ、及びイヌＩＬ－１ベータ遺伝子間のアライメントを集合的に例示する。

【図１２Ｂ】マウス、ヒト、ウマ、ネコ、及びイヌＩＬ－１ベータ遺伝子間のアライメントを集合的に例示する。

【図１２Ｃ】マウス、ヒト、ウマ、ネコ、及びイヌＩＬ－１ベータ遺伝子間のアライメントを集合的に例示する。

【図１２Ｄ】マウス、ヒト、ウマ、ネコ、及びイヌＩＬ－１ベータ遺伝子間のアライメン

トを集合的に例示する。
【図１３Ａ】ヒトＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列の例を集合的に例示する。
【図１３Ｂ】ヒトＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列の例を集合的に例示する。
【図１３Ｃ】ヒトＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列の例を集合的に例示する。
【図１３Ｄ】ヒトＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列の例を集合的に例示する。
【図１４Ａ】ヒトＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図１４Ｂ】ヒトＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図１４Ｃ】ヒトＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図１４Ｄ】ヒトＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図１４Ｅ】ヒトＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図１５Ａ】イヌＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図１５Ｂ】イヌＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図１５Ｃ】イヌＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図１６Ａ】イヌＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図１６Ｂ】イヌＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図１７Ａ】実施例８に説明されるように、ヒトＩＬ－１アルファ遺伝子（図７Ａ）、ヒトＩＬ－１ベータ遺伝子（図７Ｂ）、イヌＩＬ－１アルファ遺伝子（図７Ｃ）、及びイヌＩＬ－１ベータ遺伝子（図７Ｄ）を標的とするｃｒＲＮＡ配列の細胞ベース及びインシリコ遺伝子編集分析の結果を集合的に例示する。°アミノ酸（ＡＡ）の翻訳フレーム内のＣＲＩＳＰＲ切断位置。＊Ｄｏｅｎｃｈ，Ｆｕｓｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）からの最適化されたスコア。このスコアは、ＮＧＧを含む２０ｂｐのガイドに最適化される。スコアは、０～１００の範囲である。高ければ高いほど良好である。＊＊Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）からの特異性スコア。スコアは、０～１００の範囲である。高ければ高いほど良好である。＊＊＊このスコアは、Ｕ２ＯＳにおける実験に基づく。高精度スコア（＞０．４）は、ＤＮＡ修復結果が均一であり、ほんの一握りの固有の遺伝子型に濃縮されていることを示唆する。＊＊＊＊このスコアは、Ｕ２ＯＳにおける実験に基づく。高い（＞８０％）フレームシフト頻度は、タンパク質コード遺伝子をフレーム外に外す傾向がある。１－ｂｐの挿入及び１～２ｂｐの欠失が、特に一般的な修復結果であるため、典型的なゲノムフレームシフト頻度は、６６％を上回る。^複合スコア＝（オフターゲットスコア＋精度スコア＊１００＋フレームシフト）／３。†パイプ記号「｜」は、ＣＲＩＳＰＲ切断部位を示す。中括弧「｛｝」は、挿入を示す。ハイフン「－」は、欠失を示す。＄潜在的なオフターゲット部位。Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）によるスコアリング。オフターゲット部位は、１００のスコアを有する。
【図１７Ｂ】実施例８に説明されるように、ヒトＩＬ－１アルファ遺伝子（図７Ａ）、ヒトＩＬ－１ベータ遺伝子（図７Ｂ）、イヌＩＬ－１アルファ遺伝子（図７Ｃ）、及びイヌＩＬ－１ベータ遺伝子（図７Ｄ）を標的とするｃｒＲＮＡ配列の細胞ベース及びインシリ

コ遺伝子編集分析の結果を集合的に例示する。°アミノ酸（ＡＡ）の翻訳フレーム内のＣＲＩＳＰＲ切断位置。＊Ｄｏｅｎｃｈ，Ｆｕｓｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）からの最適化されたスコア。このスコアは、ＮＧＧを含む２０ｂｐのガイドに最適化される。スコアは、０～１００の範囲である。高ければ高いほど良好である。＊＊Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）からの特異性スコア。スコアは、０～１００の範囲である。高ければ高いほど良好である。＊＊＊このスコアは、Ｕ２ＯＳにおける実験に基づく。高精度スコア（＞０．４）は、ＤＮＡ修復結果が均一であり、ほんの一握りの固有の遺伝子型に濃縮されていることを示唆する。＊＊＊＊このスコアは、Ｕ２ＯＳにおける実験に基づく。高い（＞８０％）フレームシフト頻度は、タンパク質コード遺伝子をフレーム外に外す傾向がある。１－ｂｐの挿入及び１～２ｂｐの欠失が、特に一般的な修復結果であるため、典型的なゲノムフレームシフト頻度は、６６％を上回る。＾複合スコア＝（オフターゲットスコア＋精度スコア＊１００＋フレームシフト）／３。†パイプ記号「｜」は、ＣＲＩＳＰＲ切断部位を示す。中括弧「｛｝」は、挿入を示す。ハイフン「－」は、欠失を示す。＄潜在的なオフターゲット部位。Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）によるスコアリング。オフターゲット部位は、１００のスコアを有する。

【図１７Ｃ】実施例８に説明されるように、ヒトＩＬ－１アルファ遺伝子（図７Ａ）、ヒトＩＬ－１ベータ遺伝子（図７Ｂ）、イヌＩＬ－１アルファ遺伝子（図７Ｃ）、及びイヌＩＬ－１ベータ遺伝子（図７Ｄ）を標的とするｃｒＲＮＡ配列の細胞ベース及びインシリコ遺伝子編集分析の結果を集合的に例示する。°アミノ酸（ＡＡ）の翻訳フレーム内のＣＲＩＳＰＲ切断位置。＊Ｄｏｅｎｃｈ，Ｆｕｓｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）からの最適化されたスコア。このスコアは、ＮＧＧを含む２０ｂｐのガイドに最適化される。スコアは、０～１００の範囲である。高ければ高いほど良好である。＊＊Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）からの特異性スコア。スコアは、０～１００の範囲である。高ければ高いほど良好である。＊＊＊このスコアは、Ｕ２ＯＳにおける実験に基づく。高精度スコア（＞０．４）は、ＤＮＡ修復結果が均一であり、ほんの一握りの固有の遺伝子型に濃縮されていることを示唆する。＊＊＊＊このスコアは、Ｕ２ＯＳにおける実験に基づく。高い（＞８０％）フレームシフト頻度は、タンパク質コード遺伝子をフレーム外に外す傾向がある。１－ｂｐの挿入及び１～２ｂｐの欠失が、特に一般的な修復結果であるため、典型的なゲノムフレームシフト頻度は、６６％を上回る。＾複合スコア＝（オフターゲットスコア＋精度スコア＊１００＋フレームシフト）／３。†パイプ記号「｜」は、ＣＲＩＳＰＲ切断部位を示す。中括弧「｛｝」は、挿入を示す。ハイフン「－」は、欠失を示す。＄潜在的なオフターゲット部位。Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）によるスコアリング。オフターゲット部位は、１００のスコアを有する。

【図１７Ｄ】実施例８に説明されるように、ヒトＩＬ－１アルファ遺伝子（図７Ａ）、ヒトＩＬ－１ベータ遺伝子（図７Ｂ）、イヌＩＬ－１アルファ遺伝子（図７Ｃ）、及びイヌＩＬ－１ベータ遺伝子（図７Ｄ）を標的とするｃｒＲＮＡ配列の細胞ベース及びインシリコ遺伝子編集分析の結果を集合的に例示する。°アミノ酸（ＡＡ）の翻訳フレーム内のＣＲＩＳＰＲ切断位置。＊Ｄｏｅｎｃｈ，Ｆｕｓｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）からの最適化されたスコア。このスコアは、ＮＧＧを含む２０ｂｐのガイドに最適化される。スコアは、０～１００の範囲である。高ければ高いほど良好である。＊＊Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）からの特異性スコア。スコアは、０～１００の範囲である。高ければ高いほど良好である。＊＊＊このスコアは、Ｕ２ＯＳにおける実験に基づく。高精度スコア（＞０．４）は、ＤＮＡ修復結果が均一であり、ほんの一握りの固有の遺伝子型に濃縮されていることを示唆する。＊＊＊＊このスコアは、Ｕ２ＯＳにおける実験に基づく。高い（＞８０％）フレームシフト頻度は、タンパク質コード遺伝子をフレーム外に外す傾向がある。１－ｂｐの挿入及び１～２ｂｐの欠失が、特に一般的な修復結果であるため、典型的なゲノムフレームシフト頻度は、６６％を上回る。＾複合スコア＝（オフターゲットスコア＋精度スコア＊１００＋フレームシフト）／３。†パイプ記号「｜」は、ＣＲＩＳＰＲ切断部位を示す。中括弧「｛｝」は、挿入を示す。ハイフン「－」は、欠失を示す。＄潜在的なオフターゲット部位。Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）によるスコアリング。オフ

ターゲット部位は、１００のスコアを有する。
【図１８Ａ】実施例９に説明されるように、ＰＢＳ又はＬＰＳへの曝露後６時間（図１８Ａ及び図１８Ｃ）並びに２４時間（図１８Ｂ及び図１８Ｄ）の非編集（対照）及び二重ＩＬ－１α／ＩＬ－１β　ＫＯ（編集された）イヌ軟骨細胞からのイヌＩＬ－１アルファ（図１８Ａ及び図１８Ｂ）並びにイヌＩＬ－１ベータ（図１８Ｃ及び図１８Ｄ）放出を集合的に例示する。
【図１８Ｂ】実施例９に説明されるように、ＰＢＳ又はＬＰＳへの曝露後６時間（図１８Ａ及び図１８Ｃ）並びに２４時間（図１８Ｂ及び図１８Ｄ）の非編集（対照）及び二重ＩＬ－１α／ＩＬ－１β　ＫＯ（編集された）イヌ軟骨細胞からのイヌＩＬ－１アルファ（図１８Ａ及び図１８Ｂ）並びにイヌＩＬ－１ベータ（図１８Ｃ及び図１８Ｄ）放出を集合的に例示する。
【図１８Ｃ】実施例９に説明されるように、ＰＢＳ又はＬＰＳへの曝露後６時間（図１８Ａ及び図１８Ｃ）並びに２４時間（図１８Ｂ及び図１８Ｄ）の非編集（対照）及び二重ＩＬ－１α／ＩＬ－１β　ＫＯ（編集された）イヌ軟骨細胞からのイヌＩＬ－１アルファ（図１８Ａ及び図１８Ｂ）並びにイヌＩＬ－１ベータ（図１８Ｃ及び図１８Ｄ）放出を集合的に例示する。
【図１８Ｄ】実施例９に説明されるように、ＰＢＳ又はＬＰＳへの曝露後６時間（図１８Ａ及び図１８Ｃ）並びに２４時間（図１８Ｂ及び図１８Ｄ）の非編集（対照）及び二重ＩＬ－１α／ＩＬ－１β　ＫＯ（編集された）イヌ軟骨細胞からのイヌＩＬ－１アルファ（図１８Ａ及び図１８Ｂ）並びにイヌＩＬ－１ベータ（図１８Ｃ及び図１８Ｄ）放出を集合的に例示する。
【図１９Ａ】実施例９に説明されるように、ＰＢＳ又はＬＰＳへの曝露後６時間（図１９Ａ及び図１９Ｃ）並びに２４時間（図１９Ｂ及び図１９Ｄ）の非編集（対照）及び二重ＩＬ－１α／ＩＬ－１β　ＫＯ（編集された）イヌ軟骨細胞からのヒトＩＬ－１アルファ（図１９Ａ及び図１９Ｂ）並びにイヌＩＬ－１ベータ（図１９Ｃ及び図１９Ｄ）放出を集合的に例示する。
【図１９Ｂ】実施例９に説明されるように、ＰＢＳ又はＬＰＳへの曝露後６時間（図１９Ａ及び図１９Ｃ）並びに２４時間（図１９Ｂ及び図１９Ｄ）の非編集（対照）及び二重ＩＬ－１α／ＩＬ－１β　ＫＯ（編集された）イヌ軟骨細胞からのヒトＩＬ－１アルファ（図１９Ａ及び図１９Ｂ）並びにイヌＩＬ－１ベータ（図１９Ｃ及び図１９Ｄ）放出を集合的に例示する。
【図１９Ｃ】実施例９に説明されるように、ＰＢＳ又はＬＰＳへの曝露後６時間（図１９Ａ及び図１９Ｃ）並びに２４時間（図１９Ｂ及び図１９Ｄ）の非編集（対照）及び二重ＩＬ－１α／ＩＬ－１β　ＫＯ（編集された）イヌ軟骨細胞からのヒトＩＬ－１アルファ（図１９Ａ及び図１９Ｂ）並びにイヌＩＬ－１ベータ（図１９Ｃ及び図１９Ｄ）放出を集合的に例示する。
【図１９Ｄ】実施例９に説明されるように、ＰＢＳ又はＬＰＳへの曝露後６時間（図１９Ａ及び図１９Ｃ）並びに２４時間（図１９Ｂ及び図１９Ｄ）の非編集（対照）及び二重ＩＬ－１α／ＩＬ－１β　ＫＯ（編集された）イヌ軟骨細胞からのヒトＩＬ－１アルファ（図１９Ａ及び図１９Ｂ）並びにイヌＩＬ－１ベータ（図１９Ｃ及び図１９Ｄ）放出を集合的に例示する。
【図２０】ヒトＩＬ１Ａ（ＩＬ－１ａ）遺伝子の組織特異的スプライシング及び発現分析の結果を例示する。
【図２１】ヒトＩＬ１Ｂ（ＩＬ－１ｂ）遺伝子の組織特異的スプライシング及び発現分析の結果を例示する。
【図２２】ヒトＩＬ－１ａ及びＩＬ－１ｂ標的化ｇＲＮＡ標的化ドメインのインシリコ分析の結果を例示する。オンターゲットスコア（Ｄｏｅｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．を参照されたい）は、ＮＧＧプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）を有する２０ｂｐのｇＲＮＡに対して最適化される。スコアは、０～１の範囲である。精度スコアは、Ｕ２ＯＳ細胞における実験に基づく。高精度スコア（＞０．４）は、ＤＮＡ修復結果が均一であり、ほんの

一握りの固有の遺伝子型に濃縮されていることを示唆する。フレームシフトパーセンテージは、Ｕ２ＯＳ細胞における実験に基づく。高い（＞８０％）フレームシフト頻度は、タンパク質コード遺伝子をフレーム外に外す傾向がある。１－ｂｐの挿入及び１～２ｂｐの欠失が、特に一般的な修復結果であるため、典型的なゲノムフレームシフト頻度は、６６％を上回る。ＣＲＩＳＰＯＲからのオフターゲットスコアは、所与のミスマッチ数を有するゲノム内の一致の数を評価する。シード配列の不一致は、より有害な効果を有する。

【図２３Ａ】イヌＩＬ１Ａ（ＩＬ－１ａ）及びＩＬ１Ｂ（ＩＬ－１ｂ）遺伝子のスプライシング及び機能分析の結果を集合的に例示する。参照イヌゲノムアセンブリ（ＣａｎＦａｍ３．１）をこれらの分析に使用した。ｇＲＮＡ設計は、必要に応じて個々の育種に調整されてもよい。

【図２３Ｂ】イヌＩＬ１Ａ（ＩＬ－１ａ）及びＩＬ１Ｂ（ＩＬ－１ｂ）遺伝子のスプライシング及び機能分析の結果を集合的に例示する。参照イヌゲノムアセンブリ（ＣａｎＦａｍ３．１）をこれらの分析に使用した。ｇＲＮＡ設計は、必要に応じて個々の育種に調整されてもよい。

【図２３Ｃ】イヌＩＬ１Ａ（ＩＬ－１ａ）及びＩＬ１Ｂ（ＩＬ－１ｂ）遺伝子のスプライシング及び機能分析の結果を集合的に例示する。参照イヌゲノムアセンブリ（ＣａｎＦａｍ３．１）をこれらの分析に使用した。ｇＲＮＡ設計は、必要に応じて個々の育種に調整されてもよい。

【図２３Ｄ】イヌＩＬ１Ａ（ＩＬ－１ａ）及びＩＬ１Ｂ（ＩＬ－１ｂ）遺伝子のスプライシング及び機能分析の結果を集合的に例示する。参照イヌゲノムアセンブリ（ＣａｎＦａｍ３．１）をこれらの分析に使用した。ｇＲＮＡ設計は、必要に応じて個々の育種に調整されてもよい。

【図２４】イヌＩＬ－１ａ及びＩＬ－１ｂ標的化ｇＲＮＡ標的化ドメインのインシリコ分析の結果を例示する。

【図２５Ａ】ヒト軟骨細胞（図２５Ａ）、イヌ軟骨細胞（図２５Ｂ）、及び滑膜細胞（図２５Ｃ）における選択されたｇＲＮＡ標的化ドメインのノックダウン有効性を集合的に例示する。ゲノムＤＮＡを、シーケンシング分析の前に、投与後８～１０日目でプールした細胞から収集した。

【図２５Ｂ】ヒト軟骨細胞（図２５Ａ）、イヌ軟骨細胞（図２５Ｂ）、及び滑膜細胞（図２５Ｃ）における選択されたｇＲＮＡ標的化ドメインのノックダウン有効性を集合的に例示する。ゲノムＤＮＡを、シーケンシング分析の前に、投与後８～１０日目でプールした細胞から収集した。

【図２５Ｃ】ヒト軟骨細胞（図２５Ａ）、イヌ軟骨細胞（図２５Ｂ）、及び滑膜細胞（図２５Ｃ）における選択されたｇＲＮＡ標的化ドメインのノックダウン有効性を集合的に例示する。ゲノムＤＮＡを、シーケンシング分析の前に、投与後８～１０日目でプールした細胞から収集した。

【図２６】イヌ細胞におけるリード候補ｇＲＮＡ標的化ドメインのオフターゲット効果のインシリコ分析の結果を例示する。

【図２７Ａ】イヌ細胞におけるｓｇＲＮＡ　２４２のオフターゲット編集を破壊するための増強された特異性Ｃａｓ９（ｅｓｐＣａｓ９）の有効性を集合的に例示する。図２７Ａは、正準ｓｐＣａｓ９による効果を示し、強力なオンターゲット編集をもたらすが、高いオフターゲット活性ももたらす。図２７Ｂは、ｅｓｐＣａｓ９が、オフターゲット効果なしに高いオンターゲット効率を維持することを示す。

【図２７Ｂ】イヌ細胞におけるｓｇＲＮＡ　２４２のオフターゲット編集を破壊するための増強された特異性Ｃａｓ９（ｅｓｐＣａｓ９）の有効性を集合的に例示する。図２７Ａは、正準ｓｐＣａｓ９による効果を示し、強力なオンターゲット編集をもたらすが、高いオフターゲット活性ももたらす。図２７Ｂは、ｅｓｐＣａｓ９が、オフターゲット効果なしに高いオンターゲット効率を維持することを示す。

【図２８Ａ】ヒト（Ａ）及びイヌ（Ｂ）軟骨細胞におけるＩＬ－１ａ及びＩＬ－１ｂを標的とするｓｇＲＮＡ標的化の編集活性を集合的に例示する。

【図２８Ｂ】ヒト（Ａ）及びイヌ（Ｂ）軟骨細胞におけるＩＬ－１ａ及びＩＬ－１ｂを標的とするｓｇＲＮＡ標的化の編集活性を集合的に例示する。
【図２９】イヌ細胞におけるリード候補ｓｇＲＮＡの同時投与又は逐次的投与の結果を示す。
【図３０Ａ】単一のｓｇＲＮＡを用いた潜在的な種間標的に対する、ヒト、ウマ、マウス、及びイヌ由来のＩＬ１Ａ（Ａ）及びＩＬ１Ｂ（Ｂ）ゲノム配列の配列アライメントを例示する。
【図３０Ｂ】単一のｓｇＲＮＡを用いた潜在的な種間標的に対する、ヒト、ウマ、マウス、及びイヌ由来のＩＬ１Ａ（Ａ）及びＩＬ１Ｂ（Ｂ）ゲノム配列の配列アライメントを例示する。
【図３１Ａ】は、イヌＩＬ－１ＡのＣＲＩＳＰＲ媒介性編集を集合的に例示する。具体的には、図３１Ａは、イヌ軟骨細胞（ｎ＝３＋）、線維芽細胞様滑膜細胞（ｎ＝３）、及び単球ＤＨ８２（ｎ＝２）におけるＳａｎｇｅｒトレースからのＣＲＩＳＰＲ編集の推論によって決定された平均ＫＯスコアを示す。積み重ねられた棒グラフは、それぞれ、野生型Ｃａｓ９とアセンブリされたｓｇＲＮＡの上位及び残りの全てのＫＯ遺伝子型を明暗で示す。図３１Ｂは、ＣＲＩＳＰＲ媒介性ゲノム編集の前（上）及び後（下）の野生型及び切断されたイヌＩＬ１Ａのアミノ酸配列を示す。野生型ＩＬ１Ａは、プロペプチドを含み、これは切断されて機能的（成熟）タンパク質（強調表示されている）を作製する。図３１Ｃは、ＡｌｐｈａＦｏｌｄ２によって予測される野生型及び切断されたＩＬ１Ａの予測される三次元構造を例示する。Ｎは、Ｎ末端、正準翻訳開始点をマークする。
【図３１Ｂ】は、イヌＩＬ－１ＡのＣＲＩＳＰＲ媒介性編集を集合的に例示する。具体的には、図３１Ａは、イヌ軟骨細胞（ｎ＝３＋）、線維芽細胞様滑膜細胞（ｎ＝３）、及び単球ＤＨ８２（ｎ＝２）におけるＳａｎｇｅｒトレースからのＣＲＩＳＰＲ編集の推論によって決定された平均ＫＯスコアを示す。積み重ねられた棒グラフは、それぞれ、野生型Ｃａｓ９とアセンブリされたｓｇＲＮＡの上位及び残りの全てのＫＯ遺伝子型を明暗で示す。図３１Ｂは、ＣＲＩＳＰＲ媒介性ゲノム編集の前（上）及び後（下）の野生型及び切断されたイヌＩＬ１Ａのアミノ酸配列を示す。野生型ＩＬ１Ａは、プロペプチドを含み、これは切断されて機能的（成熟）タンパク質（強調表示されている）を作製する。図３１Ｃは、ＡｌｐｈａＦｏｌｄ２によって予測される野生型及び切断されたＩＬ１Ａの予測される三次元構造を例示する。Ｎは、Ｎ末端、正準翻訳開始点をマークする。
【図３１Ｃ】は、イヌＩＬ－１ＡのＣＲＩＳＰＲ媒介性編集を集合的に例示する。具体的には、図３１Ａは、イヌ軟骨細胞（ｎ＝３＋）、線維芽細胞様滑膜細胞（ｎ＝３）、及び単球ＤＨ８２（ｎ＝２）におけるＳａｎｇｅｒトレースからのＣＲＩＳＰＲ編集の推論によって決定された平均ＫＯスコアを示す。積み重ねられた棒グラフは、それぞれ、野生型Ｃａｓ９とアセンブリされたｓｇＲＮＡの上位及び残りの全てのＫＯ遺伝子型を明暗で示す。図３１Ｂは、ＣＲＩＳＰＲ媒介性ゲノム編集の前（上）及び後（下）の野生型及び切断されたイヌＩＬ１Ａのアミノ酸配列を示す。野生型ＩＬ１Ａは、プロペプチドを含み、これは切断されて機能的（成熟）タンパク質（強調表示されている）を作製する。図３１Ｃは、ＡｌｐｈａＦｏｌｄ２によって予測される野生型及び切断されたＩＬ１Ａの予測される三次元構造を例示する。Ｎは、Ｎ末端、正準翻訳開始点をマークする。
【図３２Ａ】８匹のイヌのＩＬ１Ａ－標的化ｓｇＲＮＡｓ：ｓｇ２３９／ＯＣＡ０１、ｓｇ３６０／ＯＣＡ０２、ｓｇ２４０／ＯＣＡ０３、ｓｇ３５９／ＯＣＡ０４、ｓｇ３５８／ＯＣＡ０５、ｓｇ２５１／ＯＣＡ０７、ｓｇ３６１／ＯＣＡ０６、及びｓｇ２５２／ＯＣＡ０８の設計及び試験を集合的に例示する。図３２Ａは、ガイドによって編集された標的配列を示す（ガイド配列が、チミジンの代わりにウラシルを含むことを除いて、ガイド中のｃｒＲＮＡ配列と同等である）。図３２Ｂは、実施例１６に記載されるように、ｇＲＮＡの各々に対する予測されるオンターゲット、オフターゲット、及びフレームシフト効果のスコアを示す。図３２Ｃは、編集された標的の配列決定によって分析されたインビトロ編集アッセイの結果を示す。
【図３２Ｂ】８匹のイヌのＩＬ１Ａ－標的化ｓｇＲＮＡｓ：ｓｇ２３９／ＯＣＡ０１、ｓ

ｇ３６０／ＯＣＡ０２、ｓｇ２４０／ＯＣＡ０３、ｓｇ３５９／ＯＣＡ０４、ｓｇ３５８／ＯＣＡ０５、ｓｇ２５１／ＯＣＡ０７、ｓｇ３６１／ＯＣＡ０６、及びｓｇ２５２／ＯＣＡ０８の設計及び試験を集合的に例示する。図３２Ａは、ガイドによって編集された標的配列を示す（ガイド配列が、チミジンの代わりにウラシルを含むことを除いて、ガイド中のｃｒＲＮＡ配列と同等である）。図３２Ｂは、実施例１６に記載されるように、ｇＲＮＡの各々に対する予測されるオンターゲット、オフターゲット、及びフレームシフト効果のスコアを示す。図３２Ｃは、編集された標的の配列決定によって分析されたインビトロ編集アッセイの結果を示す。

【図３２Ｃ】８匹のイヌのＩＬ１Ａ－標的化ｓｇＲＮＡｓ：ｓｇ２３９／ＯＣＡ０１、ｓｇ３６０／ＯＣＡ０２、ｓｇ２４０／ＯＣＡ０３、ｓｇ３５９／ＯＣＡ０４、ｓｇ３５８／ＯＣＡ０５、ｓｇ２５１／ＯＣＡ０７、ｓｇ３６１／ＯＣＡ０６、及びｓｇ２５２／ＯＣＡ０８の設計及び試験を集合的に例示する。図３２Ａは、ガイドによって編集された標的配列を示す（ガイド配列が、チミジンの代わりにウラシルを含むことを除いて、ガイド中のｃｒＲＮＡ配列と同等である）。図３２Ｂは、実施例１６に記載されるように、ｇＲＮＡの各々に対する予測されるオンターゲット、オフターゲット、及びフレームシフト効果のスコアを示す。図３２Ｃは、編集された標的の配列決定によって分析されたインビトロ編集アッセイの結果を示す。

【図３３Ａ】８匹のイヌのＩＬ１Ｂ－標的化ｓｇＲＮＡｓ：ｓｇ２４１／ＯＣＢ０１（配列番号ＸＸ）、ｓｇ２４２／ＯＣＢ０２（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５２／ＯＣＢ０６（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５３／ＯＣＢ０４（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５４／ＯＣＢ０８（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５５／ＯＣＢ０５（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５６／ＯＣＢ０７（配列番号ＸＸ）、及びｓｇ３５７／ＯＣＢ０３（配列番号ＸＸ）の設計及び試験を集合的に例示する。図３３Ａは、ガイドによって編集された標的配列を示す（ガイド配列が、チミジンの代わりにウラシルを含むことを除いて、ガイド中のｃｒＲＮＡ配列と同等である）。図３２Ｂは、実施例１７に記載されるように、ｇＲＮＡの各々に対する予測されるオンターゲット、オフターゲット、及びフレームシフト効果のスコアを示す。図３２Ｃは、編集された標的の配列決定によって分析されたインビトロ編集アッセイの結果を示す。図３３Ｄは、編集構築物によって標的化されたイヌ単球の上清に対する抗ＩＬ－１Ｂ　ＥＬＩＳＡアッセイの結果を示す。

【図３３Ｂ】８匹のイヌのＩＬ１Ｂ－標的化ｓｇＲＮＡｓ：ｓｇ２４１／ＯＣＢ０１（配列番号ＸＸ）、ｓｇ２４２／ＯＣＢ０２（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５２／ＯＣＢ０６（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５３／ＯＣＢ０４（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５４／ＯＣＢ０８（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５５／ＯＣＢ０５（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５６／ＯＣＢ０７（配列番号ＸＸ）、及びｓｇ３５７／ＯＣＢ０３（配列番号ＸＸ）の設計及び試験を集合的に例示する。図３３Ａは、ガイドによって編集された標的配列を示す（ガイド配列が、チミジンの代わりにウラシルを含むことを除いて、ガイド中のｃｒＲＮＡ配列と同等である）。図３２Ｂは、実施例１７に記載されるように、ｇＲＮＡの各々に対する予測されるオンターゲット、オフターゲット、及びフレームシフト効果のスコアを示す。図３２Ｃは、編集された標的の配列決定によって分析されたインビトロ編集アッセイの結果を示す。図３３Ｄは、編集構築物によって標的化されたイヌ単球の上清に対する抗ＩＬ－１Ｂ　ＥＬＩＳＡアッセイの結果を示す。

【図３３Ｃ】８匹のイヌのＩＬ１Ｂ－標的化ｓｇＲＮＡｓ：ｓｇ２４１／ＯＣＢ０１（配列番号ＸＸ）、ｓｇ２４２／ＯＣＢ０２（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５２／ＯＣＢ０６（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５３／ＯＣＢ０４（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５４／ＯＣＢ０８（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５５／ＯＣＢ０５（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５６／ＯＣＢ０７（配列番号ＸＸ）、及びｓｇ３５７／ＯＣＢ０３（配列番号ＸＸ）の設計及び試験を集合的に例示する。図３３Ａは、ガイドによって編集された標的配列を示す（ガイド配列が、チミジンの代わりにウラシルを含むことを除いて、ガイド中のｃｒＲＮＡ配列と同等である）。図３２Ｂは、実施例１７に記載されるように、ｇＲＮＡの各々に対する予測されるオンターゲット、オフターゲット、及びフレームシフト効果のスコアを示す。図３２Ｃは、編

集された標的の配列決定によって分析されたインビトロ編集アッセイの結果を示す。図３３Ｄは、編集構築物によって標的化されたイヌ単球の上清に対する抗ＩＬ－１Ｂ　ＥＬＩＳＡアッセイの結果を示す。

【図３３Ｄ】８匹のイヌのＩＬ１Ｂ－標的化ｓｇＲＮＡｓ：ｓｇ２４１／ＯＣＢ０１（配列番号ＸＸ）、ｓｇ２４２／ＯＣＢ０２（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５２／ＯＣＢ０６（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５３／ＯＣＢ０４（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５４／ＯＣＢ０８（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５５／ＯＣＢ０５（配列番号ＸＸ）、ｓｇ３５６／ＯＣＢ０７（配列番号ＸＸ）、及びｓｇ３５７／ＯＣＢ０３（配列番号ＸＸ）の設計及び試験を集合的に例示する。図３３Ａは、ガイドによって編集された標的配列を示す（ガイド配列が、チミジンの代わりにウラシルを含むことを除いて、ガイド中のｃｒＲＮＡ配列と同等である）。図３２Ｂは、実施例１７に記載されるように、ｇＲＮＡの各々に対する予測されるオンターゲット、オフターゲット、及びフレームシフト効果のスコアを示す。図３２Ｃは、編集された標的の配列決定によって分析されたインビトロ編集アッセイの結果を示す。図３３Ｄは、編集構築物によって標的化されたイヌ単球の上清に対する抗ＩＬ－１Ｂ　ＥＬＩＳＡアッセイの結果を示す。

【図３４Ａ】軟骨細胞、滑膜細胞、及び単球ＤＨ８２におけるＳａｎｇｅｒシーケンシングＣＲＩＳＰＲ媒介性ゲノム編集から推定される平均ＩＬ１Ｂ　ＫＯスコアによって測定された場合の、ＩＬ１Ｂ－標的化ｓｇＲＮＡ＃２４１（ＯＣＢ０１）及び＃２４２（ＯＣＢ０２）の性能（図３４Ａ）、並びにｓｇＲＮＡの異なる組み合わせから生成された対照又は２つのＩＬ１Ａ／Ｂ二重ＫＯ単球のいずれかにおけるＩＬ１ＢのＥＬＩＳＡ結果（図３４Ｂ、左の各組み合わせに対するＳａｎｇｅｒ配列推定ＫＯスコア）を集合的に例示する。

【図３４Ｂ】軟骨細胞、滑膜細胞、及び単球ＤＨ８２におけるＳａｎｇｅｒシーケンシングＣＲＩＳＰＲ媒介性ゲノム編集から推定される平均ＩＬ１Ｂ　ＫＯスコアによって測定された場合の、ＩＬ１Ｂ－標的化ｓｇＲＮＡ＃２４１（ＯＣＢ０１）及び＃２４２（ＯＣＢ０２）の性能（図３４Ａ）、並びにｓｇＲＮＡの異なる組み合わせから生成された対照又は２つのＩＬ１Ａ／Ｂ二重ＫＯ単球のいずれかにおけるＩＬ１ＢのＥＬＩＳＡ結果（図３４Ｂ、左の各組み合わせに対するＳａｎｇｅｒ配列推定ＫＯスコア）を集合的に例示する。

【図３５Ａ】リポ多糖類（ＬＰＳ）でチャレンジしてから（Ａ）６時間後及び（Ｂ）２４時間後のいずれかでの上清ＥＬＩＳＡによって測定された場合の、ＯＣＢ０２／ｓｇ２４２（ＫＯ１）又はＯＣＢ０１／ｓｇ２４１（ＫＯ２）のいずれかを用いたイヌ単球に対する電気穿孔の影響を集合的に例示する。

【図３５Ｂ】リポ多糖類（ＬＰＳ）でチャレンジしてから（Ａ）６時間後及び（Ｂ）２４時間後のいずれかでの上清ＥＬＩＳＡによって測定された場合の、ＯＣＢ０２／ｓｇ２４２（ＫＯ１）又はＯＣＢ０１／ｓｇ２４１（ＫＯ２）のいずれかを用いたイヌ単球に対する電気穿孔の影響を集合的に例示する。

【図３６】Ａｂｃａｍ　ＩＬ－１ベータＥＬＩＳＡキットによって測定された場合の、単球中のイヌＩＬ－１ベータを標的とする５つの潜在的なｇＲＮＡの編集効率の比較を例示する。

【図３７Ａ】（Ａ）オンターゲット編集効率と、標準的なＣａｓ９又は増強された特異性／忠実性Ｃａｓ９バリアントのいずれかを加えたＯＣＢ０２　ｇＲＮＡとの比較、並びに（Ｂ）ＯＣＢ０１のオンターゲット編集効率とＡＲＣａｓ９バリアント又は野生型Ｃａｓ９との比較を含む、増強された特異性を有する異なるＣａｓ９変異体の効果を集合的に例示する。

【図３７Ｂ】（Ａ）オンターゲット編集効率と、標準的なＣａｓ９又は増強された特異性／忠実性Ｃａｓ９バリアントのいずれかを加えたＯＣＢ０２　ｇＲＮＡとの比較、並びに（Ｂ）ＯＣＢ０１のオンターゲット編集効率とＡＲＣａｓ９バリアント又は野生型Ｃａｓ９との比較を含む、増強された特異性を有する異なるＣａｓ９変異体の効果を集合的に例示する。

【図３８Ａ】増強された特異性を有するＣａｓ９変異体のインビトロ性能を集合的に例示する。図３８Ａは、オンターゲット及びオフターゲットの編集効率を例示しており、パーセンテージは、それぞれ、ＫＯスコア及び編集効率を表す。図３８Ｂは、ＯＣＢ０１の予測されたオフターゲット編集部位を示す。
【図３８Ｂ】増強された特異性を有するＣａｓ９変異体のインビトロ性能を集合的に例示する。図３８Ａは、オンターゲット及びオフターゲットの編集効率を例示しており、パーセンテージは、それぞれ、ＫＯスコア及び編集効率を表す。図３８Ｂは、ＯＣＢ０１の予測されたオフターゲット編集部位を示す。
【図３９Ａ】ヒトＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図３９Ｂ】ヒトＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４０Ａ】ヒトＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４０Ｂ】ヒトＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４１Ａ】イヌＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４１Ｂ】イヌＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４２Ａ】イヌＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４２Ｂ】イヌＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４３Ａ】は、ウマＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４３Ｂ】は、ウマＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４４Ａ】ウマＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４４Ｂ】ウマＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４５Ａ】ネコＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４５Ｂ】ネコＩＬ－１ベータ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４６Ａ】ネコＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【図４６Ｂ】ネコＩＬ－１アルファ遺伝子を編集するために設計された例示的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ｃｒＲＮＡ配列を集合的に例示する。
【００３５】
上記で識別された図面は、現在開示される実施形態を記載しているが、他の実施形態もまた、考察に記載されるように意図されている。本開示は、限定ではなく、表現として例示的な実施形態を提示する。本開示の実施形態の原理の範囲及び趣旨に収まる数多くの他の修正及び実施形態が、当業者によって考案され得る。
【発明を実施するための形態】
【００３６】
本明細書に説明されるように、本開示の実施形態は、関節機能を改善し、関節疾患を治療するための組成物及び方法を提供する。特定の実施形態では、滑膜線維芽細胞、滑膜細胞、軟骨細胞、又は滑膜マクロファージを遺伝子編集して、炎症性サイトカイン、例えば

、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１８、１つ以上のマトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、又はＮＬＲＰ３インフラマソームの１つ以上の成分の発現を低減させるための組成物及び方法が提供される。実施形態は、変形性関節炎及び他の炎症性関節疾患を治療するために使用される。実施形態は、変形性関節炎に起因するイヌの跛行を治療するために更に有用である。実施形態は、関節疾患に起因するウマの跛行を治療するために更に有用である。実施形態はまた、外傷後関節炎、痛風、偽痛風、及び他の炎症介在性又は免疫介在性関節疾患を治療するために有用である。

【００３７】

定義

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に参照される全ての特許及び刊行物は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【００３８】

「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。

【００３９】

「インビトロ」という用語は、対象の体外で起こる事象を指す。インビトロアッセイは、生存又は死滅した細胞が用いられる細胞ベースのアッセイを包含し、また、無傷の細胞が用いられる細胞非含有アッセイも包含し得る。

【００４０】

「エクスビボ」という用語は、対象の身体から除去された細胞、組織、及び／又は器官を処置すること、又はそれらに対する処置を実施することを伴う事象を指す。適切には、細胞、組織、及び／又は器官は、外科手術又は治療の方法において対象の身体に戻され得る。

【００４１】

「ＩＬ－１」（本明細書では「ＩＬ１」とも称される）という用語は、インターロイキン－１として知られる炎症誘発性サイトカインを指し、ＩＬ１－α及びＩＬ－１β、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオ後続品、及びそれらのバリアントを含む、ＩＬ－１の全形態を含む。ＩＬ－１α及びＩＬ－１βは、Ｉ型ＩＬ－１受容体（ＩＬ－１Ｒ１）と呼ばれる同じ受容体分子に結合する。この受容体の第３のリガンドが存在する。下流シグナル伝達を活性化せず、それゆえに、受容体の結合部位に関してＩＬ－１α及びＩＬ－１βシグナル伝達と競合することによってＩＬ－１α及びＩＬ－１βシグナル伝達の阻害剤として作用する、インターロイキン１受容体拮抗薬（ＩＬ－１Ｒａ）。例えば、Ｄｉｎａｒｅｌｌｏ，Ｂｌｏｏｄ　１１７：３７２０－３２（２０１１）及びＷｅｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　３（１０５）：ｃｍ１，ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｓｉｇｎａｌ．３１０５ｃｍ１を参照されたい。ＩＬ－１は、例えば、Ｄｉｎａｒｅｌｌｏ，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒ　Ｒｅｖ．８：２５３－６５（１９９７）に説明されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。例えば、ＩＬ－１という用語は、ＩＬ－１のヒトの組換え形態を包含する。

【表１】

表１．アミノ酸配列の例。

識別子	配列(1 文字アミノ酸記号)
配列番号 1 組換えヒト IL-1 アルファ(rhIL-1α)	10 20 30 40 50 MAKVPDMFED LKNCYSENEE DSSSIDHLSL NQKSFYHVSY GPLHEGCMDQ 60 70 80 90 100 SVSLSISETS KTSKLTFKES MVVVATNGKV LKKRRLSLSQ SITDDDLEAI 110 120 130 140 150 ANDSEEEIIK PRSAPFSFLS NVKYNFMRII KYEFILNDAL NQSIIRANDQ 160 170 180 190 200 YLTAAALHNL DEAVKFDMGA YKSSKDDAKI TVILRISKTQ LYVTAQDEDQ 210 220 230 240 250 PVLLKEMPEI PKTITGSETN LLFFWETHGT KNYFTSVAHP NLFIATKQDY 260 270 WVCLAGGPPS ITDFQILENQ A
配列番号 2 組換えヒト IL-1 ベータ(rhIL-1β)	10 20 30 40 50 MAEVPELASE MMAYYSGNED DLFFEADGPK QMKCSFQDLD LCPLDGGIQL 60 70 80 90 100 RISDHHYSKG FRQAASVVVA MDKLRKMLVP CPQTFQENDL STFFPFIFEE 110 120 130 140 150 EPIFFDTWDN EAYVHDAPVR SLNCTLRDSQ QKSLVMSGPY ELKALHLQGQ 160 170 180 190 200 DMEQQVVFSM SFVQGEESND KIPVALGLKE KNLYLSCVLK DDKPTLQLES 210 220 230 240 250 VDPKNYPKKK MEKRFVFNKI EINNKLEFES AQFPNWYIST SQAENMPVFL 260 GGTKGGQDIT DFTMQFVSS
配列番号 3 組換えマウス IL-1 アルファ(rmIL-1α)	10 20 30 40 50 MAKVPDLFED LKNCYSENED VSSAIDHLSL NQKSFYDASY GSLHETCTDQ 60 70 80 90 100 FVSLRTSETS KMSNFTFKES RVTVSATSSN GKILKKRRLS FSETFTEDDL 110 120 130 140 150 QSITHDLEET IQPRSAPYTY QSDLRYKLMK LVRQKFVMND SLNQTIYQDV 160 170 180 190 200 DKEYLSTTWL NDLQQEVKFD MYAYSSGGDD SKYPVTLKIS DSQLFVSAQG 210 220 230 240 250 EDQPVLLKEL PETPKLITGS ETDLIFFWKS INSKNYFTSA AYPELFIATK 260 270 EQSRVHLARG LPSMTDFQIS
配列番号 4 組換えマウス IL-1 ベータ(rmIL-1β)	10 20 30 40 50 MATVPELNCE MPFFDSDEND LFFEVDGPQK MKGCFQTFDL GCPDESIQLQ 60 70 80 90 100 ISQQHINKSF RQAVSLIVAV EKLWQLPVSF PWTFQDEDMS TFFSFIFEEE 110 120 130 140 150 PILCDSWDDD DNLLVCDVPI RQLHYRLRDE QQKSLVLSDF YELKALHLNG 160 170 180 190 200 QNINQQVIFS MSFVQGEPSN DKIPVALGLK GKNLYLSCVM KDGTPTLQLE 210 220 230 240 250 SVDPKQYPKK KMEKRFVFNK IEVKSKVEFE SAEFPNWYIS TSQAEHKPVF 260 LGNNSGQDII DFTMESVSS
配列番号 5 組換えヒト IL-1 受容体拮抗薬 (rhIL-1Ra)	10 20 30 40 50 MEICRGLRSH LITLLLFLFH SETICRPSGR KSSKMQAFRI WDVNQKTFYL 60 70 80 90 100 RNNQLVAGYL QGPNVNLEEK IDVVPIEPHA LFLGIHGGKM CLSCVKSGDE 110 120 130 140 150 TRLQLEAVNI TDLSENRKQD KRFAFIRSDS GPTTSFESAA CPGWFLCTAM 160 170 EADQPVSLTN MPDEGVMVTK FYFQEDE
配列番号 6 組換えマウス IL-1 受容体拮抗薬 (rmIL-1Ra)	10 20 30 40 50 MEICWGPYSH LISLLLILLF HSEAACRPSG KRPCKMQAFR IWDTNQKTFY 60 70 80 90 100 LRNNQLIAGY LQGPNIKLEE KIDMVPIDLH SVFLGIHGGK LCLSCAKSGD 110 120 130 140 150 DIKLQLEEVN ITDLSKNKEE DKRFTFIRSE KGPTTSFESA ACPGWFLCTT 160 170 LEADRPVSLT NTPEEPLIVT KFYFQEDQ

【００４２】

「ＮＬＲＰ３インフラマソーム」という用語は、いくつかの炎症反応の活性化に関与する多タンパク質複合体を指す。ＮＬＲＰ３インフラマソームは、機能性炎症誘発性サイトカイン、例えば、ＩＬ－１β及びＩＬ－１８の産生を促進する。ＮＬＲＰ３インフラマソームのコア成分は、ＮＬＲＰ３、ＡＳＣ（ＣＡＲＤを含有するアポトーシス関連スペック様タンパク質）、及びカスパーゼ－１であり、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｌｉｐｉｄｓ Ｈｅａｌｔｈ Ｄｉｓ．１６：２７１（２０１７）及びＧｒｏｓｌａｍｂｅｒｔ ａｎｄ Ｐｙ，Ｊ．Ｉｎｆｌａｍｍ．Ｒｅｓ．１１：３５９－３７４（２０１８）によって説明される。

【００４３】

「マトリックスメタロプロテアーゼ」及び「ＭＭＰ」という用語は、例えば、Ｆａｎｊｕｌ－Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ

１８０３：３－１９（２０１０）によって特徴付けられるように、ジンクエンドペプチダーゼのマトリックスメタロプロテアーゼファミリーのメンバーのうちのいずれか１つであると定義される。当該技術分野では、ファミリーメンバーは、多くの場合、原型的なＭＭＰ、ゼラチナーゼ、マトリリジン、及び／又はフリン活性化可能なＭＭＰと称される。本明細書で使用される場合、「マトリックスメタロプロテアーゼ」及び「ＭＭＰ」は、限定されるものではないが、ＭＭＰ－１、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－７、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１０、ＭＭＰ－１１、ＭＭＰ－１２、ＭＭＰ－１３、ＭＭＰ－１４、ＭＭＰ－１５、ＭＭＰ－１６、ＭＭＰ－１７、ＭＭＰ－１８、ＭＭＰ－１９、ＭＭＰ－２０、ＭＭＰ－２１、ＭＭＰ－２３、ＭＭＰ－２５、ＭＭＰ－２６、ＭＭＰ－２７、及びＭＭＰ－２８を含む、全ＭＭＰファミリーを包含する。

【００４４】

本明細書で使用される場合、「同時投与」、「同時投与する」、「組み合わせて投与される」、「組み合わせて投与する」、「同時」、及び「併用」という用語は、両方の活性医薬成分及び／又はそれらの代謝物が、同時に対象内に存在するように対象に２つ以上の活性医薬成分の投与を包含する（本開示の好ましい実施形態では、例えば、ウイルスベクターと組み合わせて少なくとも１つの抗炎症化合物が機能的に操作されて、本明細書に説明される遺伝子編集核酸を送達する）。同時投与は、別個の組成物の同時投与、別個の組成物の異なる時点における投与、又は２つ以上の活性医薬成分が存在する組成物における投与を含む。別個の組成物における同時投与、及び両方の薬剤が存在する組成物における投与が好ましい。

【００４５】

「有効量」又は「治療有効量」という用語は、限定されるものではないが、疾患治療を含む、意図される用途に効果をもたらすのに十分である、本明細書に説明される組成物又は組成物の組み合わせの量を指す。治療有効量は、意図される用途（インビトロ又はインビボ）、若しくは治療される対象及び疾患状態（例えば、対象の体重、年齢、若しくは性別）、疾患状態の重症度、又は投与の様式に応じて変化し得る。用語はまた、標的細胞に特定の応答を誘発することになる用量（例えば、血小板付着及び／又は細胞遊走の低減）にも適用される。特定の用量は、選択された特定の組成物、従うべき投与レジメン、組成物が他の組成物又は化合物と組み合わせて投与されるか否か、投与のタイミング、投与される組織、及び組成物が輸送される物理的送達システムに応じて変化することになる。

【００４６】

「治療」、「治療すること」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的及び／又は生理学的効果を取得することを指す。効果は、疾患若しくはその症状を完全に若しくは部分的に予防するという観点で予防的であってもよく、並びに／又は疾患に起因する疾患及び／若しくは有害作用に対する部分的若しくは完全な治癒の観点で治療的であってもよい。例えば、本開示の組成物、方法、又はシステムは、所与の状態（例えば、関節炎）に対する傾向を有する対象に、予防的治療として投与されてもよい。本明細書で使用される場合、「治療」は、哺乳動物、特にヒト、イヌ、ネコ、又はウマにおける疾患の任意の治療に及び、（ａ）疾患の素因があるが、まだ疾患を有すると診断されていない対象において疾患が発生することを予防すること、（ｂ）疾患を阻害すること、すなわち、疾患の発症又は進行を抑止すること、並びに（ｃ）疾患を緩和する、すなわち、疾患の退行を引き起こすこと、及び／又は１つ以上の疾患症状を緩和することを含む。「治療」はまた、疾患又は状態の不在下であっても、薬理学的効果を提供するために、薬剤の送達を包含することを意味する。例えば、「治療」は、例えば、ワクチンの場合、疾患状態の不在下で免疫反応を誘発するか、又は免疫を付与し得る組成物の送達を包含する。本開示の組成物及び方法は、限定されるものではないが、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、及びウシの対象を含む、全ての哺乳動物を治療するために適用可能であることが理解される。

【００４７】

核酸又はタンパク質の部分を参照して使用されるときの「異種」という用語は、核酸又はタンパク質が、自然界では互いに同じ関係で見つからない２つ以上の部分配列を含むこ

とを示す。例えば、核酸は、典型的には、新しい機能性核酸、例えば、１つのソースからのプロモーター及び別のソースからのコーディング領域、又は異なるソースからのコーディング領域を作製するために配置された非関連遺伝子からの２つ以上の配列を有して、組換え的に産生される。同様に、異種タンパク質は、タンパク質が、自然界では互いに同じ関係で見つからない２つ以上の部分配列（例えば、融合タンパク質）を含むことを示す。

【００４８】

「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、及び「核酸」という用語は、本明細書では互換的に使用され、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）及びリボ核酸（ＲＮＡ）を含む、核酸、オリゴヌクレオチドの全ての形態を指す。ポリヌクレオチドは、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、及びアンチセンスＤＮＡ、並びにスプライシング又は非スプライシングｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ＲＮＡ拮抗薬、並びに阻害性ＤＮＡ又はＲＮＡ（例えば、ＲＮＡｉ、例えば、小又は短ヘアピン（ｓｈ）ＲＮＡ、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、アプタマー、小又は短干渉（ｓｉ）ＲＮＡ、トランススプライシングＲＮＡ、又はアンチセンスＲＮＡ）を含む。ポリヌクレオチドはまた、例えば、限定されるものではないが、ＲＮＡｉ、ｍｉＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ＲＮＡ拮抗薬、アプタマー、及び当業者に既知の任意の他の非コーディングＲＮＡを含む、非コーディングＲＮＡを含む。ポリヌクレオチドは、天然型、合成型、及び意図的に改変若しくは修飾されたポリヌクレオチド、並びに類似体及び誘導体を含む。「ポリヌクレオチド」という用語はまた、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又はその類似体を含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態も指し、核酸配列と同義である。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含み得、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーのアセンブリの前又は後に付与され得る。ポリヌクレオチドという用語は、本明細書で使用される場合、二本及び一本鎖分子を互換的に指す。別段の指定又は要求がない限り、ポリヌクレオチドを包含する本明細書に説明される任意の実施形態は、二本鎖形態と、二本鎖形態を構成することが既知であるか、又は予測される２つの相補的な一本鎖形態との両方を包含する。ポリヌクレオチドは、単一、二重、又は三重鎖、直線、又は円形であってもよく、任意の長さであってもよい。ポリヌクレオチドを考察する際、特定のポリヌクレオチドの配列又は構造は、５’から３’の方向に配列を提供するという慣例に従って本明細書で説明され得る。

【００４９】

「遺伝子」又は「ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列」という用語は、ポリペプチド鎖の産生に関与するＤＮＡのセグメントを指す。ＤＮＡセグメントは、遺伝子産物の転写／翻訳、及び転写／翻訳の調節に関与するコーディング領域（リーダー及びトレーラー）の前後の領域、並びに個々のコーディングセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含み得る。例えば、遺伝子は、転写及び翻訳された後、特定のタンパク質又はポリペプチドをコードすることができる少なくとも１つのオープンリーディングフレームを含有するポリヌクレオチドを含む。

【００５０】

ヌクレオチド配列の観点で「相同」という用語は、既知の参照配列と同一であるか、又は実質的に同様であるかのいずれかであるヌクレオチド（核酸）配列を含む。一実施形態では、「相同ヌクレオチド配列」という用語は、既知の参照配列と少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一である核酸配列を有する配列を特徴付けるために使用される。

【００５１】

「異種」とは、それが比較される実体の残部から遺伝子型的に別個の実体に由来することを意味する。例えば、遺伝子工学技術によって、異なる種に由来するプラスミド又はベクターに導入されたポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである。プロモーターは、その天然コーディング配列から除去され、異種プロモーターに連結された自然には存在

しないコーディング配列に作動可能に連結される。「異種」という用語は、本明細書で常にポリヌクレオチドを参照して使用されるものではないが、修飾語「異種」の不在下でも、ポリヌクレオチドに対する参照は、省略にもかかわらず異種ポリヌクレオチドを含むことが意図される。

【００５２】

２つ以上の核酸又はポリペプチドの文脈における「配列同一性」、「パーセント同一性」、及び「配列パーセント同一性」（又はその類義語、例えば、「９９％同一」）という用語は、配列同一性の一部としていかなる保存的アミノ酸置換も考慮せずに、最大の対応に関して比較及び整列されたとき（必要な場合、ギャップを導入する）、同じであるか、又は同じであるヌクレオチド若しくはアミノ酸残基の特定のパーセンテージを有する２つ以上の配列又は部分配列を指す。パーセント同一性が、配列比較ソフトウェア若しくはアルゴリズムを使用して、又は目視検査によって測定され得る。アミノ酸又はヌクレオチド配列のアライメントを取得するために使用され得る様々なアルゴリズム及びソフトウェアが当該技術分野で既知である。パーセント配列同一性を決定するための好適なプログラムとしては、例えば、米国政府のＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ＢＬＡＳＴウェブサイトから入手可能なプログラムのＢＬＡＳＴスイートが挙げられる。２つの配列間の比較は、ＢＬＡＳＴＮ又はＢＬＡＳＴＰアルゴリズムのいずれかを使用して行われ得る。ＢＬＡＳＴＮは、核酸配列を比較するために使用されるが、ＢＬＡＳＴＰは、アミノ酸配列を比較するために使用される。ＤＮＡＳＴＡＲから入手可能なＡＬＩＧＮ、ＡＬＩＧＮ－２（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ、Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、又はＭｅｇＡｌｉｇｎは、配列を整列させるために使用され得る追加の公開ソフトウェアプログラムである。ＣｌｕｓｔａｌＷ及びＣｌｕｓｔａｌＸは、アライメントを生成するために使用され得る、Ｌａｒｋｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２３：２９４７－２９４８（２００７）、Ｇｏｕｊｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，３８ Ｓｕｐｐｌ：Ｗ ６９５－９（２０１０）、及びＭｃＷｉｌｌｉａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４１（Ｗｅｂ Ｓｅｒｖｅｒ ｉｓｓｕｅ）：Ｗ ５９７－６００（２０１３）。当業者は、特定のアライメントソフトウェアによって、最大アライメントのための適切なパラメータを決定し得る。特定の実施形態では、アライメントソフトウェアのデフォルトパラメータが使用される。

【００５３】

本明細書で使用される場合、「バリアント」という用語は、限定されるものではないが、参照抗体のアミノ酸配列内の又はそれに隣接する特定の位置における１つ以上の置換、欠失、及び／又は付加によって参照抗体のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む抗体又は融合タンパク質を包含する。バリアントは、参照抗体のアミノ酸配列と比較して、そのアミノ酸配列に１つ以上の保存的置換を含み得る。保存的置換は、例えば、同様の帯電又は非帯電アミノ酸の置換を伴い得る。バリアントは、参照抗体の抗原に特異的に結合する能力を保持する。バリアントという用語はまた、ペグ化抗体又はタンパク質も含む。

【００５４】

「関節疾患」は、例えば、関節の解剖学的及び／又は生理学的変化をトリガーする病気、例えば、代謝及び分子的障害につながり得る、関節の細胞又は組織における測定可能な異常として定義される。限定されるものではないが、関節腔狭小化、軟骨下硬化症、軟骨下嚢胞、及び骨棘形成の放射線検出を含む。

【００５５】

「関節病」は、ヒト対象において、医学的介入を求めるように対象を駆り立てる症状、例えば、対象が報告した疼痛、こわばり、腫脹、又は強直として定義される。非ヒト哺乳動物については、「関節病」は、例えば、跛行、歩行における観察可能な変化、体重負荷、アロディニア、又は探索的挙動として定義される。

【００５６】

本明細書で使用される際、ｓｇＲＮＡ（シングルガイドＲＮＡ）は、ＲＮＡ、好ましくは合成ＲＮＡであり、標的化配列及び足場から構成される。ゲノム工学実験では、Ｃａｓ９を特定の遺伝子座にガイドするために使用される。ｓｇＲＮＡは、例えば、合成ＲＮＡとして、又は後から標的細胞で発現されるｇＲＮＡをコードする配列を含む核酸として、投与又は製剤化され得る。当業者には明らかであろうように、例えば、ゲノム編集の特異性及び／又は精度を高めるために、ｓｇＲＮＡの配列を設計及び／又は最適化するために、様々なツールが使用され得る。一般に、候補ｓｇＲＮＡは、利用可能なウェブベースのツールのいずれかに基づいて、高い予測オンターゲット効率及び低いオフターゲット効率を有する標的領域内の配列を識別することによって設計され得る。候補ｓｇＲＮＡは、手動検査及び／又は実験スクリーニングによって更に評価され得る。ウェブベースのツールの例としては、限定なしで、ＣＲＩＳＰＲシーク、ＣＲＩＳＰＲ Ｄｅｓｉｇｎ Ｔｏｏｌ、Ｃａｓ－ＯＦＦｉｎｄｅｒ、Ｅ－ＣＲＩＳＰ、ＣｈｏｐＣｈｏｐ、ＣａｓＯＴ、ＣＲＩＳＰＲダイレクト、ＣＲＩＳＰＯＲ、ＢＲＥＡＫＩＮＧ－ＣＡＳ、ＣｒｉｓｐＲＧｏｌｄ、及びＣＣＴｏｐが挙げられる。例えば、参照によりその全体が全ての目的に対して本明細書に組み込まれる、Ｓａｆａｒｉ，ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｈａｒｍａ．Ｂｉｏｔｅｃｈｏｌ．（２０１７）１８（１３）を参照されたい。そのようなツールはまた、例えば、ＰＣＴ出願公開第ＷＯ２０１４／０９３７０１Ａ１号及びＬｉｕ，ｅｔ ａｌ．，“Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ ａｐｐｒｏａｃｈｅｄ ｆｏｒ ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ ＣＲＩＳＰＲ ｇｕｉｄｅ ＲＮＡ ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ”，Ｃｏｍｐｕｔ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ．，２０２０；１８：３５－４４にも説明されており、それらの各々は、参照によりその全体が全ての目的に対して本明細書に組み込まれる。

【００５７】

本明細書で使用される場合、「Ｃａｓ９」は、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質を指し、Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムの活性酵素である。「ｎＣａｓ９」は、不活性化された２つのヌクレアーゼドメインのうちの１つ、すなわち、ＲｕｖＣ又はＨＮＨドメインのいずれかを有するＣａｓ９を指す。ｎＣａｓ９は、標的ＤＮＡの一本鎖のみを切断することができる（「ニッカーゼ」）。「Ｃａｓ９」という用語は、ＲＮＡガイド二本鎖ＤＮＡ結合ヌクレアーゼタンパク質若しくはニッカーゼタンパク質、又はそのバリアントを指す。本明細書では、「Ｃａｓ９」は、天然型及び組換えＣａｓ９ｓの両方を指す。野生型Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、異なるＤＮＡ鎖を切断する、２つの機能ドメイン、例えば、ＲｕｖＣ及びＨＮＨを有する。本明細書に説明されるＣａｓ９酵素は、ＨＮＨ若しくはＨＮＨ様ヌクレアーゼドメイン、並びに／又はＲｕｖＣ若しくはＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインを含み得る。Ｃａｓ９は、両方の機能ドメインが活性であるとき、ゲノムＤＮＡ（標的座位）において二本鎖切断を誘発し得る。Ｃａｓ９酵素は、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ、Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ、Ｆｉｌｉｆａｃｔｏｒ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ、Ｆｌａｖｉｉｖｏｌａ、Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ、Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ、Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ、及びＣａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒからなる群に属する細菌由来のＣａｓ９タンパク質の１つ以上の触媒ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、２つの触媒ドメインは、異なる細菌種に由来する。

【００５８】

本明細書で使用される場合、「ＰＡＭ」は、プロトスペーサー隣接モチーフを指し、Ｃａｓ９が標的ＤＮＡを結合するために必要であり、標的配列の直後にある。Ｃａｓ９は、例えば、タンパク質（例えば、組換えタンパク質）として、又は後から標的細胞で発現されるＣａｓ９タンパク質をコードする配列を含む核酸として、投与又は製剤化され得る。天然型Ｃａｓ９分子は、特定のＰＡＭ配列を認識する（例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ、

Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｓ．ｍｕｔａｎｓ、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ、及びＮ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓのＰＡＭ認識配列）。一実施形態では、Ｃａｓ９分子は、天然型Ｃａｓ９分子と同じＰＡＭ特異性を有する。他の実施形態では、Ｃａｓ９分子は、天然型Ｃａｓ９分子と関連付けられていないＰＡＭ特異性を有する。他の実施形態では、Ｃａｓ９分子のＰＡＭ特異性は、それが最も近い配列相同性を有する天然型Ｃａｓ９分子と関連付けられていない。例えば、天然型Ｃａｓ９分子は、ＰＡＭ配列認識が、オフターゲット部位を減少させるか、特異性を改善するか、又はＰＡＭ認識要件を排除するために改変されるように、改変され得る。一実施形態では、Ｃａｓ９分子は、改変され得る（例えば、ＰＡＭ認識配列を長くするために、Ｃａｓ９特異性を高レベルの同一性に改善するために、オフターゲット部位を減少させるために、及び／又は特異性を増加させるために）。一実施形態では、ＰＡＭ認識配列の長さは、少なくとも４、５、６、７、８、９、１０又は１５のアミノ酸長である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９分子は、ＰＡＭ認識を切除するように改変され得る。

【００５９】

「発現カセット」は、宿主細胞中の特定のポリヌクレオチド配列の転写を可能にする一連の特定の核酸エレメントを有する、組換え的又は合成的に生成された核酸構築物である。発現カセット又はベクターは、プラスミド、ウイルスゲノム、又は核酸断片の一部であってもよい。典型的には、発現カセット又はベクターは、転写され、プロモーターに作動可能に連結されるポリヌクレオチドを含む。

【００６０】

「プロモーター」という用語は、本明細書において、核酸の転写を誘導する核酸制御配列のアレイを指すために使用される。本明細書で使用される場合、プロモーターは、ポリメラーゼＩＩ型プロモーターの場合、ＴＡＴＡエレメントなどの、転写の開始部位の近くで必要な核酸配列を含む。プロモーターはまた、任意選択的に、転写の開始部位から数千塩基対程度に位置し得る、遠位エンハンサー又はリプレッサーエレメントを含む。発現ベクター中に存在し得る他のエレメントとしては、転写を増強する（例えば、エンハンサー）、及び転写を終了する（例えば、ターミネーター）エレメント、並びに発現ベクターから産生される組換えタンパク質に特定の結合親和性又は抗原性を付与するエレメントが挙げられる。

【００６１】

「作動可能に連結された」という用語は、遺伝的エレメントの並置を指し、エレメントは、それらが予期される様式で作動することを可能にする関係にある。例えば、プロモーターがコーディング配列の転写を開始するのを助ける場合、プロモーターは、コーディング領域に作動可能に連結される。この機能的関係が維持される限り、プロモーターとコーディング領域との間に介在する残基が存在し得る。

【００６２】

「単離された」プラスミド、核酸、ベクター、ウイルス、ビリオン、宿主細胞、又は他の物質は、物質若しくは同様の物質が自然に存在する場所、又は最初に調製された場所に存在する他の成分の少なくとも一部を欠いた物質の調製物を指す。したがって、例えば、単離された物質は、精製技術を使用して、ソース混合物からそれを濃縮することによって調製され得る。濃縮は、溶液の体積当たりの重量などの絶対的な基準で測定され得るか、又はソース混合物中に存在する第２の潜在的に干渉する物質に関連して測定され得る。本開示の実施形態の濃縮が増加すると、ますます単離される。単離されたプラスミド、核酸、ベクター、ウイルス、宿主細胞、又は他の物質は、いくつかの実施形態では、精製され、例えば、約８０％～約９０％純粋、少なくとも約９０％純粋、少なくとも約９５％純粋、少なくとも約９８％純粋、又は少なくとも約９９％以上純粋である。

【００６３】

本明細書で使用される場合、「ＡＡＶベクター」は、様々な核酸配列をコードするＡＡＶベクター核酸配列を指し、いくつかの実施形態では、バリアント又はキメラカプシドポリペプチドを含む（すなわち、ＡＡＶベクターは、バリアント又はキメラカプシドポリペ

プチドをコードする核酸配列を含む）。ＡＡＶベクターはまた、核酸挿入物の一部としてＡＡＶ起源ではない異種核酸配列も含み得る。この異種核酸配列は、典型的には、細胞の遺伝子形質転換のための関心対象の配列を含む。一般に、異種核酸配列は、少なくとも１つの、及び概して２つのＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）に隣接している。特定の実施形態では、Ｃａｓ配列、ガイドＲＮＡ配列、及び任意の他の遺伝的エレメント（例えば、プロモーター配列、ＰＡＭ配列など）は、対象に投与されたとき、同じＡＡＶベクター上、又は２つ以上の異なるＡＡＶベクター上にあってもよい。特定の実施形態では、Ｃａｓ配列、ガイドＲＮＡ配列、及び任意の他の遺伝的エレメント（例えば、プロモーター配列、ＰＡＭ配列など）は、対象に投与されたとき、２つ以上の異なるＡＡＶベクター上にあってもよく、ＡＡＶは、同じ血清型であってもよいか、又はＡＡＶは、２つ以上の異なる血清型（例えば、ＡＡＶ５及びＡＡＶ６）であってもよい。

【００６４】

「ＡＡＶビリオン」又は「ＡＡＶウイルス」又は「ＡＡＶウイルス粒子」又は「ＡＡＶベクター粒子」は、少なくとも１つのＡＡＶカプシドポリペプチド及びカプシド化ポリヌクレオチドＡＡＶ輸送ベクターから構成されるウイルス粒子を指す。粒子が異種核酸（すなわち、細胞に送達される導入遺伝子などの、野生型ＡＡＶゲノム以外のポリヌクレオチド）を含む場合、それは、「ＡＡＶベクター粒子」又は単に「ＡＡＶベクター」と称され得る。したがって、ＡＡＶビリオン又はＡＡＶ粒子の産生は、ベクターがＡＡＶビリオン又はＡＡＶ粒子内に含有されるため、ＡＡＶベクターの産生を必然的に含む。

【００６５】

本明細書で使用される場合、「担体」又は「ビヒクル」は、薬剤投与に好適な担体材料を指す。本明細書に有用な担体及びビヒクルは、無毒であり、有害な様式で組成物の他の成分と相互作用しない、当該技術分野で既知の任意のそのような材料、例えば、任意の液体、ゲル、溶媒、液体希釈剤、可溶化剤、界面活性剤などを含む。

【００６６】

「薬学的に許容される」という語句は、合理的な利益／リスク比に見合った、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、又は他の問題若しくは合併症なしで、ヒト及び動物の組織と接触して使用するのに好適な健全な医学的判断の範囲内にあるそのような化合物、材料、組成物、及び／又は剤形を指す。

【００６７】

「薬学的に許容される担体」又は「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、ありとあらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、並びに不活性成分を含むことが意図される。活性医薬成分に対するそのような薬学的に許容される担体又は薬学的に許容される賦形剤の使用は、当該技術分野で周知である。任意の従来的な薬学的に許容される担体又は薬学的に許容される賦形剤が活性医薬成分と適合しない場合を除いて、本開示の治療組成物におけるその使用が企図される。他の薬物などの追加の活性医薬成分もまた、説明される組成物及び方法に組み込まれ得る。

【００６８】

「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、その意図された機能の実施を促進するために化合物と同時投与されることができるビヒクル及び担体を含むことが意図される。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体の使用は、当該技術分野で周知である。そのようなビヒクル及び担体の例としては、溶液、溶媒、分散媒体、遅延剤、乳剤などが挙げられる。多結合化合物による使用に好適な任意の他の従来的担体もまた、本開示の範囲内に収まる。

【００６９】

本明細書で使用される場合、「ａ」、「ａｎ」、又は「ｔｈｅ」という用語は、概して、単数形及び複数形の両方を網羅すると解釈される。

【００７０】

「約」及び「およそ」という用語は、値の統計的に有意な範囲内を意味する。そのような範囲は、所定の値又は範囲から一桁以内、好ましくは５０％以内、より好ましくは２０

％以内、より好ましくはまだ１０％以内、更により好ましくは５％以内とすることができる。「約」又は「およそ」という用語によって包含される許容可能な変動は、研究中の特定の系に依存し、当業者によって容易に理解され得る。更に、本明細書で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、組成物、量、製剤、パラメータ、形状、並びに他の量及び特性が正確ではなく、かつ正確である必要はないが、近似、及び／又はより大きいか、若しくはより小さくてもよく、所望に応じて、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、及び当業者に既知の他の要因を反映することを意味する。一般的に、寸法、サイズ、製剤、パラメータ、形状、又は他の量若しくは特性は、明示的にそのように記載されているか否かにかかわらず、「約」又は「およそ」である。非常に異なるサイズ、形状、及び寸法の実施形態が、説明される配置を採用し得ることに留意されたい。

【００７１】

本明細書で使用される場合、「実質的に」という用語は、少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．９％、９９．９９％、又は少なくとも約９９．９９９％以上のように、大半、又は大部分を指し得る。

【００７２】

元の形態及び補正された形態で、添付の特許請求の範囲で使用されるとき、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という接続句は、列挙されていない追加の特許請求の範囲のどの要素又はステップが、存在する場合、特許請求の範囲から除外されるかに関して特許請求の範囲を定義する。「含む」という用語は、包括的又は非限定的であることを意図しており、いかなる追加の列挙されていない要素、方法、ステップ、又は材料も除外しない。「からなる」という用語は、特許請求の範囲に指定されるもの以外の任意の要素、ステップ、又は材料を除外し、後者の事例では、指定された材料と通常関連付けられる不純物を除外する。「から本質的になる」という用語は、特定の要素、ステップ、又は材料、並びに特許請求の範囲の方法及び組成物の基本的及び新規の特徴に実質的に影響しないものに、特許請求の範囲を限定する。本開示を具体化する本明細書に説明される全ての組成物、方法、及びキットは、代替的な実施形態では、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という接続句のいずれかによってより具体的に定義され得る。

【００７３】

本明細書に説明される方法又は組成物のいずれかによって治療される対象は、任意の年齢であり得、成人、幼児、又は子供であり得る。一部の場合、対象は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、若しくは９９歳、又はその範囲内である（例えば、限定なしで、２～２０歳、２０～４０歳、又は４０～９０歳）。対象は、ヒト又は非ヒト対象とすることができる。本開示の組成物及び方法から利益を得ることができる特定のクラスの対象は、４０歳、５０歳、又は６０歳を超える対象を含む。本開示の組成物及び方法から利益を得ることができる別のクラスの対象は、関節炎（例えば、変形性関節炎）を有する対象である。

【００７４】

本明細書に開示される組成物のいずれかは、実験室又は家畜動物などの、非ヒト対象に投与され得る。非ヒト対象の非限定的な例としては、実験室又は研究動物、ペット、野生又は家畜動物、家畜など、例えば、イヌ、ヤギ、モルモット、ハムスター、マウス、ブタ、非ヒト霊長類（例えば、ゴリラ、サル、オランウータン、キツネザル、ヒヒなど）、ラット、ヒツジ、ウマ、ウシなどが挙げられる。

【００７５】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム－最小要件

一態様では、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート、並びに本開示のＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡガイドヌクレアーゼ関連方法、構成要素、及び組成物（以下、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム）は、`核酸配列（例えば、ゲノムＤＮＡ）の増強をもたらすために、少なくとも１つの単離された又は非天然型のタンパク質構成要素（例えば、Ｃａｓタンパク質）及び少なくとも１つの単離された又は非天然型の核酸構成要素（例えば、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ））を最小限に必要とする。

【００７６】

いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、影響された遺伝子又は対立遺伝子の機能喪失（すなわち、ノックアウト）をもたらす、標的位置での配列の改変をもたらすことによる（例えば、挿入又は欠失（まとめて、インデル）を作成することによる）、真核細胞における標的遺伝子又は遺伝子座の改変；例えば、コードされたＩＬ１Ａ若しくはＩＬ１Ｂ　ｍＲＮＡ又はタンパク質のコードされた遺伝子産物の切断、ナンセンス変異、又は他のタイプの機能喪失をもたらす、例えば、ヌクレオチド置換；例えば、コードされたＩＬ１Ａ又はＩＬ１Ｂ遺伝子産物の切断、ナンセンス変異、又は他のタイプの機能喪失をもたらす、１つ以上のヌクレオチドの欠失；例えば、単一のヌクレオチド、二重ヌクレオチド、若しくは他のフレームシフト欠失、又は未成熟終止コドンをもたらす欠失によるコードされたｍＲＮＡ又はタンパク質の機能喪失；あるいは例えば、コードされたＩＬ１Ａ若しくはＩＬ１Ｂ　ｍＲＮＡ又はタンパク質などのコードされた遺伝子産物の切断、ナンセンス変異、又は他のタイプの機能喪失をもたらす挿入；例えば、単一のヌクレオチド、二重ヌクレオチド、若しくは他のフレームシフト挿入、又は未成熟終止コドンをもたらす挿入をもたらす。いくつかの実施形態では、本開示のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、標的位置で配列を改変すること、例えば、コードされた遺伝子産物、例えば、コードされた転写産物のナンセンス媒介性減衰をもたらすインデルを生成することによって、炎症性関節疾患（例えば、関節リウマチ又は変形性関節炎）に関連する遺伝子の改変（例えば、ノックアウト）を提供する。

【００７７】

一態様では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、ヌクレアーゼ活性を介して核酸の配列に変化をもたらす。例えば、ゲノムＤＮＡの場合、標的ゲノム配列（例えば、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）又は合成シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）の相補的構成要素）との配列相補性によって、標的化遺伝子又は遺伝子座内の標的位置に位置するタンパク質関連外因性核酸によってガイドされるヌクレアーゼは、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）と呼ばれる特定のヌクレアーゼ特異的モチーフを認識したときにゲノムＤＮＡを切断する。概して、Ｃｏｌｌｉａｓ，Ｄ．，＆Ｂｅｉｓｅｌ，Ｃ．Ｌ．（２０２１）．Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，１２（１），１－１２を参照されたい。

【００７８】

ヌクレアーゼ活性（すなわち、切断）は、ゲノムＤＮＡの場合、二本鎖切断（ＤＳＢ）を誘導する。ＤＳＢ修復の内因性細胞機構、すなわち、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）、マイクロホモロジー媒介性末端結合（ＭＭＥＪ）、及び相同組換えは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムの当該構成要素からの干渉の結果として、いくらかの計算可能な頻度で所与の標的位置での誤った修復をもたらし、それによって、置換又はゲノムＤＮＡへのインデルを導入する。概して、Ｓｃｕｌｌｙ，Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．（２０１９）．Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，２０（１１），６９８－７１４を参照されたい。いくらかの頻度では、これらのインデル及び／又は置換は、ｍＲＮＡ及び／若しくはタンパク質などの遺伝子産物の可用性に影響を与える、フレームシフト、ナンセンス変異（すなわち、早期終止コドン）、又は切断をもたらし得る。ある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、ヌクレアーゼ及びｇＲＮＡとともにシステムの一部として細胞に提供されるテンプレート（例えば、ＨＤＲテンプレート）の使用を通して、標的位置での非ランダム配列の挿入につながる相同性指向修復（ＨＤＲ）機構を誘導し得る。Ｂｌｏｈ，Ｋ．，＆Ｒｉｖｅｒａ－Ｔｏｒｒｅｓ，Ｎ．（２０２

１）．Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，２２（８），３８３４を参照されたい。

【００７９】

一般に、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムの最小要件は、それとともに提供されるヌクレアーゼ（すなわち、Ｃａｓタンパク質）に依存する。この程度まで、これらの細菌由来ヌクレアーゼは、Ｉ型、ＩＩＩ型、及びＶ型に機能的に分割されており、これらは全てクラス１、並びにクラス２に分類されるＩＩ型、ＩＶ型、及びＶＩ型に分類される。

【００８０】

クラス１ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム：

クラス１ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムを使用して標的核酸配列の変化をもたらすための正確な構成要素、組成物、及び方法は変化するが、最小限に、ヌクレアーゼ（少なくともＩ型及びＩＩＩ型から選択される）、１）ｓｇＲＮＡから選択される少なくとも１つのガイドＲＮＡ、又は２）ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの組み合わせを含むべきである。これらのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、真核細胞内の要件及び作用様式のそれらの類似性により、クラス１ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムとして一緒に分類されている。この目的のために、クラス１成分間の組成物、構成要素、及び方法は、機能的に互換性があるとみなされ得、単に例示的な目的のために提供される以下の詳細は、クラスメンバーの網羅的なリストを表していない。

【００８１】

Ｃａｓ３（表１を参照されたい）は、ゲノム編集が可能であるより大きな複合体（Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２を含むカスケード複合体）の一部としてエフェクタータンパク質として機能するプロトタイプＩ型ＤＮＡヌクレアーゼである。概して、Ｈｅ，Ｌ．，ｅｔ ａｌ．（２０２０）．Ｇｅｎｅｓ，１１（２），２０８を参照されたい。他のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムとは異なり、Ｉ型システムは、カスケード複合体を介してＣａｓ３ヌクレアーゼなしでＤＮＡ標的に局在化し、それは次いで、Ｃａｓ３を動員して、３’ＰＡＭを結合及び位置特定する際にＤＮＡを切断する。カスケード複合体はまた、ｃｒＲＮＡを標的位置にガイドするために使用され得るように、ｃｒＲＮＡを処理する責任も果たす。この機能性のため、カスケードは単一分子から複数のアレイ化ｃｒＲＮＡを処理する能力を有する。Ｌｕｏ，Ｍ．（２０１５）．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，４３（１），６７４－６８１を参照されたい。したがって、Ｉ型システムを使用して、単一分子から複数の標的化遺伝子又は遺伝子座を編集してもよい。

【００８２】

天然Ｃａｓ３基質はｓｓＤＮＡであるため、ゲノム編集におけるその機能はニカーゼであると考えられるが、しかしながら、タンデムで標的化された場合、結果として生じる編集は、Ｃａｓ９などの平滑切断エンドヌクレアーゼに近似させるための対向する鎖への平滑末端切断の結果である。Ｐｉｃｋａｒ－Ｏｌｉｖｅｒ，Ａ．，＆Ｇｅｒｓｂａｃｈ，Ｃ．Ａ．（２０１９）．Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ，２０（８），４９０－５０７を参照されたい。

【００８３】

Ｉ型ヌクレアーゼと同様に、ＩＩＩ型システムは、核酸切断をもたらすためにタンパク質の複合体に依存する。特に、Ｃａｓ１０は、原核生物においてｓｓＤＮＡを切断するためのヌクレアーゼ活性を有する。Ｔａｍｕｌａｉｔｉｓ，Ｇ．Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，２５（１），４９－６１を参考されたい。興味深いことに、古細菌原産のこのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、二重特異性を示し、ｓｓＤＮＡ及びｓｓＲＮＡの両方を標的とする。この変化を除いて、システムは、ｃｒＲＮＡが配列依存的様式でエフェクター複合体（カスケードに類似）を標的とするという点で、Ｉ型と非常に類似して機能する。同様に、エフェクター複合体は、会合前にｃｒＲＮＡを処理する。このヌクレアーゼの二重の性質は、ゲノムＤＮＡと、場合によっては同じ配列を有するｍＲＮＡの両方が、特定の標的化遺伝子をサイレンシングするように標的化され得るため、潜在的にゲノム編集へのその用途をより強力にする。

【００８４】
クラス２　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム：
　クラス２　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムを使用して標的核酸配列の変化をもたらすための正確な構成要素、組成物、及び方法は変化するが、最小限に、ヌクレアーゼ（少なくともＩＩ型及びＶ型から選択される）、１）ｓｇＲＮＡから選択される少なくとも１つのガイドＲＮＡ、又は２）ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの組み合わせを含むべきである。これらのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、真核細胞内の要件及び作用様式のそれらの類似性により、クラス２　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムとして一緒に分類されている。この目的のために、クラス２成分間の組成物、構成要素、及び方法は、機能的に互換性があるとみなされ得、単に例示的な目的のために提供される以下の詳細は、クラスメンバーの網羅的なリストを表していない。
【００８５】
　ＩＩ型ヌクレアーゼは、最良に特徴付けられたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムであり、特に標準的なゲノム編集ヌクレアーゼＣａｓ９である（表１を参照されたい）。様々な細菌種に由来する複数のＣａｓ９タンパク質が単離されている。これらのヌクレアーゼ間の主な違いは、標的化ｄｓＤＮＡ内の必要な認識部位であるＰＡＭである。ｇＲＮＡ分子との会合後、ｃｒＲＮＡ（又はｓｇＲＮＡの標的化ドメイン）は、ヌクレアーゼを適切な位置に配向するが、ＰＡＭのタンパク質認識は、その部位の近くで切断事象を誘導し、平滑ＤＳＢをもたらすものである。
【００８６】
　天然由来のＣａｓ９タンパク質に加えて、いくつかの操作されたバリアントも同様に報告されている。これらは、ｅｓｐＣａｓ９などの増強された特異性（すなわち、より低いオフターゲット活性）を有するＣａｓ９からの範囲である。他のものは、ＲｕｖＣ（例えば、Ｄ１０Ａ）ドメイン及びＨＮＨ（例えば、Ｈ８４０Ａ）ドメインにおける点変異を介して触媒的に修飾されており、その結果、それらは、一本鎖切断（すなわち、Ｃａｓ９ニッカーゼ）のみを誘導する。Ｆｒｏｃｋ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．（２０１５）．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３３（２），１７９－１８６を参照されたい。これらのバリアントは、本明細書において集合的に、特異性が増強されたＣａｓ９バリアント（ｓｐＣａｓ９）と称され、編集においてエラーを起こしにくいとも示されている。オフターゲット効果のこのような軽減は、欠失ではなく、所望の挿入（すなわち、所望のヌクレオチド配列が標的核酸分子に導入されるノックイン変異）を選択するときに最重要となる。実際に、オフターゲット効果が少ないことは、好ましいＤＮＡ修復機構（ほとんどの場合、ノックイン変異のためのＨＤＲ）を補助し得る。概して、Ｎａｅｅｍ，Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．（２０２０）．Ｃｅｌｌｓ，９（７），１６０８を参照されたい。
【００８７】
　正準Ｃａｓタンパク質の追加の例示的な更なる操作されたバリアント（例えば、変異体、キメラ、及び）は、以下（参照により本明細書に組み込まれる）：ＷＯ２０１５／０３５１６２Ａ２、ＷＯ２０１９／１２６７１６Ａ１、ＷＯ２０１９／１２６７７４Ａ１、ＷＯ２０１４／０９３６９４Ａ１、及びＷＯ２０１４／１５０６２４Ａ１を含む。
【００８８】
　疑義を避けるために付言すると、ｓｐＣａｓ９は集合的に、ｅｓｐＣａｓ９（本明細書でＥＳＣａｓ９又はｅｓＣａｓ９とも称される）、ＨＦＣａｓ９、ＰＥＣａｓ９、ａｒＣａｓ９からなる群のうちのいずれか１つを指す。
【００８９】
　正準Ｃａｓ９システムと同様に、Ｖ型ヌクレアーゼは、ゲノム編集を実施するためにゲノム配列に相補的な標的化ドメインを有する合成ｓｇＲＮＡのみを必要とする。これらのヌクレアーゼは、ＲｕｖＣドメインを含むが、ＩＩ型ヌクレアーゼのＨＮＨドメインを欠く。更に、Ｃａｓ１２は、例えば、ＰＡＭの隣のＣａｓ９の平滑切断と比較して、ＰＡＭの遠位にｄｓＤＮＡ基質に互い違いの切断を残す。Ｃｐｆ１としても知られるＣａｓ１２ａ、及びＣ２ｃ１としても知られるＣａｓ１２ｂの両方は（表１を参照されたい）、各鎖

を同時にニックする四次構造としてｄｓＤＮＡに作用する２つのｇＲＮＡ関連ヌクレアーゼ）のより大きな複合体の一部として作用する。Ｚｅｔｓｃｈｅ Ｂ，，ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ．２０１５；１６３（３）：７５９－７７１を参照されたく、Ｌｉｕ Ｌ，Ｃｈｅｎ Ｐ，Ｗａｎｇ Ｍ，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ．２０１７；６５（２）：３１０－３２２もまた参照されたい。更に、Ｃａｓ１２ｂ（Ｃ２ｃ１）は、ミスマッチに対する耐性がほとんどない非常に正確なヌクレアーゼである。Ｙａｎｇ Ｈ，ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ．２０１６；１６７（７）：１８１４－１８２８．ｅ１２を参照されたい。

【表２】

表１．Ｃａｓヌクレアーゼ及びその要件の例示的なリスト

ヌクレアーゼ(種)	PAM(5’→3’)	生成された末端のタイプ(核酸標的)	スペーサー長さ(nt)
Cas9(S.pyogenes)	NGG	平滑(dsDNA)	20
Cas9(S.aureus)	NNGRRT	平滑(dsDNA)	20
Cas9(C.jejuni)	NNNNRYAC	平滑(dsDNA)	22
Cas 9(S.thermophilus)	NNAGAAW	平滑(dsDNA)	20
Cas 9(N.meningitidis)	NNNNGATT	平滑(dsDNA)	24
Cas 9(F.novicida)	NGG	平滑(dsDNA)	21
Cas12a(L.bacterium)	TTTV	5’互い違い(dsDNA/ssDNA)	23-25
Cas12a(Acidaminococcus sp.)	TTTN	5’互い違い(dsDNA/ssDNA)	24
Cas3(E.coli)	CTT/CCT/CAT/CTC	なし/平滑(ssDNA)	32

概して、Ｗａｎｇ，Ｊ．，Ｚｈａｎｇ，Ｃ．，＆Ｆｅｎｇ，Ｂ．（２０２０）．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２４（６），３２５６－３２７０を参照されたく、Ｎ＝任意のヌクレオチドであり、Ｒ＝任意のプリン（Ａ又はＧ）であり、Ｙ＝任意のピリミジン（Ｃ又はＴ）であり、Ｗ＝Ａ又はＴであり、Ｖ＝Ａ、Ｃ、又はＧである。

【００９０】

一態様では、本開示のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、以下の選択された細菌属：Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ、Ｆｉｌｉｆａｃｔｏｒ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ、Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｓｐｉｒｏｃｈａｅｔａ、Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ、Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ、Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ、及びＰｒｅｖｏｔｅｌｌａのうちの１つ以上に由来する少なくとも１つのＣａｓタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｄｅｌｔａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ又はＰｌａｎｃｔｏｍｙｃｅｔｅｓ細菌種に由来する。

【００９１】

本開示のいくつかの態様は、標的化遺伝子産物の機能喪失をもたらす、ＲＮＡガイドヌクレアーゼ及び１つ以上のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）によって媒介される１つ以上のヌクレオチドの挿入又は欠失によって、遺伝子座内の標的化配列を改変する（例えば、細胞中、あるいは関節リウマチ、変形性関節炎、又は関節若しくはその中の細胞の他の炎症性疾患の作用を有するか、若しくはそれを経験している患者において、野生型及び／又は変異体の配列を改変する）ための戦略、方法、組成物、及び治療モダリティを提供する。その

ような改変は、代替的に、目的の遺伝子を「ノックアウト」する（すなわち、「ノックアウト」の生成）と称される。

【００９２】

ある特定の実施形態では、ＩＬ１Ａ遺伝子の任意の領域（例えば、５’非翻訳領域［ＵＴＲ］、エクソン１、エクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、エクソン７、イントロン領域、イントロン／エクソン接合部、３’ＵＴＲ、又はポリアデニル化シグナル）は、ＲＮＡガイドヌクレアーゼによって標的化されて、遺伝子を改変する。ある特定の実施形態では、ＩＬ１Ｂ遺伝子の任意の領域（例えば、５’非翻訳領域［ＵＴＲ］、エクソン１、エクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、エクソン７、イントロン領域、イントロン／エクソン接合部、３’ＵＴＲ、又はポリアデニル化シグナル）は、ＲＮＡガイドヌクレアーゼによって標的化されて、遺伝子を改変する。ある特定の実施形態では、標的化遺伝子は、炎症性エフェクター（例えば、ＩＬ１Ａ、ＩＬ１Ｂ、ＩＬ１Ｒ１、ＩＬ１Ｒ２、ＩＬ６、ＩＬ１８、ＴＮＦ、ＴＧＦＢ１から選択される。いくつかの実施形態では、標的化遺伝子の任意の領域（例えば、プロモーター領域、５’非翻訳領域、３’非翻訳領域、エクソン、イントロン、又はエクソン／イントロン境界）は、ＲＮＡガイドヌクレアーゼによって標的化されて、遺伝子を改変する。いくつかの実施形態では、標的化遺伝子の非コード領域（例えば、エンハンサー領域、プロモーター領域、イントロン、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、ポリアデニル化シグナル）は、標的化されて、遺伝子を改変する。

【００９３】

ＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ：

一態様では、本開示のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、Ｃａｓタンパク質と相互作用するｇＲＮＡ分子（例えば、単離又は非天然型ＲＮＡ分子）を更に提供する。ある特定の実施形態では、ｇＲＮＡは、標的化遺伝子由来の標的ドメインと相補的であるヌクレオチド配列を含む標的化（すなわち、相補性）ドメインが、タンパク質相互作用ドメインを有する単一のＲＮＡ分子に組み込まれるｓｇＲＮＡである。ある特定の実施形態では、標的化ドメインは、ｔｒａｃｒＲＮＡを有する真核細胞に提供されるｃｒＲＮＡであり、これは、ｃｒＲＮＡ及びヌクレアーゼの両方との相互作用を介して足場として作用する。いくつかの実施形態では、システムは更に、任意選択で、標的位置のいずれかの側に相同性を有するオリゴヌクレオチド－ＨＤＲテンプレートから構成されている。Ｂｌｏｈ，Ｋ．，＆Ｒｉｖｅｒａ－Ｔｏｒｒｅｓ，Ｎ，ａｔ　３８３６を参照されたい。

【００９４】

一実施形態では、ｇＲＮＡ分子の標的化ドメインは、切断事象が（例えば、二本鎖切断又は一本鎖切断）、標的化遺伝子又は遺伝子座の標的位置に十分に近接して生じ、それによって核酸配列の改変を促進するように、関連するヌクレアーゼを配向するように構成されている。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、２０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、又は３０ヌクレオチド長である。

【００９５】

いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、切断事象が、標的位置の１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１２５、１５０、１７５、又は２００ヌクレオチド以内に生じるように、ヌクレアーゼを配向する。二本鎖又は一本鎖切断は、標的位置の上流又は下流、及び標的化遺伝子内の機能的ドメインクラスター内又は上流のいずれかに位置付けられてもよい。

【００９６】

ある特定の実施形態では、第２の標的化ドメインを含む第２のｇＲＮＡ分子は、切断事象が、標的化遺伝子又は遺伝子座の標的位置に十分に近接して生じ、それによって核酸配列の改変を促進するように、第２の関連するヌクレアーゼを配向する。一実施形態では、

第２のｇＲＮＡ分子は、第１のｇＲＮＡ分子と同じ標的化遺伝子又は遺伝子座を標的とする。他の実施形態では、第２のｇＲＮＡ分子は、第１のｇＲＮＡ分子とは異なる標的化遺伝子又は遺伝子座を標的とする。いくつかの実施形態では、第２の標的化ドメインは、２０ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、第２の標的化ドメインは、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、又は３０ヌクレオチド長である。

【００９７】

いくつかの実施形態では、第２の標的化ドメインは、切断事象が、標的位置の１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１２５、１５０、１７５、又は２００ヌクレオチド以内に生じるように、ヌクレアーゼを配向する。二本鎖又は一本鎖切断は、標的位置の上流又は下流、及び標的化遺伝子内の機能的ドメインクラスター内又は上流のいずれかに位置付けられてもよい。

【００９８】

一実施形態では、第１及び第２のｇＲＮＡ分子の標的化ドメインは、切断事象が、ｇＲＮＡ分子の各々に対して独立して、それぞれの標的位置の１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１２５、１５０、１７５、又は２００ヌクレオチド以内に位置付けられるように構成されている。一実施形態では、第１及び第２のｇＲＮＡ分子は、標的核酸配列を同時に改変する。一実施形態では、第１及び第２のｇＲＮＡ分子は、標的核酸配列を逐次的に改変する。

【００９９】

一実施形態では、一本鎖切断は、それぞれ第１及び第２のｇＲＮＡ分子の標的化ドメインによって位置付けられた第２の一本鎖切断を伴う。例えば、標的化ドメインは、切断事象（例えば、２つの一本鎖切断）が、標的位置の１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１２５、１５０、１７５、又は２００ヌクレオチド内に位置付けられるように、関連するヌクレアーゼを配向し得る。一実施形態では、第１及び第２のｇＲＮＡ分子の標的化ドメインは、例えば、２つの一本鎖切断が、同じ標的位置で、又は互いに１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０ヌクレオチド以内に、ゲノムＤＮＡの対向する鎖上で生じ、それによって本質的に二本鎖切断に近似するように、関連するヌクレアーゼを配向するように構成されている。

【０１００】

一実施形態では、核酸は、図５の配列から選択される第１のｇＲＮＡ分子の標的化ドメイン及び第２のｇＲＮＡ分子の標的化ドメインをコードする。一実施形態では、核酸は、図７の配列から選択される第１のｇＲＮＡ分子の標的化ドメイン及び第２のｇＲＮＡ分子の標的化ドメインをコードする。一実施形態では、核酸は、第１のｓｇＲＮＡ分子をコードする。一実施形態では、核酸は、第２のｓｇＲＮＡ分子をコードする。一実施形態では、核酸は、第３のｓｇＲＮＡ分子をコードする。一実施形態では、核酸は、第４のｓｇＲＮＡ分子をコードする。

【０１０１】

一実施形態では、核酸は、図５の配列から選択される第１のｇＲＮＡ分子のｃｒＲＮＡ配列及び第２のｇＲＮＡ分子のｃｒＲＮＡ配列をコードする。一実施形態では、核酸は、図７の配列から選択される第１のｇＲＮＡ分子のｃｒＲＮＡ配列及び第２のｇＲＮＡ分子のｃｒＲＮＡ配列をコードする。一実施形態では、核酸は、ｃｒＲＮＡ配列及びｔｒａｃｒＲＮＡからなる第１のｇＲＮＡ分子をコードする。一実施形態では、核酸は、ｃｒＲＮＡ配列及びｔｒａｃｒＲＮＡからなる第２のｇＲＮＡ分子をコードする。一実施形態では、核酸は、ｃｒＲＮＡ配列及びｔｒａｃｒＲＮＡからなる第３のｇＲＮＡ分子をコードする。一実施形態では、核酸は、ｃｒＲＮＡ配列及びｔｒａｃｒＲＮＡからなる第４のｇＲＮＡ分子をコードする。

【０１０２】
ある特定の実施形態では、核酸は、キメラｇＲＮＡ分子を含む、第１のｇＲＮＡ分子及び第２のｇＲＮＡ分子をコードする。他の実施形態では、核酸は、キメラｇＲＮＡ分子を含む、第１のｇＲＮＡ分子、第２のｇＲＮＡ分子、及び第３のｇＲＮＡ分子をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、キメラｇＲＮＡ分子を含む、第１のｇＲＮＡ分子、第２のｇＲＮＡ分子、第３のｇＲＮＡ分子、及び第４のｇＲＮＡ分子をコードする。
【０１０３】
ある特定の実施形態では、核酸は、（ａ）標的化遺伝子又は遺伝子座の標的位置と相補的である標的化ドメインを含む第１のｇＲＮＡ分子をコードする配列、（ｂ）第２の標的化遺伝子又は遺伝子座の標的位置と相補的である標的化ドメインを含む第２のｇＲＮＡ分子をコードする配列、及び（ｃ）ＲＮＡガイドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９又は他のＣａｓタンパク質）をコードする配列を含み得る。任意選択で、（ｄ）及び（ｅ）は、それぞれ、第３及び第４のｇＲＮＡ分子をコードする配列である。いくつかの実施形態では、第２の標的化遺伝子又は遺伝子座は、第１の標的化遺伝子又は遺伝子座と同じである。他の実施形態では、第２の標的化遺伝子又は遺伝子座は、第１の標的化遺伝子又は遺伝子座と異なる。いくつかの実施形態では、（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）は、同じ核酸分子（すなわち、同じベクター、同じウイルスベクター、同じアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター）内にコードされる。いくつかの実施形態では、（ａ）及び（ｂ）は、同じ核酸分子内でコードされる。いくつかの実施形態では、（ａ）、（ｂ）、及び（ｄ）は、同じ核酸分子内でコードされる。いくつかの実施形態では、（ａ）、（ｂ）、及び（ｅ）は、同じ核酸分子内でコードされる。いくつかの実施形態では、（ａ）、（ｂ）、（ｄ）、及び（ｅ）は、同じ核酸分子内でコードされる。いくつかの実施形態では、（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）は、別個の核酸分子内でコードされる。３つ以上のｇＲＮＡを使用する場合、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、及び（ｅ）の任意の組み合わせは、単一又は別個の核酸分子内でコードされ得る。
【０１０４】
ある実施形態では、核酸分子は、ＡＡＶベクターである。本開示の任意のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムとともに使用され得る例示的なＡＡＶベクターとしては、ＡＡＶ１ベクター、ＡＡＶ２ベクター、ＡＡＶ３ベクター、ＡＡＶ４ベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶ１０ベクターが挙げられる。
【０１０５】
いくつかの実施形態では、（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）は、同じベクター内でコードされる。いくつかの実施形態では、（ａ）及び（ｂ）は、同じベクター内でコードされる。いくつかの実施形態では、（ａ）、（ｂ）、及び（ｄ）は、同じベクター内でコードされる。いくつかの実施形態では、（ａ）、（ｂ）及び、（ｅ）は、同じベクター内でコードされる。いくつかの実施形態では、（ａ）、（ｂ）、（ｄ）、及び（ｅ）は、同じベクター内でコードされる。いくつかの実施形態では、（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）は、別個のベクター内でコードされる。３つ以上のｇＲＮＡを使用する場合、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、及び（ｅ）の任意の組み合わせは、単一又は別個のベクター内でコードされ得る。
【０１０６】
一態様では、核酸分子（すなわち、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、又は（ｅ）をコードするもの）は、標的細胞に送達される（すなわち、（ｃ）のコードされたＲＮＡガイドヌクレアーゼと、（ａ）、（ｂ）、（ｄ）、又は（ｅ）の少なくとも１つのコードされたｇＲＮＡ分子との任意の組み合わせは、標的細胞に接触する）。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、インビボで標的細胞に送達される。他の実施形態では、当該核酸分子は、エクスビボで標的細胞に送達される。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、インビトロで標的細胞に送達される。ある特定の実施形態では、当該核酸分子は、ＤＮＡとして標的細胞に送達される。他の実施形態では、当該核酸分子は、ＲＮＡ（例えば、m

ＲＮＡ）として標的細胞に送達される。いくつかの実施形態では、当該核酸分子の産物は、アセンブリされたリボ核タンパク質（ＲＮＰ）として送達される。

【０１０７】

一実施形態では、標的細胞を接触させることは、（ａ）、（ｂ）、（ｄ）、及び（ｅ）から選択される少なくとも１つの当該核酸分子とともにタンパク質又はｍＲＮＡとして、（ｃ）の該コードされたＲＮＡガイドヌクレアーゼを送達することを含む。

【０１０８】

一実施形態では、標的細胞を接触させることは、（ａ）、（ｂ）、（ｄ）、及び（ｅ）から選択される少なくとも１つの当該核酸分子とともにＤＮＡとして、（ｃ）の該コードされたＲＮＡガイドヌクレアーゼを送達することを含む。

【０１０９】

ある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ構成要素は、ナノ粒子を介して標的細胞に送達される。本明細書に開示される全てのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムとともに使用され得る例示的なナノ粒子としては、少なくとも脂質ナノ粒子又はリポソーム、ハイドロゲルナノ粒子、金属有機ナノ粒子、金ナノ粒子、及び磁性ナノ粒子が挙げられる。概して、Ｘｕ，Ｃ．Ｆ．，ｅｔ ａｌ．（２０２１）．Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ，１６８，３－２９を参照されたい。

【０１１０】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似又は同等の方法及び材料が、本開示の実施又は試験に使用され得るが、好適な方法及び材料を以下に記載する。本明細書に言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。加えて、材料、方法、及び実施例は例示に過ぎず、限定することを意図するものではない。

【０１１１】

本開示は、炎症成分による関節障害を治療するために有用な組成物を提供する。いくつかの態様では、組成物は、変形性関節炎の進行を予防し、哺乳動物関節における変形性関節炎を治療するために有用である。

【０１１２】

いくつかの態様では、医薬組成物は、遺伝子編集システムを含み、遺伝子編集システムは、関節機能に関連する少なくとも１つの遺伝子座の発現を、関節を含む細胞の少なくとも一部分においてサイレンシング又は低減させる。

【０１１３】

一態様では、医薬組成物が、遺伝子編集システムを含み、遺伝子編集システムが、ＩＬ－１α及び／又はＩＬ－１βのうちの１つ以上を標的とする。いくつかの態様では、医薬組成物は、遺伝子編集システムを含み、遺伝子編集システムは、ＴＮＦ－α、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１８、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、又はＮＬＲＰ３インフラマソームの成分のうちの１つ以上を標的とする。

【０１１４】

いくつかの態様では、医薬組成物が、遺伝子編集システムを含み、遺伝子編集が、関節機能に関連する少なくとも１つの遺伝子座で二本鎖又は一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能ヌクレアーゼの使用を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムは、標的遺伝子座の遺伝子発現を低減する。いくつかの実施形態では、関節組織に関連する少なくとも１つの遺伝子座は、関節を含む細胞の少なくとも一部分においてサイレンシング又は低減される。

【０１１５】

いくつかの態様では、関節を含む細胞は、滑膜細胞である。一部の態様では、細胞が、滑膜マクロファージである。一部の態様では、細胞が、滑膜線維芽細胞である。一部の態様では、滑膜細胞の少なくとも一部分が編集される。いくつかの態様では、関節を含む細胞は、軟骨細胞である。

【０１１６】
一態様では、医薬組成物は、１つ以上のサイトカインを標的とする、及び／又は成長因子遺伝子が、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１８、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、又はＮＬＲＰ３インフラマソームの成分を含む群から選択される。いくつかの実施形態では、ＮＬＲＰ３インフラマソームの成分は、ＮＬＲＰ３、ＡＳＣ（ＣＡＲＤを含有するアポトーシス関連スペック様タンパク質）、カスパーゼ－１、及びそれらの組み合わせを含む。
【０１１７】
遺伝子編集が、１つ以上のサイトカイン及び／又は成長因子遺伝子の発現を、関節を含む細胞の少なくとも一部分において増強させ、サイトカイン及び／又は成長因子遺伝子が、ＩＬ－１Ｒａ、ＴＩＭＰ－１、ＴＩＭＰ－２、ＴＩＭＰ－３、ＴＩＭＰ－４、及びそれらの組み合わせを含む群から選択される、医薬組成物も提供される。
【０１１８】
いくつかの実施形態では、医薬組成物が、遺伝子編集のために提供され、遺伝子編集が、１つ以上のサイトカイン及び／又は成長因子遺伝子で二本鎖又は一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能ヌクレアーゼの使用を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ジンクフィンガー法、及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を含む。
【０１１９】
一態様では、遺伝子編集は、ＣＲＩＳＰＲ法を含む。更に他の態様では、ＣＲＩＳＰＲ法は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９法である。いくつかの態様では、Ｃａｓ９は、機能を増強するために変異される。
【０１２０】
変形性関節炎の動物モデル
変形性関節炎の数個の動物モデルが、当該技術分野で既知である。例示的な非限定的な動物モデルが要約されるが、様々なモデルが使用され得ることが理解される。多くの異なる種の動物が、ＯＡを模倣するために使用され、例えば、研究は、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ブタ、ウマ、及び更に他の動物に対して実施されている。例えば、Ｋｕｙｉｎｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｏｒｔｈｏｐ Ｓｕｒｇ Ｒｅｓ．１１：１９（２０１６）（以下、「Ｋｕｙｉｎｕ，２０１６」）を参照されたい。
【０１２１】
ＯＡを誘導するための様々な方法が、任意の哺乳動物で使用され得ることが理解される。マウスでは、自然発生、化学的誘導、外科的誘導、及び非侵襲的誘導が、一般的に使用される。例えば、Ｋｕｙｉｎｕ，２０１６、Ｂａｐａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ．７：３６（２０１８）（以下、「Ｂａｐａｔ，２０１８」）、及びＰｏｕｌｅｔ，Ｃｕｒｒ Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ Ｒｅｐ１８：４０（２０１６）。ウマでは、骨軟骨断片運動モデル、化学的誘導、外傷性誘導、及び過剰使用を通じた誘導が、一般的に使用される。ヒツジでは、外科的誘導が最も一般的であり、モルモットでは、外科的誘導、化学的誘導、及び自然発生（Ｄｕｒｋｉｎ Ｈａｒｔｌｅｙ）方法が多くの場合に使用される。例えば、Ｂａｐａｔ，２０１８。
【０１２２】
不安定化された内側半月板（ＤＭＭ）が、多くの場合、外傷後変形性関節炎をモデル化するためにマウスで使用される、例えば、Ｃｕｌｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．１２２６：１４３－７３（２０１５）。ＤＭＭモデルは、臨床的な半月板損傷、ヒトＯＡの発症の既知の素因を模倣し、疾患の経過にわたる構造的及び生物学的変化の研究を可能にする。遺伝的背景が定義されたマウス系統が使用され得るため、マウスは、魅力的なモデル生物である。加えて、ノックアウト又は他の遺伝子操作されたマウス系統が、様々なＯＡ治療様式及びレジメンに対する応答における様々な分子経路の重要性を評価するために使用され得る。例えば、ＳＴＲ／ｏｒｔマウスは、炎症性サイトカインＩＬ１βの増加したレベルを含む、ＯＡを特に発症し易い系統を作製する特徴を有す

る（Ｂａｐａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ．７：３６（２０１８））。これらのマウスは、膝、足首、肘、及び顎関節でＯＡを一般的に発症する（Ｊａｅｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｏｓｔｅｏａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｃａｒｔｉｌａｇｅ１６：６０７－６１４（２００８））。マウスの他の有用な変異株は、当業者に既知であり、例えば、Ｃｏｌ９ａ１（－／－）マウスである（Ａｌｌｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍ，６０：２６８４－２６９３（２００９））。

【０１２３】

ＯＡに対する別の一般的に使用される外科的モデルは、前十字靭帯離断（ＡＣＬＴ）モデルである。Ｌｉｔｔｌｅ ａｎｄ Ｈｕｎｔｅｒ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．，９（８）：４８５－４９７（２０１３）。対象のＡＣＬは、外科的に切断され、関節不安定化を引き起こす。屈曲した関節を用いた前方引き出し試験が、靭帯の離断が発生したことを確認するために使用される。一部の場合、後十字靭帯、内側側副靭帯、外側側副靭帯、及び／又は半月板のいずれかなどの他の靭帯が、切断されてもよい。ＤＭＭモデルと同様に、様々なマウス系統が、様々な分子経路を調査するために使用され得る。

【０１２４】

技術的目的に応じて、様々なサイズの動物が、使用のために選択され得る。げっ歯類は、骨格成熟に必要な時間が短く、結果として、ＯＡを誘発する外科手術又は他の技術に続くＯＡの発症時間がより短いため、有用である。より大きな動物は、治療的介入を評価するために特に有用である。より大きな動物の解剖学的構造は、ヒトと非常に類似しており、例えば、イヌでは、軟骨の厚さが、ヒトの厚さの約半分未満であり、この顕著な類似性は、そのような軟骨変性及び骨軟骨欠損の研究が、大型動物モデルではるかに有用である理由の例である。例えば、ＭｃＣｏｙ，Ｖｅｔ．Ｐａｔｈｏｌ．，５２：８０３－１８（２０１５）、及びＰｅｌｌｅｔｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅｒａｐｙ，７：６２１－３４（２０１０）。

【０１２５】

遺伝子編集プロセス

概要：滑膜細胞を遺伝子編集するための組成物

本開示の実施形態は、滑膜細胞（滑膜細胞）を遺伝子編集するための方法を対象とし、変形性関節炎又は他の関節障害を治療するために関節内の滑膜細胞の少なくとも一部分を遺伝子編集する１つ以上のステップを含む。本明細書で使用される場合、「遺伝子編集」、「遺伝子編集」、及び「ゲノム編集」は、細胞のゲノム内でＤＮＡが恒久的に修飾される、例えば、ＤＮＡが細胞のゲノム内で挿入、欠失、修飾、又は置換される、遺伝子修飾のタイプを指す。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現をサイレンシング（時に遺伝子ノックアウトと称される）又は阻害／低減（時に遺伝子ノックダウンと称される）させる。他の実施形態では、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現を増強させる（例えば、過剰発現を引き起こすことによって）。本開示の実施形態によると、遺伝子編集技術は、炎症誘発性遺伝子の発現を低減させるか、若しくは炎症誘発性遺伝子をサイレンシングする、及び／又は再生遺伝子の発現を増強するために使用される。

【０１２６】

インターロイキン

追加の実施形態によると、本開示の遺伝子編集方法は、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＩＬ－１８、及びＴＮＦ－αのうちの１つ以上などの、特定のインターロイキンの発現を増加させるために使用され得る。ある特定のインターロイキンは、関節組織における炎症反応を増強させ、疾患進行に関連していることが実証されている。

【０１２７】

発現構築物

ガイドＲＮＡ及び／又はＣａｓ９編集酵素のうちの一方又は両方をコードする発現構築物は、任意の有効な担体、例えば、成分遺伝子をインビボで細胞に効果的に送達することができる任意の製剤又は組成物で投与され得る。アプローチとしては、例えば、組換えレ

トロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、及び単純ヘルペスウイルス－１、又は組換え細菌若しくは真核プラスミドを含む、ウイルスベクターにおける電気穿孔及び／又は挿入が挙げられる。ウイルスベクターは、細胞を直接的にトランスフェクトし、プラスミドＤＮＡは、裸で送達されるか、あるいは、例えば、カチオン性リポソーム（リポフェクタミン）、若しくは誘導体化された（例えば、抗体コンジュゲートされた）、ポリリシンコンジュゲート、グラマシジンＳ、人工ウイルスエンベロープ、又は他のそのような細胞内担体、並びにインビボで実施される遺伝子構築物又は$CaPO_4$沈殿物の直接注射の助けによって送達され得る。

【０１２８】

細胞内への核酸のインビボ導入のための好ましいアプローチは、例えば、ｃＤＮＡなどの核酸を含有するウイルスベクターの使用によるものである。ウイルスベクターを用いた細胞の感染は、標的細胞の大部分が核酸を受容し得るという利点を有する。加えて、ウイルスベクター内に、例えば、ウイルスベクター中に含有されるｃＤＮＡによってコードされる分子は、ウイルスベクター核酸を取り込んだ細胞において効率的に発現される。

【０１２９】

レトロウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターは、インビボの、特にヒトへの外因性遺伝子の輸送のための組換え遺伝子送達システムとして使用され得る。これらのベクターは、細胞内への遺伝子の効率的な送達を提供する。いくつかの事例では、輸送された核酸は、宿主の染色体ＤＮＡに安定的に組み込まれる。他の事例では、特にアデノ随伴ウイルスベクターについて、宿主ＤＮＡへの安定的な組み込みは、稀な事象であり得、結果として、導入遺伝子のエピソーム発現及び導入遺伝子の一過性発現をもたらす。

【０１３０】

複製欠損レトロウイルスのみを産生する特殊細胞株（いわゆる「パッケージング細胞」）の開発は、遺伝子療法のためのレトロウイルスの有用性を増加させ、欠損レトロウイルスは、遺伝子療法目的のための遺伝子導入における使用に対して特徴付けられる（総説については、Ｍｉｌｌｅｒ，Ｂｌｏｏｄ　７６：２７１（１９９０）を参照されたい）。複製欠損レトロウイルスは、標準的な技術によるヘルパーウイルスの使用を通じて標的細胞を感染させるために使用され得るビリオンにパッケージングされ得る。組換えレトロウイルスを産生し、インビトロ又はインビボでそのようなウイルスで細胞を感染させるためのプロトコルは、Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，（１９８９），Ｓｅｃｔｉｏｎｓ　９．１０－９．１４、及び他の標準的な実験マニュアルに見出され得る。好適なレトロウイルスの例としては、当業者に既知である、ｐＬＪ、ｐＺＩＰ、ｐＷＥ、及びｐＥＭが挙げられる。異方性及び両指向性レトロウイルス系の両方を調製するための好適なパッケージングウイルス株の例としては、ΨＣｒｉｐ、ΨＣｒｅ、Ψ２、及びΨＡｍが挙げられる。レトロウイルスは、上皮細胞、インビトロ、及び／又はインビボを含む、多くの異なる細胞型に様々な遺伝子を導入するために使用されている（例えば、各々が参照によりその全体が全ての目的のために本明細書に組み込まれる、Ｅｇｌｉｔｉｓ，ｅｔ　ａｌ．（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３０：１３９５－１３９８、Ｄａｎｏｓ　ａｎｄ　Ｍｕｌｌｉｇａｎ（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：６４６０－６４６４、Ｗｉｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：３０１４－３０１８、Ａｒｍｅｎｔａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：６１４１－６１４５、Ｈｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：８０３９－８０４３、Ｆｅｒｒｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：８３７７－８３８１、Ｃｈｏｗｄｈｕｒｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５４：１８０２－１８０５、ｖａｎ　Ｂｅｕｓｅｃｈｅｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：７６４０－７６４４、Ｋａｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　３

：６４１－６４７、Ｄａｉ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１０８９２－１０８９５、Ｈｗｕ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：４１０４－４１１５、米国特許第４，８６８，１１６号、米国特許第４，９８０，２８６号、ＰＣＴ出願ＷＯ第８９／０７１３６号、ＰＣＴ出願第ＷＯ８９／０２４６８号、ＰＣＴ出願ＷＯ８９／０５３４５号、及びＰＣＴ出願第ＷＯ９２／０７５７３号を参照されたい）。

【０１３１】

本方法で有用な別のウイルス遺伝子送達システムは、アデノウイルス由来ベクターを利用する。アデノウイルスのゲノムは、関心対象の遺伝子産物をコード及び発現するように操作され得るが、通常の溶解ウイルスライフサイクルにおける複製するその能力に関して不活性化される。例えば、Ｂｅｒｋｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：６１６（１９８８）、Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ２５２：４３１－４３４（１９９１）、及びＲｏｓｅｎｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ６８：１４３－１５５（１９９２）を参照されたい。好適なアデノウイルスベクターは、当業者に既知である他の種（例えば、マウス、イヌ、ヒトなど）由来のアデノウイルス血清型を含む、アデノウイルスの任意の株（例えば、Ａｄ２、Ａｄ３、Ａｄ５、又はＡｄ７など）に由来し得る。ウイルス粒子は、比較的安定しており、精製及び濃縮に適しており、上記のように、感染性のスペクトルに影響するように修飾され得る。加えて、導入されたアデノウイルスＤＮＡ（及びその中に含有される外来性ＤＮＡ）は、宿主細胞のゲノム内に組み込まれないが、エピソームのままであり、それによって、導入されたＤＮＡが宿主ゲノム（例えば、レトロウイルスＤＮＡ）内に組み込まれる、インサイチュにおける挿入変異の結果として起こり得る潜在的な問題を回避する。更に、外来性ＤＮＡに対するアデノウイルスゲノムの担持能力は、他の遺伝子送達ベクターと比較して大きい（最大８キロ塩基）（Ｂｅｒｋｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，上記、Ｈａｊ－Ａｈｍａｎｄ ａｎｄ Ｇｒａｈａｍ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．５７：２６７（１９８６））。

【０１３２】

ヘルパー依存性（ＨＤＡｄ）ベクターはまた、左のパッケージングシグナルの下流のゲノムの５プライム末端におけるパッケージングシグナルとともに、ウイルスＤＮＡの各末端におけるＤＮＡ複製の起源を除いて欠失された全てのアデノウイルス配列で産生され得る。ＨＤＡｄベクターは、複製に必要な必要とされる初期及び後期タンパク質を提供する複製可能なヘルパーアデノウイルスの存在下で構築及び増殖される。

【０１３３】

核酸の送達に有用な更に別のウイルスベクターシステムは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）である。アデノ随伴ウイルスは、アデノウイルス又はヘルペスウイルスなどの別のウイルスを、効率的な複製及び生産的なライフサイクルのためのヘルパーウイルスとして必要とする、天然型欠損ウイルスである。（総説については、Ｍｕｚｙｃｚｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏ．ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：９７－１２９（１９９２）を参照されたい。 アデノ随伴ウイルスはまた、そのＤＮＡを非分裂細胞に組み込み、高頻度の安定的組み込みを呈する少数のウイルスのうちの１つでもある（例えば、Ｆｌｏｔｔｅ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．７：３４９－３５６（１９９２）、Ｓａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：３８２２－３８２８（１９８９）、及びＭｃＬａｕｇｈｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６２：１９６３－１９７３（１９８９）を参照されたい。わずか３００塩基対のＡＡＶを含有するベクターは、パッケージングされ得、組み込むことができる。外因性ＤＮＡに対する空間は、約４．５ｋｂに制限される。Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３２５１－３２６０（１９８５）で説明されるものなどのＡＡＶベクターが、ＤＮＡを細胞内に導入するために使用され得る。様々な核酸が、ＡＡＶベクターを使用して異なる細胞型に導入されている（例えば、Ｈｅｒｍｏｎａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：６４６６－６４７０（１９８４）、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．

Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４：２０７２－２０８１（１９８５）、Ｗｏｎｄｉｓｆｏｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２：３２－３９（１９８８）、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．５１：６１１－６１９（１９８４）、及びＦｌｏｔｔｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：３７８１－３７９０（１９９３）を参照されたい。インビボでより高度に安定及び有効であり、容易に産生され、ＦＤＡによって承認され、かつ複数の臨床試験で試験されたアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターにパッケージングされ得るＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ（ＳａＣａｓ９）及び他のより小さいＣａｓ９酵素の識別は、治療用遺伝子編集のための新たな道を開く。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ ＩＬ－１α又はＩＬ－１β遺伝子編集複合体（例えば、Ｃａｓ９又はｇＲＮＡ）をコードする核酸は、標的細胞の細胞表面抗原に対する抗体でタグ付けされ得る、それらの表面上に正電荷を有するリポソーム（例えば、リポフェクチン）に閉じ込められる。これらの送達ビヒクルはまた、Ｃａｓ９タンパク質／ｇＲＮＡ複合体を送達するために使用され得る。

【０１３５】

臨床設定では、ＣＲＩＳＰＲ ＩＬ－１α又はＩＬ－１β遺伝子編集複合体をコードする核酸のための遺伝子送達システムは、各々が当該技術分野で周知であるいくつかの方法のいずれかによって対象に導入され得る。例えば、遺伝子送達システムの医薬調製物は、例えば、静脈内注射によって、全身的に導入され得、標的細胞中のタンパク質の特異的形質導入は、主に、遺伝子送達ビヒクル、受容体遺伝子の発現を制御する転写調節配列に起因する細胞型若しくは組織型発現、又はそれらの組み合わせによって提供される、トランスフェクションの特異性から起こることになる。他の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ ＩＬ－１α又はＩＬ－１β遺伝子編集複合体をコードする核酸の初期送達がより限定され、対象への導入が非常に局在化される。例えば、ＣＲＩＳＰＲ ＩＬ－１α又はＩＬ－１β遺伝子編集複合体をコードする核酸は、関節疾患（例えば、変形性関節炎）を呈する関節内への関節内注射によって導入され得る。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ ＩＬ－１α又はＩＬ－１β遺伝子編集複合体をコードする核酸は、外科手術中又はその後に投与され、いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ ＩＬ－１α又はＩＬ－１β遺伝子編集複合体をコードする核酸を含む徐放性ハイドロゲルは、経時的にＣＲＩＳＰＲ ＩＬ－１α又はＩＬ－１β遺伝子編集複合体をコードする核酸の定常用量を提供することによって、変形性関節炎を予防、低減、又は排除するために、閉鎖前の外科手術の終了時に投与される。

【０１３６】

ＣＲＩＳＰＲ ＩＬ－１α又はＩＬ－１β遺伝子編集複合体をコードする核酸の医薬調製物は、許容される希釈剤中の遺伝子送達システム（例えば、ウイルスベクター）から本質的になり得るか、又は遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれる徐放性基質を含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達システムが、組換え細胞、例えばアデノ随伴ウイルスベクターから無傷で産生され得る場合、医薬調製物は、遺伝子送達システムを産生する１つ以上の細胞を含み得る。

【０１３７】

好ましくは、ＣＲＩＳＰＲ ＩＬ－１α又はＩＬ－１β編集複合体は、特異的であり、すなわち、標的部位（ＩＬ－１α又はＩＬ－１β）で優先的にゲノム改変を誘導し、他の部位で改変を誘導しないか、又は他の部位でごく稀に改変を誘導する。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ ＩＬ－１α又はＩＬ－１β編集複合体は、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は少なくとも９９％の編集効率を有する。

【０１３８】

ＨＲのためのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムで使用するためのｓｇＲＮＡは、典型的には、標的核酸配列（標的遺伝子座）に相補的であるガイド配列（例えば、ｃｒＲＮＡ）と

、ＣａｓヌクレアーゼＣａｓ９ポリペプチド）又はそのバリアント若しくは断片と相互作用する足場配列（例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ）と、を含む。シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを含み得る。

【０１３９】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ編集複合体によるＩＬ－１α又はＩＬ－１β遺伝子におけるゲノム改変を誘導するための例示的な標的配列が、表２及び１２に提供されている。本開示の組成物、方法、及びシステムで使用するための例示的なガイドＲＮＡが表３及び１３に提供される。

【表３－１】

表１２．例示的な標的ＩＬ－１α及びＩＬ－１β遺伝子配列

識別子	ゲノム	遺伝子	エクソン	標的配列 5'-3'	PAM
配列番号 37	ホモサピエンス	IL-1α	4	GCCATAGCTTACATGATAGA	AGG
配列番号 38	ホモサピエンス	IL-1α	4	TCCTTCTATCATGTAAGCTA	TGG
配列番号 39	ホモサピエンス	IL-1α	4	CCATGCAGCCTTCATGGAGT	GGG
配列番号 40	ホモサピエンス	IL-1α	4	TCCATGCAGCCTTCATGGAG	TGG
配列番号 41	ホモサピエンス	IL-1α	4	AGCTATGGCCCACTCCATGA	AGG
配列番号 42	ホモサピエンス	IL-1α	4	ATTGATCCATGCAGCCTTCA	TGG
配列番号 43	ホモサピエンス	IL-1α	4	CCCACTCCATGAAGGCTGCA	TGG
配列番号 44	ホモサピエンス	IL-1α	4	GCTCTCCTTGAAGGTAAGCT	TGG
配列番号 45	ホモサピエンス	IL-1α	4	TACCACCATGCTCTCCTTGA	AGG
配列番号 46	ホモサピエンス	IL-1α	4	GCTTACCTTCAAGGAGAGCA	TGG
配列番号 47	ホモサピエンス	IL-1α	4	TACCTTCAAGGAGAGCATGG	TGG
配列番号 48	ホモサピエンス	IL-1α	4	ATGGTGGTAGTAGCAACCAA	CGG
配列番号 49	ホモサピエンス	IL-1α	4	TGGTGGTAGTAGCAACCAAC	GGG
配列番号 50	ホモサピエンス	IL-1α	4	CTTCTTCAGAACCTTCCCGT	TGG
配列番号 51	ホモサピエンス	IL-1α	4	GGTAGTAGCAACCAACGGGA	AGG
配列番号 52	ホモサピエンス	IL-1α	4	GGAAGGTTCTGAAGAAGAGA	CGG
配列番号 53	ホモサピエンス	IL-1α	4	CTCCAGGTCATCATCAGTGA	TGG
配列番号 54	ホモサピエンス	IL-1α	4	CATCACTGATGATGACCTGG	AGG
配列番号 55	ホモサピエンス	IL-1α	4	AGTCATTGGCGATGGCCTCC	AGG
配列番号 56	ホモサピエンス	IL-1α	4	TTCCTCTGAGTCATTGGCGA	TGG
配列番号 57	ホモサピエンス	IL-1β	4	TCCCATGTGTCGAAGAAGAT	AGG
配列番号 58	ホモサピエンス	IL-1β	4	AACCTATCTTCTTCGACACA	TGG

【表３－２】

配列番号59	ホモサピエンス	IL-1β	4	ACCTATCTTCTTCGACACAT	GGG
配列番号60	ホモサピエンス	IL-1β	4	CTTCGACACATGGGATAACG	AGG
配列番号61	ホモサピエンス	IL-1β	4	GTGCAGTTCAGTGATCGTAC	AGG
配列番号62	ホモサピエンス	IL-1β	4	GATCACTGAACTGCACGCTC	CGG
配列番号63	ホモサピエンス	IL-1β	4	ATCACTGAACTGCACGCTCC	GGG
配列番号64	ホモサピエンス	IL-1β	4	CAAAAAAGCTTGGTGATGTC	TGG
配列番号65	ホモサピエンス	IL-1β	4	CCATATCCTGTCCCTGGAGG	TGG
配列番号66	ホモサピエンス	IL-1β	4	CTGAAAGCTCTCCACCTCCA	GGG
配列番号67	ホモサピエンス	IL-1β	4	GCTCCATATCCTGTCCCTGG	AGG
配列番号68	ホモサピエンス	IL-1β	4	AGCTCTCCACCTCCAGGGAC	AGG
配列番号69	ホモサピエンス	IL-1β	4	GTTGCTCCATATCCTGTCCC	TGG
配列番号70	ホモサピエンス	IL-1β	4	GGACAGGATATGGAGCAACA	AGG
配列番号71	イヌ	IL-1α	3	GTCACAGCTCATATCATAGA	AGG
配列番号72	イヌ	IL-1α	3	ACATGCAGTCCTCATGAAGT	GGG
配列番号73	イヌ	IL-1α	3	GACATGCAGTCCTCATGAAG	TGG
配列番号74	イヌ	IL-1α	3	GAGCTGTGACCCACTTCATG	AGG
配列番号75	イヌ	IL-1α	3	GGATGTCTTTGAGATTTCAG	AGG
配列番号76	イヌ	IL-1α	3	ATTTTCCTTGAAGGTAAGCT	GGG
配列番号77	イヌ	IL-1α	3	GACATCCCAGCTTACCTTCA	AGG
配列番号78	イヌ	IL-1α	3	CTTCAAGGAAAATGTGGTAG	TGG
配列番号79	イヌ	IL-1α	3	GTGGTAGTGGTGGCAGCCAA	TGG
配列番号80	イヌ	IL-1α	3	TGGTAGTGGTGGCAGCCAAT	GGG
配列番号81	イヌ	IL-1α	3	CTTCTTTAGAATCTTCCCAT	TGG
配列番号82	イヌ	IL-1α	3	GGAAGATTCTAAAGAAGAGA	CGG
配列番号83	イヌ	IL-1α	3	AATGTCTTCCAGGTCATCAT	CGG
配列番号84	イヌ	IL-1α	3	ATTCATCACCGATGATGACC	TGG
配列番号85	イヌ	IL-1α	3	ATTGCCAATGACACAGAAGA	AGG
配列番号86	イヌ	IL-1β	4	CCTCATCTACCAGAGAACTG	TGG
配列番号87	イヌ	IL-1β	4	CCACAGTTCTCTGGTAGATG	AGG
配列番号88	イヌ	IL-1β	4	CACAGTTCTCTGGTAGATGA	GGG
配列番号89	イヌ	IL-1β	4	GCTGGTGGGAGACTTGCAAC	TGG
配列番号90	イヌ	IL-1β	4	ACTCTTGTTACAGAGCTGGT	GGG

【表３－３】

配列番号 91	イヌ	IL-1β	4	GACTCTTGTTACAGAGCTGG	TGG
配列番号 92	イヌ	IL-1β	4	TCAGACTCTTGTTACAGAGC	TGG
配列番号 93	イヌ	IL-1β	4	AGCTCTGTAACAAGAGTCTG	AGG
配列番号 94	イヌ	IL-1β	4	CGTGTCAGTCATTGTAGCTT	TGG
配列番号 95	イヌ	IL-1β	4	TCCTGGAGGACCTGTGGGCA	GGG
配列番号 96	イヌ	IL-1β	4	GCTGAAGAAGCCCTGCCCAC	AGG
配列番号 97	イヌ	IL-1β	4	CATCCTCCTGGAGGACCTGT	GGG
配列番号 98	イヌ	IL-1β	4	TCATCCTCCTGGAGGACCTG	TGG
配列番号 99	イヌ	IL-1β	4	GCCCTGCCCACAGGTCCTCC	AGG
配列番号 100	イヌ	IL-1β	4	CTGCCCACAGGTCCTCCAGG	AGG
配列番号 101	イヌ	IL-1β	4	TCTTCAGGTCATCCTCCTGG	AGG
配列番号 102	イヌ	IL-1β	4	TGCTCTTCAGGTCATCCTCC	TGG
配列番号 103	イヌ	IL-1β	4	TGTAGCAAAAGATGCTCTTC	AGG
配列番号 104	イヌ	IL-1β	4	TTTTGCTACATCTTTGAAGA	AGG
配列番号 105	ウマ	IL-1α	4	GTCATAGCTTGCATCATAGA	AGG
配列番号 106	ウマ	IL-1α	4	CCATGCAGTCCTCAGGAAGT	GGG
配列番号 107	ウマ	IL-1α	4	TCCATGCAGTCCTCAGGAAG	TGG
配列番号 108	ウマ	IL-1α	4	AAGCTATGACCCACTTCCTG	AGG
配列番号 109	ウマ	IL-1α	4	AATGTATCCATGCAGTCCTC	AGG
配列番号 110	ウマ	IL-1α	4	CCCACTTCCTGAGGACTGCA	TGG
配列番号 111	ウマ	IL-1α	4	GGATGTCTTAGAGGTTTCAG	AGG
配列番号 112	ウマ	IL-1α	4	GTTCAGCTTGGATGTCTTAG	AGG
配列番号 113	ウマ	IL-1α	4	GCTCTCCTTGAAGTTCAGCT	TGG
配列番号 114	ウマ	IL-1α	4	GACATCCAAGCTGAACTTCA	AGG
配列番号 115	ウマ	IL-1α	4	GCTGAACTTCAAGGAGAGCG	TGG
配列番号 116	ウマ	IL-1α	4	CTTCAAGGAGAGCGTGGTGC	TGG
配列番号 117	ウマ	IL-1α	4	CAAGGAGAGCGTGGTGCTGG	TGG
配列番号 118	ウマ	IL-1α	4	GTGGTGCTGGTGGCAGCCAA	CGG
配列番号 119	ウマ	IL-1α	4	TGGTGCTGGTGGCAGCCAAC	GGG
配列番号 120	ウマ	IL-1α	4	CTTCTTCAGAGTCTTCCCGT	TGG
配列番号 121	ウマ	IL-1α	4	GGAAGACTCTGAAGAAGAGA	CGG
配列番号 122	ウマ	IL-1α	4	AATGGCTTCCAGGTCATCAT	TGG
配列番号 123	ウマ	IL-1α	4	GTTCATCACCAATGATGACC	TGG
配列番号 124	ウマ	IL-1α	4	TTCTTCTGGATCATTGGCAA	TGG
配列番号 125	ウマ	IL-1β	4	GGTGGTGGGAGATTTGCAAC	TGG
配列番号 126	ウマ	IL-1β	4	AGTCTTGTTGTAGAGGTGGT	GGG
配列番号 127	ウマ	IL-1β	4	AAGTCTTGTTGTAGAGGTGG	TGG
配列番号 128	ウマ	IL-1β	4	TGAAAGTCTTGTTGTAGAGG	TGG
配列番号 129	ウマ	IL-1β	4	GTTTGAAAGTCTTGTTGTAG	AGG
配列番号 130	ウマ	IL-1β	4	ACATGCCATGTCAATCATTG	TGG
配列番号 131	ウマ	IL-1β	4	CATGTCAATCATTGTGGCTG	TGG

【表３－４】

配列番号 132	ハツカネズミ	IL-1α	4	GCCATAGCTTGCATCATAGA	AGG
配列番号 133	ハツカネズミ	IL-1α	4	TCCTTCTATGATGCAAGCTA	TGG
配列番号 134	ハツカネズミ	IL-1α	4	GGACATCTTTGACGTTTCAG	AGG
配列番号 135	ハツカネズミ	IL-1α	4	GATGTCCAACTTCACCTTCA	AGG
配列番号 136	ハツカネズミ	IL-1α	4	TGTCACCCGGCTCTCCTTGA	AGG
配列番号 137	ハツカネズミ	IL-1α	4	CTTCACCTTCAAGGAGAGCC	GGG
配列番号 138	ハツカネズミ	IL-1α	4	ACGTTGCTGATACTGTCACC	CGG
配列番号 139	ハツカネズミ	IL-1α	4	GTATCAGCAACGTCAAGCAA	CGG
配列番号 140	ハツカネズミ	IL-1α	4	TATCAGCAACGTCAAGCAAC	GGG
配列番号 141	ハツカネズミ	IL-1α	4	GGAAGATTCTGAAGAAGAGA	CGG
配列番号 142	ハツカネズミ	IL-1α	4	CTGCAGGTCATCTTCAGTGA	AGG
配列番号 143	ハツカネズミ	IL-1α	4	ACCTTCCAGATCATGGGTTA	TGG
配列番号 144	ハツカネズミ	IL-1α	4	CTCCTTACCTTCCAGATCAT	GGG
配列番号 145	ハツカネズミ	IL-1α	4	TCCATAACCCATGATCTGGA	AGG
配列番号 146	ハツカネズミ	IL-1α	4	AACCCATGATCTGGAAGGTA	AGG
配列番号 147	ハツカネズミ	IL-1β	4	GACAGCCCAGGTCAAAGGTT	TGG
配列番号 148	ハツカネズミ	IL-1β	4	ATCAGGACAGCCCAGGTCAA	AGG
配列番号 149	ハツカネズミ	IL-1β	4	TGCTTCCAAACCTTTGACCT	GGG
配列番号 150	ハツカネズミ	IL-1β	4	TGCTCTCATCAGGACAGCCC	AGG
配列番号 151	ハツカネズミ	IL-1β	4	TGAAGCTGGATGCTCTCATC	AGG
配列番号 152	ハツカネズミ	IL-1β	4	GCTGCTGCGAGATTTGAAGC	TGG
配列番号 153	ハツカネズミ	IL-1β	4	CATCAACAAGAGCTTCAGGC	AGG
配列番号 154	ハツカネズミ	IL-1β	4	GCAGGCAGTATCACTCATTG	TGG

【表３－５】

配列番号155	ハツカネズミ	IL-1β	4	AGTATCACTCATTGTGGCTG	TGG
配列番号156	ハツカネズミ	IL-1β	4	TTGTGGCTGTGGAGAAGCTG	TGG
配列番号157	ハツカネズミ	IL-1β	4	AAGGTCCACGGGAAAGACAC	AGG
配列番号158	ハツカネズミ	IL-1β	4	AGCTACCTGTGTCTTTCCCG	TGG
配列番号159	ハツカネズミ	IL-1β	4	CCTCATCCTGGAAGGTCCAC	GGG
配列番号160	ハツカネズミ	IL-1β	4	TCCTCATCCTGGAAGGTCCA	CGG
配列番号161	ハツカネズミ	IL-1β	4	GCTCATGTCCTCATCCTGGA	AGG
配列番号162	ハツカネズミ	IL-1β	4	CCCGTGGACCTTCCAGGATG	AGG
配列番号163	ハツカネズミ	IL-1β	4	AGGTGCTCATGTCCTCATCC	TGG
配列番号164	ハツカネズミ	IL-1β	4	TTCAAAGATGAAGGAAAAGA	AGG
配列番号165	ハツカネズミ	IL-1β	4	AGTACCTTCTTCAAAGATGA	AGG
配列番号167	ハツカネズミ	IL-1β	4	TTTTCCTTCATCTTTGAAGA	AGG

【表４－１】

表１３．ＣＲＩＳＰＲ　ｓｇＲＮＡの例示的なｃｒＲＮＡ配列

識別子	ゲノム	遺伝子	エクソン	標的配列 5'-3'	PAM
配列番号 168	ホモサピエンス	IL-1α	4	GCCAUAGCUUACAUGAUAGA	AGG
配列番号 169	ホモサピエンス	IL-1α	4	UCCUUCUAUCAUGUAAGCUA	TGG
配列番号 170	ホモサピエンス	IL-1α	4	CCAUGCAGCCUUCAUGGAGU	GGG
配列番号 171	ホモサピエンス	IL-1α	4	UCCAUGCAGCCUUCAUGGAG	TGG
配列番号 172	ホモサピエンス	IL-1α	4	AGCUAUGGCCCACUCCAUGA	AGG
配列番号 173	ホモサピエンス	IL-1α	4	AUUGAUCCAUGCAGCCUUCA	TGG
配列番号 174	ホモサピエンス	IL-1α	4	CCCACUCCAUGAAGGCUGCA	TGG
配列番号 175	ホモサピエンス	IL-1α	4	GCUCUCCUUGAAGGUAAGCU	TGG
配列番号 176	ホモサピエンス	IL-1α	4	UACCACCAUGCUCUCCUUGA	AGG
配列番号 177	ホモサピエンス	IL-1α	4	GCUUACCUUCAAGGAGAGCA	TGG
配列番号 178	ホモサピエンス	IL-1α	4	UACCUUCAAGGAGAGCAUGG	TGG
配列番号 179	ホモサピエンス	IL-1α	4	AUGGUGGUAGUAGCAACCAA	CGG
配列番号 180	ホモサピエンス	IL-1α	4	UGGUGGUAGUAGCAACCAAC	GGG
配列番号 181	ホモサピエンス	IL-1α	4	CUUCUUCAGAACCUUCCCGU	TGG
配列番号 182	ホモサピエンス	IL-1α	4	GGUAGUAGCAACCAACGGGA	AGG
配列番号 183	ホモサピエンス	IL-1α	4	GGAAGGUUCUGAAGAAGAGA	CGG
配列番号 184	ホモサピエンス	IL-1α	4	CUCCAGGUCAUCAUCAGUGA	TGG
配列番号 185	ホモサピエンス	IL-1α	4	CAUCACUGAUGAUGACCUGG	AGG
配列番号 186	ホモサピエンス	IL-1α	4	AGUCAUUGGCGAUGGCCUCC	AGG
配列番号 187	ホモサピエンス	IL-1α	4	UUCCUCUGAGUCAUUGGCGA	TGG
配列番号 188	ホモサピエンス	IL-1β	4	UCCCAUGUGUCGAAGAAGAU	AGG
配列番号 189	ホモサピエンス	IL-1β	4	AACCUAUCUUCUUCGACACA	TGG

【表４－２】

配列番号 190	ホモサピエンス	IL-1β	4	ACCUAUCUUCUUCGACACAU	GGG
配列番号 191	ホモサピエンス	IL-1β	4	CUUCGACACAUGGGAUAACG	AGG
配列番号 192	ホモサピエンス	IL-1β	4	GUGCAGUUCAGUGAUCGUAC	AGG
配列番号 193	ホモサピエンス	IL-1β	4	GAUCACUGAACUGCACGCUC	CGG
配列番号 194	ホモサピエンス	IL-1β	4	AUCACUGAACUGCACGCUCC	GGG
配列番号 195	ホモサピエンス	IL-1β	4	CAAAAAAGCUUGGUGAUGUC	TGG
配列番号 196	ホモサピエンス	IL-1β	4	CCAUAUCCUGUCCCUGGAGG	TGG
配列番号 197	ホモサピエンス	IL-1β	4	CUGAAAGCUCUCCACCUCCA	GGG
配列番号 198	ホモサピエンス	IL-1β	4	GCUCCAUAUCCUGUCCCUGG	AGG
配列番号 199	ホモサピエンス	IL-1β	4	AGCUCUCCACCUCCAGGGAC	AGG
配列番号 200	ホモサピエンス	IL-1β	4	GUUGCUCCAUAUCCUGUCCC	TGG
配列番号 201	ホモサピエンス	IL-1β	4	GGACAGGAUAUGGAGCAACA	AGG
配列番号 202	イヌ	IL-1α	3	GUCACAGCUCAUAUCAUAGA	AGG
配列番号 203	イヌ	IL-1α	3	ACAUGCAGUCCUCAUGAAGU	GGG
配列番号 204	イヌ	IL-1α	3	GACAUGCAGUCCUCAUGAAG	TGG
配列番号 205	イヌ	IL-1α	3	GAGCUGUGACCCACUUCAUG	AGG
配列番号 206	イヌ	IL-1α	3	GGAUGUCUUUGAGAUUUCAG	AGG
配列番号 207	イヌ	IL-1α	3	AUUUUCCUUGAAGGUAAGCU	GGG
配列番号 208	イヌ	IL-1α	3	GACAUCCCAGCUUACCUUCA	AGG
配列番号 209	イヌ	IL-1α	3	CUUCAAGGAAAAUGUGGUAG	TGG
配列番号 210	イヌ	IL-1α	3	GUGGUAGUGGUGGCAGCCAA	TGG
配列番号 211	イヌ	IL-1α	3	UGGUAGUGGUGGCAGCCAAU	GGG
配列番号 212	イヌ	IL-1α	3	CUUCUUUAGAAUCUUCCCAU	TGG
配列番号 213	イヌ	IL-1α	3	GGAAGAUUCUAAAGAAGAGA	CGG
配列番号 214	イヌ	IL-1α	3	AAUGUCUUCCAGGUCAUCAU	CGG
配列番号 215	イヌ	IL-1α	3	AUUCAUCACCGAUGAUGACC	TGG
配列番号 216	イヌ	IL-1α	3	AUUGCCAAUGACACAGAAGA	AGG
配列番号 217	イヌ	IL-1β	4	CCUCAUCUACCAGAGAACUG	TGG
配列番号 218	イヌ	IL-1β	4	CCACAGUUCUCUGGUAGAUG	AGG
配列番号 219	イヌ	IL-1β	4	CACAGUUCUCUGGUAGAUGA	GGG
配列番号 220	イヌ	IL-1β	4	GCUGGUGGGAGACUUGCAAC	TGG
配列番号 221	イヌ	IL-1β	4	ACUCUUGUUACAGAGCUGGU	GGG

【表４－３】

配列番号 222	イヌ	IL-1β	4	GACUCUUGUUACAGAGCUGG	TGG
配列番号 223	イヌ	IL-1β	4	UCAGACUCUUGUUACAGAGC	TGG
配列番号 224	イヌ	IL-1β	4	AGCUCUGUAACAAGAGUCUG	AGG
配列番号 225	イヌ	IL-1β	4	CGUGUCAGUCAUUGUAGCUU	TGG
配列番号 226	イヌ	IL-1β	4	UCCUGGAGGACCUGUGGGCA	GGG
配列番号 227	イヌ	IL-1β	4	GCUGAAGAAGCCCUGCCCAC	AGG
配列番号 228	イヌ	IL-1β	4	CAUCCUCCUGGAGGACCUGU	GGG
配列番号 229	イヌ	IL-1β	4	UCAUCCUCCUGGAGGACCUG	TGG
配列番号 230	イヌ	IL-1β	4	GCCCUGCCCACAGGUCCUCC	AGG
配列番号 231	イヌ	IL-1β	4	CUGCCCACAGGUCCUCCAGG	AGG
配列番号 232	イヌ	IL-1β	4	UCUUCAGGUCAUCCUCCUGG	AGG
配列番号 233	イヌ	IL-1β	4	UGCUCUUCAGGUCAUCCUCC	TGG
配列番号 234	イヌ	IL-1β	4	UGUAGCAAAAGAUGCUCUUC	AGG
配列番号 235	イヌ	IL-1β	4	UUUUGCUACAUCUUUGAAGA	AGG
配列番号 236	ウマ	IL-1α	4	GUCAUAGCUUGCAUCAUAGA	AGG
配列番号 237	ウマ	IL-1α	4	CCAUGCAGUCCUCAGGAAGU	GGG
配列番号 238	ウマ	IL-1α	4	UCCAUGCAGUCCUCAGGAAG	TGG
配列番号 239	ウマ	IL-1α	4	AAGCUAUGACCCACUUCCUG	AGG
配列番号 240	ウマ	IL-1α	4	AAUGUAUCCAUGCAGUCCUC	AGG
配列番号 241	ウマ	IL-1α	4	CCCACUUCCUGAGGACUGCA	TGG
配列番号 242	ウマ	IL-1α	4	GGAUGUCUUAGAGGUUUCAG	AGG
配列番号 243	ウマ	IL-1α	4	GUUCAGCUUGGAUGUCUUAG	AGG
配列番号 244	ウマ	IL-1α	4	GCUCUCCUUGAAGUUCAGCU	TGG
配列番号 245	ウマ	IL-1α	4	GACAUCCAAGCUGAACUUCA	AGG
配列番号 246	ウマ	IL-1α	4	GCUGAACUUCAAGGAGAGCG	TGG
配列番号 247	ウマ	IL-1α	4	CUUCAAGGAGAGCGUGGUGC	TGG
配列番号 248	ウマ	IL-1α	4	CAAGGAGAGCGUGGUGCUGG	TGG
配列番号 249	ウマ	IL-1α	4	GUGGUGCUGGUGGCAGCCAA	CGG
配列番号 250	ウマ	IL-1α	4	UGGUGCUGGUGGCAGCCAAC	GGG
配列番号 251	ウマ	IL-1α	4	CUUCUUCAGAGUCUUCCCGU	TGG
配列番号 252	ウマ	IL-1α	4	GGAAGACUCUGAAGAAGAGA	CGG
配列番号 253	ウマ	IL-1α	4	AAUGGCUUCCAGGUCAUCAU	TGG
配列番号 254	ウマ	IL-1α	4	GUUCAUCACCAAUGAUGACC	TGG
配列番号 255	ウマ	IL-1α	4	UUCUUCUGGAUCAUUGGCAA	TGG
配列番号 256	ウマ	IL-1β	4	GGUGGUGGGAGAUUUGCAAC	TGG
配列番号 257	ウマ	IL-1β	4	AGUCUUGUUGUAGAGGUGGU	GGG
配列番号 258	ウマ	IL-1β	4	AAGUCUUGUUGUAGAGGUGG	TGG
配列番号 259	ウマ	IL-1β	4	UGAAAGUCUUGUUGUAGAGG	TGG
配列番号 260	ウマ	IL-1β	4	GUUUGAAAGUCUUGUUGUAG	AGG
配列番号 261	ウマ	IL-1β	4	ACAUGCCAUGUCAAUCAUUG	TGG
配列番号 262	ウマ	IL-1β	4	CAUGUCAAUCAUUGUGGCUG	TGG

【表４－４】

配列番号263	ハツカネズミ	IL-1α	4	GCCAUAGCUUGCAUCAUAGA	AGG
配列番号264	ハツカネズミ	IL-1α	4	UCCUUCUAUGAUGCAAGCUA	TGG
配列番号265	ハツカネズミ	IL-1α	4	GGACAUCUUUGACGUUUCAG	AGG
配列番号266	ハツカネズミ	IL-1α	4	GAUGUCCAACUUCACCUUCA	AGG
配列番号267	ハツカネズミ	IL-1α	4	UGUCACCCGGCUCUCCUUGA	AGG
配列番号268	ハツカネズミ	IL-1α	4	CUUCACCUUCAAGGAGAGCC	GGG
配列番号269	ハツカネズミ	IL-1α	4	ACGUUGCUGAUACUGUCACC	CGG
配列番号270	ハツカネズミ	IL-1α	4	GUAUCAGCAACGUCAAGCAA	CGG
配列番号271	ハツカネズミ	IL-1α	4	UAUCAGCAACGUCAAGCAAC	GGG
配列番号272	ハツカネズミ	IL-1α	4	GGAAGAUUCUGAAGAAGAGA	CGG
配列番号273	ハツカネズミ	IL-1α	4	CUGCAGGUCAUCUUCAGUGA	AGG
配列番号274	ハツカネズミ	IL-1α	4	ACCUUCCAGAUCAUGGGUUA	TGG
配列番号275	ハツカネズミ	IL-1α	4	CUCCUUACCUUCCAGAUCAU	GGG
配列番号276	ハツカネズミ	IL-1α	4	UCCAUAACCCAUGAUCUGGA	AGG
配列番号277	ハツカネズミ	IL-1α	4	AACCCAUGAUCUGGAAGGUA	AGG
配列番号278	ハツカネズミ	IL-1β	4	GACAGCCCAGGUCAAAGGUU	TGG
配列番号279	ハツカネズミ	IL-1β	4	AUCAGGACAGCCCAGGUCAA	AGG
配列番号280	ハツカネズミ	IL-1β	4	UGCUUCCAAACCUUUGACCU	GGG
配列番号281	ハツカネズミ	IL-1β	4	UGCUCUCAUCAGGACAGCCC	AGG
配列番号282	ハツカネズミ	IL-1β	4	UGAAGCUGGAUGCUCUCAUC	AGG
配列番号283	ハツカネズミ	IL-1β	4	GCUGCUGCGAGAUUUGAAGC	TGG
配列番号284	ハツカネズミ	IL-1β	4	CAUCAACAAGAGCUUCAGGC	AGG
配列番号285	ハツカネズミ	IL-1β	4	GCAGGCAGUAUCACUCAUUG	TGG

【表４－５】

配列番号286	ハツカネズミ	IL-1β	4	AGUAUCACUCAUUGUGGCUG	TGG
配列番号287	ハツカネズミ	IL-1β	4	UUGUGGCUGUGGAGAAGCUG	TGG
配列番号288	ハツカネズミ	IL-1β	4	AAGGUCCACGGGAAAGACAC	AGG
配列番号289	ハツカネズミ	IL-1β	4	AGCUACCUGUGUCUUUCCCG	TGG
配列番号290	ハツカネズミ	IL-1β	4	CCUCAUCCUGGAAGGUCCAC	GGG
配列番号291	ハツカネズミ	IL-1β	4	UCCUCAUCCUGGAAGGUCCA	CGG
配列番号292	ハツカネズミ	IL-1β	4	GCUCAUGUCCUCAUCCUGGA	AGG
配列番号293	ハツカネズミ	IL-1β	4	CCCGUGGACCUUCCAGGAUG	AGG
配列番号294	ハツカネズミ	IL-1β	4	AGGUGCUCAUGUCCUCAUCC	TGG
配列番号295	ハツカネズミ	IL-1β	4	UUCAAAGAUGAAGGAAAAGA	AGG
配列番号296	ハツカネズミ	IL-1β	4	AGUACCUUCUUCAAAGAUGA	AGG
配列番号297	ハツカネズミ	IL-1β	4	UUUUCCUUCAUCUUUGAAGA	AGG

【０１４０】

ある特定の実施形態では、ガイドＲＮＡ（例えば、シングルガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡ）の配列は、編集効率を増加させる、及び／又はオフターゲット効果を低減するように修飾され得る。ある特定の実施形態では、ガイドＲＮＡの配列は、標的配列から、約１塩基、約２塩基、約３塩基、約４塩基、約５塩基、約５塩基、約６塩基、約７塩基、約８塩基、約９塩基、約１０塩基、約１５塩基、又は約１５塩基超変化し得る。ある特定の実施形態では、ガイドＲＮＡの配列は、標的配列から、約１％、約２％、約３％、約４％、約５％、約６％、約７％、約８％、約９％、約１０％、約１１％、約１２％、約１３％、約１４％、約１５％、約１６％、約１７％、約１８％、約１９％、約２０％、又は約２０％超変化し得る。本明細書で使用される場合、標的配列を形成する変化は、相補性の程度を指し得る。

【０１４１】

ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約９５％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約９０％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約８５％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約８０％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約７５％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲ

ＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約７０％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約６５％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約６０％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約５５％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約５０％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約４５％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約４０％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約３５％同一である。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列と少なくとも約３５％同一である。

【０１４２】

ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の１塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の２塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の３塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の４塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の４塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の６塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の７塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の８塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の９塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の１０塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の１１塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方

法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の１２塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の１３塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の１４塩基置換を有する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、又はシステムとともに使用されるガイドＲＮＡは、配列番号２１～３４及び配列番号１６８～２９７のうちのいずれか１つに示される配列の１５塩基置換を有する。

【０１４３】

ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、配列番号７～２０及び配列番号３７～１６７のうちのいずれか１つに示される標的遺伝子の発現をノックダウンするように設計される、及び／又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン１の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン８の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。

【０１４４】

ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン１の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又

はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の少なくとも一部分に結合することによって、ヒトＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。

【０１４５】

ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、配列番号７～２０及び配列番号３７～１６７のうちのいずれか１つに示される標的遺伝子の発現をノックダウンするように設計される、及び／又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン１の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。

【０１４６】

ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン１の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の少なくとも一部分に結合することによって、イヌＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン８の少なくとも一部分に

結合することによって、イヌＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。

【０１４７】

ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、配列番号７～２０及び配列番号３７～１６７のうちのいずれか１つに示される標的遺伝子の発現をノックダウンするように設計される、及び／又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１α遺伝子のエクソン１の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。

【０１４８】

ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１β遺伝子のエクソン１の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ウマＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の少なくとも一部分に結合することによって、ウマＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。

【０１４９】

ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、配列番号７～２０及び配列番号３７～１６７のうちのいずれか１つに示される標的遺伝子の発現をノックダウンするように設計される、及び／又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子のエクソン１の少なくとも一部分に

結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子のエクソン８の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１α遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。

【０１５０】

ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子のエクソン１の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。ある特定の実施形態では、本開示のガイドＲＮＡは、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の少なくとも一部分に結合することによって、ハツカネズミＩＬ－１β遺伝子をノックダウンするように設計されるか、又はノックダウンすることができる。

【０１５１】

いくつかの事例では、ｓｇＲＮＡは、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９ポリペプチド）又はそのバリアント若しくは断片をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを用いて細胞（例えば、エクスビボ療法のための初代細胞などのインビトロ細胞、又は患者内などのインビボ細胞）に導入される。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９ポリペプチド）又はそのバリアント若しくは

断片と複合体化されて、細胞（例えば、エクスビボ療法のための初代細胞などのインビトロ細胞、又は患者などのインビボ細胞）への導入のためのリボ核タンパク質（ＲＮＰ）ベースの送達システムを形成する。他の事例では、ｓｇＲＮＡは、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９ポリペプチド）又はそのバリアント若しくは断片をコードするｍＲＮＡを用いて細胞（例えば、エクスビボ療法のための初代細胞などのインビトロ細胞、又は患者内などのインビボ細胞）に導入される。

【０１５２】

任意の異種又は外来性核酸（例えば、標的遺伝子座特異的ｓｇＲＮＡ及び／又はＣａｓ９ポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチド）が、当業者に既知の任意の方法を使用して細胞に導入され得る。そのような方法としては、これらに限定されないが、電気穿孔、ヌクレオフェクション、トランスフェクション、リポフェクション、形質導入、マイクロインジェクション、エレクトロインジェクション、電気融合、ナノ粒子衝撃、形質転換、コンジュゲーションなどが挙げられる。

【０１５３】

ｓｇＲＮＡの核酸配列は、標的配列とハイブリダイズし、標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を誘導するように、標的ポリヌクレオチド配列（例えば、標的ＤＮＡ配列）と十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列であり得る。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡのガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアライメントアルゴリズムを使用して最適に整列されたとき、約５０％、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、又はそれらの値以上である。最適なアライメントは、配列を整列するための任意の好適なアルゴリズムの使用を用いて決定され得、その非限定的な例としては、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム、Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ（例えば、Ｂｕｒｒｏｗｓ Ｗｈｅｅｌｅｒ Ａｌｉｇｎｅｒ）に基づくアルゴリズム、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｘ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎで入手可能）、及びＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔで入手可能）が挙げられる。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、約１ヌクレオチド、２ヌクレオチド、３ヌクレオチド、４ヌクレオチド、５ヌクレオチド、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１１ヌクレオチド、１２ヌクレオチド、１３ヌクレオチド、１４ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、１６ヌクレオチド、１７ヌクレオチド、１８ヌクレオチド、１９ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、２１ヌクレオチド、２２ヌクレオチド、２３ヌクレオチド、２４ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、２６ヌクレオチド、２７ヌクレオチド、２８ヌクレオチド、２９ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、３５ヌクレオチド、４０ヌクレオチド、４５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、７５ヌクレオチド以上の長さである。いくつかの事例では、ガイド配列は、約２０ヌクレオチドの長さである。他の事例では、ガイド配列は、約１５ヌクレオチドの長さである。他の事例では、ガイド配列は、約２５ヌクレオチドの長さである。標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を誘導するガイド配列の能力は、任意の好適なアッセイによって評価され得る。例えば、試験されるガイド配列を含むＣＲＩＳＰＲ複合体を形成するのに十分なＣＲＩＳＰＲシステムの成分は、ＣＲＩＳＰＲ配列の成分をコードするベクターを用いたトランスフェクションなどによって、対応する標的配列を有する宿主細胞に提供され得、標的配列内の優先的切断の評価に続く。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、標的配列、試験されるガイド配列及び試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列を含むＣＲＩＳＰＲ複合体の成分を提供することと、試験ガイド配列反応と対照ガイド配列反応との間の標的配列における結合又は切断速度を比較することによって、試験管内で評価され得る。

【０１５４】

ｓｇＲＮＡの核酸配列は、上記のウェブベースのソフトウェアのうちのいずれかを使用

して選択され得る。ＤＮＡ標的化ＲＮＡを選択するための検討事項は、使用されるＣａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９ポリペプチド）に対するＰＡＭ配列、及びオフターゲット修飾を最小化するための戦略を含む。ＣＲＩＳＰＲ設計ツールなどのツールは、ｓｇＲＮＡを調製するための、標的修飾効率を評価する、及び／又はオフターゲット部位における切断を評価するための配列を提供し得る。ｓｇＲＮＡの配列を選択するための別の検討事項は、ガイド配列内の二次構造の程度を低減することを含む。二次構造は、任意の好適なポリヌクレオチドフォールディングアルゴリズムによって決定され得る。一部のプログラムは、最小ギブス自由エネルギーを計算することに基づく。好適なアルゴリズムの例としては、ｍＦｏｌｄ（Ｚｕｋｅｒ ａｎｄ Ｓｔｉｅｇｌｅｒ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ，９（１９８１），１３３－１４８）、ＵＮＡＦｏｌｄパッケージ（Ｍａｒｋｈａｍ ｅｔ ａｌ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ，２００８，４５３：３－３１）、及びＶｉｅｎｎａＲＮａ Ｐａｃｋａｇｅを形成するＲＮＡｆｏｌｄが挙げられる。

【０１５５】

ｓｇＲＮＡは、約１０～約５００ヌクレオチド、例えば、約１０ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、３５ヌクレオチド、４０ヌクレオチド、４５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、５５ヌクレオチド、６０ヌクレオチド、６５ヌクレオチド、７０ヌクレオチド、７５ヌクレオチド、８０ヌクレオチド、８５ヌクレオチド、９０ヌクレオチド、９５ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、１０５ヌクレオチド、１１０ヌクレオチド、１２０ヌクレオチド、１３０ヌクレオチド、１４０ヌクレオチド、１５０ヌクレオチド、１６０ヌクレオチド、１７０ヌクレオチド、１８０ヌクレオチド、１９０ヌクレオチド、２００ヌクレオチド、２１０ヌクレオチド、２２０ヌクレオチド、２３０ヌクレオチド、２４０ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、２６０ヌクレオチド、２７０ヌクレオチド、２８０ヌクレオチド、２９０ヌクレオチド、３００ヌクレオチド、３１０ヌクレオチド、３２０ヌクレオチド、３３０ヌクレオチド、３４０ヌクレオチド、３５０ヌクレオチド、３６０ヌクレオチド、３７０ヌクレオチド、３８０ヌクレオチド、３９０ヌクレオチド、４００ヌクレオチド、４１０ヌクレオチド、４２０ヌクレオチド、４３０ヌクレオチド、４４０ヌクレオチド、４５０ヌクレオチド、４６０ヌクレオチド、４７０ヌクレオチド、４８０ヌクレオチド、４９０ヌクレオチド、又は約５００ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、約２０～約５００ヌクレオチド、例えば、２０ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、３５ヌクレオチド、４０ヌクレオチド、４５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、５５ヌクレオチド、６０ヌクレオチド、６５ヌクレオチド、７０ヌクレオチド、７５ヌクレオチド、８０ヌクレオチド、８５ヌクレオチド、９０ヌクレオチド、９５ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、１０５ヌクレオチド　１１０ヌクレオチド、１１５ヌクレオチド、１２０ヌクレオチド、１２５ヌクレオチド、１３０ヌクレオチド、１３５ヌクレオチド、１４０ヌクレオチド、１４５ヌクレオチド、１５０ヌクレオチド、１５５ヌクレオチド、１６０ヌクレオチド、１６５ヌクレオチド、１７０ヌクレオチド、１７５ヌクレオチド、１８０ヌクレオチド、１８５ヌクレオチド、１９０ヌクレオチド、１９５ヌクレオチド、２００ヌクレオチド、２０５ヌクレオチド、２１０ヌクレオチド、２１５ヌクレオチド、２２０ヌクレオチド、２２５ヌクレオチド、２３０ヌクレオチド、２３５ヌクレオチド、２４０ヌクレオチド、２４５ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、２５５ヌクレオチド、２６０ヌクレオチド、２６５ヌクレオチド、２７０ヌクレオチド、２７５ヌクレオチド、２８０ヌクレオチド、２８５ヌクレオチド、２９０ヌクレオチド、２９５ヌクレオチド、３００ヌクレオチド、３０５ヌクレオチド、３１０ヌクレオチド、３１５ヌクレオチド、３２０ヌクレオチド、３２５ヌクレオチド、３３０ヌクレオチド、３３５ヌクレオチド、３４０ヌクレオチド、３４５ヌクレオチド、３５０ヌクレオチド、３５５ヌクレオチド、３６０ヌクレオチド、３６５ヌクレオチド、３７０ヌクレオチド、３７５ヌクレオチド、３８０ヌクレオチド、３８５ヌクレオチド、３９０ヌクレオチド、３９５ヌクレオチド、４００ヌクレオチド、４０５ヌクレオチド、４１０ヌクレオチド、４１５ヌクレオチド、４２０ヌクレオチド、４２５ヌクレオチド、４３０ヌクレオチド、４３５ヌクレオチド、

４４０ヌクレオチド、４４５ヌクレオチド、４５０ヌクレオチド、４５５ヌクレオチド、４６０ヌクレオチド、４６５ヌクレオチド、４７０ヌクレオチド、４７５ヌクレオチド、４８０ヌクレオチド、４８５ヌクレオチド、４９０ヌクレオチド、４９５ヌクレオチド、又は５００ヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、ｓｇＲＮＡは、約２０～約１００ヌクレオチド、例えば、約２０ヌクレオチド、例えば、２０ヌクレオチド、２１ヌクレオチド、２２ヌクレオチド、２３ヌクレオチド、２４ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、２６ヌクレオチド、２７ヌクレオチド、２８ヌクレオチド、２９ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、３１ヌクレオチド、３２ヌクレオチド、３３ヌクレオチド、３４ヌクレオチド、３５ヌクレオチド、３６ヌクレオチド、３７ヌクレオチド、３８ヌクレオチド、３９ヌクレオチド、４０ヌクレオチド、４１ヌクレオチド、４２ヌクレオチド、４３ヌクレオチド、４４ヌクレオチド、４５ヌクレオチド、４６ヌクレオチド、４７ヌクレオチド、４８ヌクレオチド、４９ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、５１ヌクレオチド、５２ヌクレオチド、５３ヌクレオチド、５４ヌクレオチド、５５ヌクレオチド、５６ヌクレオチド、５７ヌクレオチド、５８ヌクレオチド、５９ヌクレオチド、６０ヌクレオチド、６１ヌクレオチド、６２ヌクレオチド、６３ヌクレオチド、６４ヌクレオチド、６５ヌクレオチド、６６ヌクレオチド、６７ヌクレオチド、６８ヌクレオチド、６９ヌクレオチド、７０ヌクレオチド、７１ヌクレオチド、７２ヌクレオチド、７３ヌクレオチド、７４ヌクレオチド、７５ヌクレオチド、７６ヌクレオチド、７７ヌクレオチド、７８ヌクレオチド、７９ヌクレオチド、８０ヌクレオチド、８１ヌクレオチド、８２ヌクレオチド、８３ヌクレオチド、８４ヌクレオチド、８５ヌクレオチド、８６ヌクレオチド、８７ヌクレオチド、８８ヌクレオチド、８９ヌクレオチド、９０ヌクレオチド、９１ヌクレオチド、９２ヌクレオチド、９３ヌクレオチド、９４ヌクレオチド、９５ヌクレオチド、９６ヌクレオチド、９７ヌクレオチド、９８ヌクレオチド、９９ヌクレオチド、又は約１００ヌクレオチドである。

【０１５６】

足場配列は、約１０～約５００ヌクレオチド、例えば、約１０ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、３５ヌクレオチド、４０ヌクレオチド、４５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、５５ヌクレオチド、６０ヌクレオチド、６５ヌクレオチド、７０ヌクレオチド、７５ヌクレオチド、８０ヌクレオチド、８５ヌクレオチド、９０ヌクレオチド、９５ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、１０５ヌクレオチド、１１０ヌクレオチド、１２０ヌクレオチド、１３０ヌクレオチド、１４０ヌクレオチド、１５０ヌクレオチド、１６０ヌクレオチド、１７０ヌクレオチド、１８０ヌクレオチド、１９０ヌクレオチド、２００ヌクレオチド、２１０ヌクレオチド、２２０ヌクレオチド、２３０ヌクレオチド、２４０ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、２６０ヌクレオチド、２７０ヌクレオチド、２８０ヌクレオチド、２９０ヌクレオチド、３００ヌクレオチド、３１０ヌクレオチド、３２０ヌクレオチド、３３０ヌクレオチド、３４０ヌクレオチド、３５０ヌクレオチド、３６０ヌクレオチド、３７０ヌクレオチド、３８０ヌクレオチド、３９０ヌクレオチド、４００ヌクレオチド、４１０ヌクレオチド、４２０ヌクレオチド、４３０ヌクレオチド、４４０ヌクレオチド、４５０ヌクレオチド、４６０ヌクレオチド、４７０ヌクレオチド、４８０ヌクレオチド、４９０ヌクレオチド、又は約５００ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、足場配列は、約２０～約５００ヌクレオチド、例えば、２０ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、３５ヌクレオチド、４０ヌクレオチド、４５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、５５ヌクレオチド、６０ヌクレオチド、６５ヌクレオチド、７０ヌクレオチド、７５ヌクレオチド、８０ヌクレオチド、８５ヌクレオチド、９０ヌクレオチド、９５ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、１０５ヌクレオチド　１１０ヌクレオチド、１１５ヌクレオチド、１２０ヌクレオチド、１２５ヌクレオチド、１３０ヌクレオチド、１３５ヌクレオチド、１４０ヌクレオチド、１４５ヌクレオチド、１５０ヌクレオチド、１５５ヌクレオチド、１６０ヌクレオチド、１６５ヌクレオチド、１７０ヌクレオチド、１７５ヌクレオチド、１８０ヌクレオチド、１８５ヌクレオチド、１９０ヌクレオチド、１９５ヌクレオチド、２０

０ヌクレオチド、２０５ヌクレオチド、２１０ヌクレオチド、２１５ヌクレオチド、２２０ヌクレオチド、２２５ヌクレオチド、２３０ヌクレオチド、２３５ヌクレオチド、２４０ヌクレオチド、２４５ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、２５５ヌクレオチド、２６０ヌクレオチド、２６５ヌクレオチド、２７０ヌクレオチド、２７５ヌクレオチド、２８０ヌクレオチド、２８５ヌクレオチド、２９０ヌクレオチド、２９５ヌクレオチド、３００ヌクレオチド、３０５ヌクレオチド、３１０ヌクレオチド、３１５ヌクレオチド、３２０ヌクレオチド、３２５ヌクレオチド、３３０ヌクレオチド、３３５ヌクレオチド、３４０ヌクレオチド、３４５ヌクレオチド、３５０ヌクレオチド、３５５ヌクレオチド、３６０ヌクレオチド、３６５ヌクレオチド、３７０ヌクレオチド、３７５ヌクレオチド、３８０ヌクレオチド、３８５ヌクレオチド、３９０ヌクレオチド、３９５ヌクレオチド、４００ヌクレオチド、４０５ヌクレオチド、４１０ヌクレオチド、４１５ヌクレオチド、４２０ヌクレオチド、４２５ヌクレオチド、４３０ヌクレオチド、４３５ヌクレオチド、４４０ヌクレオチド、４４５ヌクレオチド、４５０ヌクレオチド、４５５ヌクレオチド、４６０ヌクレオチド、４６５ヌクレオチド、４７０ヌクレオチド、４７５ヌクレオチド、４８０ヌクレオチド、４８５ヌクレオチド、４９０ヌクレオチド、４９５ヌクレオチド、又は５００ヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、足場配列は、約２０～約１００ヌクレオチド、例えば、約２０ヌクレオチド、例えば、２０ヌクレオチド、２１ヌクレオチド、２２ヌクレオチド、２３ヌクレオチド、２４ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、２６ヌクレオチド、２７ヌクレオチド、２８ヌクレオチド、２９ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、３１ヌクレオチド、３２ヌクレオチド、３３ヌクレオチド、３４ヌクレオチド、３５ヌクレオチド、３６ヌクレオチド、３７ヌクレオチド、３８ヌクレオチド、３９ヌクレオチド、４０ヌクレオチド、４１ヌクレオチド、４２ヌクレオチド、４３ヌクレオチド、４４ヌクレオチド、４５ヌクレオチド、４６ヌクレオチド、４７ヌクレオチド、４８ヌクレオチド、４９ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、５１ヌクレオチド、５２ヌクレオチド、５３ヌクレオチド、５４ヌクレオチド、５５ヌクレオチド、５６ヌクレオチド、５７ヌクレオチド、５８ヌクレオチド、５９ヌクレオチド、６０ヌクレオチド、６１ヌクレオチド、６２ヌクレオチド、６３ヌクレオチド、６４ヌクレオチド、６５ヌクレオチド、６６ヌクレオチド、６７ヌクレオチド、６８ヌクレオチド、６９ヌクレオチド、７０ヌクレオチド、７１ヌクレオチド、７２ヌクレオチド、７３ヌクレオチド、７４ヌクレオチド、７５ヌクレオチド、７６ヌクレオチド、７７ヌクレオチド、７８ヌクレオチド、７９ヌクレオチド、８０ヌクレオチド、８１ヌクレオチド、８２ヌクレオチド、８３ヌクレオチド、８４ヌクレオチド、８５ヌクレオチド、８６ヌクレオチド、８７ヌクレオチド、８８ヌクレオチド、８９ヌクレオチド、９０ヌクレオチド、９１ヌクレオチド、９２ヌクレオチド、９３ヌクレオチド、９４ヌクレオチド、９５ヌクレオチド、９６ヌクレオチド、９７ヌクレオチド、９８ヌクレオチド、９９ヌクレオチド、又は約１００ヌクレオチドである。

【０１５７】

ｓｇＲＮＡのヌクレオチドは、リボース（例えば、糖）基、リン酸基、核酸塩基、又はそれらの任意の組み合わせにおける修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、リボース基における修飾は、リボースの２’位置における修飾を含む。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、２’フルオロ－アラビノ核酸、三環ＤＮＡ（ｔｃ－ＤＮＡ）、ペプチド核酸、シクロヘキセン核酸（ＣｅＮＡ）、ロック核酸（ＬＮＡ）、エチレン架橋核酸（ＥＮＡ）、ホスホジアミデートモルフォリノ、又はそれらの組み合わせを含む。

【０１５９】

修飾ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体は、糖及び／又は骨格リボヌクレオチド（すなわち、リン酸－糖骨格への修飾を含む）を含み得る。例えば、天然又は自然のＲＮＡのホスホジエステル結合は、窒素又は硫黄ヘテロ原子のうちの少なくとも１つを含むものであり得る。一部の骨格－リボヌクレオチドでは、隣接するリボヌクレオチドに接続するホスホエステル基は、基、例えば、ホスホチオエート基によって置換され得る。一部の糖－

リボヌクレオチドでは、２’部分は、Ｈ、ＯＲ、Ｒ、ハロ、ＳＨ、ＳＲ、Ｈ２、ＨＲ、Ｒ$_2$又はＯＮから選択され、Ｒは、Ｃ$_1$－Ｃ６アルキル、アルケニル、又はアルキニルであり、ハロは、Ｆ、ＣＩ、Ｂｒ、又はＩである。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、糖修飾を含む。糖修飾の非限定的な例としては、２’－デオキシ－２’－フルオロ－オリゴボヌクレオチド（２’－フルオロ－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、２’－フルオロ－２’－デオキシウリジン－５’－三リン酸）、２’－デオキシ－２’－デアミンオリゴリボヌクレオチド（２’－アミノ－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、２’－アミノ－２’－デオキシウリジン－５’－三リン酸）、２’－Ｏ－アルキルオリゴリボヌクレオチド、２’－デオキシ－２’－Ｃ－アルキルオリゴリボヌクレオチド（２’－Ｏ－メチルシチジン－５’－三リン酸、２’－メチルウリジン－５’－三リン酸）、２’－Ｃ－アルキルオリゴリボヌクレオチド、及びその異性体（２’－アラシチジン－５’－三リン酸、２’－アラウリジン－５’－三リン酸）、アジド三リン酸（２’－アジド－２’－デオキシシチジン－５’－三リン酸、２’－アジド－２’－デオキシウリジン－５’－三リン酸）、並びにそれらの組み合わせが挙げられる。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、１つ以上の２’－フルオロ、２’－アミノ、及び／又は２’－チオ修飾を含む。いくつかの事例では、修飾は、２’－フルオロ－シチジン、２’－フルオロ－ウリジン、２’－フルオロ－アデノシン、２’－フルオロ－グアノシン、２’－アミノ－シチジン、２’－アミノ－ウリジン、２’－アミノ－アデノシン、２’－アミノ－グアノシン、２，６－ジアミノプリン、４－チオ－ウリジン、５－アミノ－アリル－ウリジン、５－ブロモ－ウリジン、５－ヨード－ウリジン、５－メチル－シチジン、リボ－チミジン、２－アミノプリン、２’－アミノ－ブチリル－ピレン－ウリジン、５－フルオロ－シチジン、及び／又は５－フルオロ－ウリジンである。

【０１６２】

哺乳動物ＲＮＡ上に見出される９６を超える天然型ヌクレオシド修飾が存在する。例えば、Ｌｉｍｂａｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２２（１２）：２１８３－２１９６（１９９４）を参照されたい。ヌクレオチド並びにヌクレオチド及びヌクレオシドの調製は、当該技術分野で周知であり、例えば、米国特許第４，３７３，０７１号、同第４，４５８，０６６号、同第４，５００，７０７号、同第４，６６８，７７７号、同第４，９７３，６７９号、同第５，０４７，５２４号、同第５，１３２，４１８号、同第５，１５３，３１９号、同第５，２６２，５３０号、及び同第５，７００，６４２号に記載される。本明細書に説明される使用に好適である多数のヌクレオシド及びヌクレオチドが市販されている。ヌクレオシドは、天然型ヌクレオシドの類似体であり得る。いくつかの事例では、類似体は、ジヒドロウリジン、メチルアデノシン、メチルシチジン、メチルウリジン、メチルシュードウリジン、チオウリジン、デオキシシトジン、及びデオキシウリジンである。

【０１６３】

いくつかの事例では、本明細書に記載されるｓｇＲＮＡは、核酸塩基リボヌクレオチド、すなわち、天然型核酸塩基の代わりに、少なくとも１つの非天然型核酸塩基を含むリボヌクレオチドを含む。ヌクレオシド及びヌクレオチドに組み込まれ得る核酸塩基の非限定的な例としては、ｍ５Ｃ（５－メチルシチジン）、ｍ５Ｕ（５－メチルウリジン）、ｍ６Ａ（Ｎ６－メチルアデノシン）、ｓ２Ｕ（２－チオウリジン）、Ｕｍ（２’－Ｏ－メチルウリジン）、ｍｌＡ（１－メチルアデノシン）、ｍ２Ａ（２－メチルアデノシン）、Ａｍ（２－１－Ｏ－メチルアデノシン）、ｍｓ２ｍ６Ａ（２－メチルチオ－Ｎ６－メチルアデノシン）、ｉ６Ａ（Ｎ６－イソペンテニルアデノシン）、ｍｓ２ｉ６Ａ（２－メチルチオ－Ｎ６イソペンテニルアデノシン）、ｉｏ６Ａ（Ｎ６－（シス－ヒドロキシイソペンテニル）アデノシン）、ｍｓ２ｉｏ６Ａ（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）、ｇ６Ａ（Ｎ６－グリシニルカルバモイルアデノシン）、ｔ６Ａ（Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン）、ｍｓ２ｔ６Ａ（２－メチルチオ－Ｎ６－

トレオニルカルバモイルアデノシン）、ｍ６ｔ６Ａ（Ｎ６－メチル－Ｎ６－トレオニルカルバモイルアデノシン）、ｈｎ６Ａ（Ｎ６．－ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン）、ｍｓ２ｈｎ６Ａ（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）、Ａｒ（ｐ）（２’－Ｏ－リボシルアデノシン（リン酸））、Ｉ（イノシン）、ｍｉ　ｌ（１－メチルイノシン）、ｍ’ｌｍ（ｌ，２’－Ｏ－ジメチルイノシン）、ｍ３Ｃ（３－メチルシチジン）、Ｃｍ（２Ｔ－ｏ－メチルシチジン）、ｓ２Ｃ（２－チオシチジン）、ａｃ４Ｃ（Ｎ４－アセチルシチジン）、ｆ５Ｃ（５－フォンニルシチジン）、ｍ５Ｃｍ（５，２－Ｏ－ジメチルシチジン）、ａｃ４Ｃｍ（Ｎ４アセチル２ＴＯメチルシチジン）、ｋ２Ｃ（リシジン）、ｍｌＧ（１－メチルグアノシン）、ｍ２Ｇ（Ｎ２－メチルグアノシン）、ｍ７Ｇ（７－メチルグアノシン）、Ｇｍ（２’－Ｏ－メチルグアノシン）、ｍ２２Ｇ（Ｎ２，Ｎ２－ジメチルグアノシン）、ｍ２Ｇｍ（Ｎ２，２’－Ｏ－ジメチルグアノシン）、ｍ２２Ｇｍ（Ｎ２，Ｎ２，２’－Ｏ－トリメチルグアノシン）、Ｇｒ（ｐ）（２’－Ｏ－リボシルグアノシン（リン酸））、ｙＷ（ワイブトシン）、ｏ２ｙＷ（ペルオキシウイブトシン）、ＯＨｙＷ（ヒドロキシウィブトシン）、ＯＨｙＷ＊（ヒドロキシウィブトシン下）、ｉｍＧ（ワイオシン）、ｍｉｍＧ（メチルグアノシン）、Ｑ（クエオシン）、ｏＱ（エポキシクエンシン）、ｇａｌＱ（ガルタクトシル－クエオシン）、ｍａｎＱ（マンノシル－クエオシン）、ｐｒｅＱｏ（７－シアノ－７－デアザグアノシン）、ｐｒｅＱｉ（７－アミノメチル－７－デアザグアノシン）、Ｇ（アルカエオシン）、Ｄ（ジヒドロウリジン）、ｍ５Ｕｍ（５，２’－Ｏ－ジメチルウリジン）、ｓ４Ｕ（４－チオウリジン）、ｍ５ｓ２Ｕ（５－メチル－２－チオウリジン）、ｓ２Ｕｍ（２－チオ－２’－Ｏ－メチルウリジン）、ａｃｐ３Ｕ（３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）ウリジン）、ｈｏ５Ｕ（５－ヒドロキシウリジン）、ｍｏ５Ｕ（５－メトキシウリジン）、ｃｍｏ５Ｕ（ウリジン５－オキシ酢酸）、ｍｃｍｏ５Ｕ（ウリジン５－オキシ酢酸メチルエステル）、ｃｈｍ５Ｕ（５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン）、ｍｃｈｍ５Ｕ（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）、ｍｃｍ５Ｕ（５－メトキシカルボニルメチルウリジン）、ｍｃｍ５Ｕｍ（Ｓ－メトキシカルボニルメチル－２－Ｏ－メチルウリジン）、ｍｃｍ５ｓ２Ｕ（５－メトキシカルボニルメチル－２－チオウリジン）、ｎｍ５ｓ２Ｕ（５－アミノメチル－２－チオウリジン）、ｍｎｍ５Ｕ（５－メチルアミノメチルウリジン）、ｍｎｍ５ｓ２Ｕ（５－メチルアミノメチル－２－チオウリジン）、ｍｎｍ５ｓｅ２Ｕ（５－メチルアミノメチル－２－セレンウリジン）、ｎｃｍ５Ｕ（５－カルバモイルメチルウリジン）、ｎｃｍ５Ｕｍ（５－カルバモイルメチル－２’－Ｏ－メチルウリジン）、ｃｍｎｍ５Ｕ（５－カルボキシメチルアミノメチルウリジン）、ｃｎｍｍ５Ｕｍ（５－カルボキシメチルアミノメチル－２－Ｌ－Ｏメチルウリジン）、ｃｍｎｍ５ｓ２Ｕ（５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン）、ｍ６２Ａ（Ｎ６，Ｎ６－ジメチルアデノシン）、Ｔｍ（２’－Ｏ－メチルイノシン）、ｍ４Ｃ（Ｎ４－メチルシチジン）、ｍ４Ｃｍ（Ｎ４，２－Ｏ－ジメチルシチジン）、ｈｍ５Ｃ（５－ヒドロキシメチルシチジン）、ｍ３Ｕ（３－メチルウリジン）、ｃｍ５Ｕ（５－カルボキシメチルウリジン）、ｍ６Ａｍ（Ｎ６，Ｔ－Ｏ－ジメチルアデノシン）、ｒｎ６２Ａｍ（Ｎ６，Ｎ６，０－２－トリメチルアデノシン）、ｍ２’７Ｇ（Ｎ２，７－ジメチルグアノシン）、ｍ２’２’７Ｇ（Ｎ２，Ｎ２，７－トリメチルグアノシン）、ｍ３Ｕｍ（３，２Ｔ－Ｏ－ジメチルウリジン）、ｍ５Ｄ（５－メチルジヒドロウリジン）、ｆ５Ｃｍ（５－ホルミル－２’－Ｏ－メチルシチジン）、ｍｌＧｍ（１，２’－Ｏ－ジメチルグアノシン）、ｍ’Ａｍ（１，２－Ｏ－ジメチルアデノシン）イリノメチルウリジン）、ｔｍ５ｓ２Ｕ（Ｓ－タウリノメチル－２－チオウリジン））、ｉｍＧ－１４（４－デメチルグアノシン）、ｉｍＧ２（イソグアノシン）、又はａｃ６Ａ（Ｎ６－アセチルアデノシン）、ヒポキサンチン、イノシン、８－オキソ－アデニン、それらの７－置換誘導体、ジヒドロウラシル、シュードウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－アミノウラシル、５－（C_1－C_6）－アルキルウラシル、５－メチルウラシル、５－（C_2－C_6）－アルケニルウラシル、５－（C_2－C_6）－アルキニルウラシル、５－（ヒドロキシメチル）ウラシル、５－クロロウラシル、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－ヒ

ドロキシシトシン、５－（Ｃ$_1$－Ｃ$_6$）－アルキルシトシン、５－メチルシトシン、５－（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）－アルケニルシトシン、５－（Ｃ$_2$－Ｃ$_6$）－アルキニルシトシン、５－クロロシトシン、５－フルオロシトシン、５－ブロモシトシン、Ｎ^2－ジメチルグアニン、７－デアザグアニン、８－アザグアニン、７－デアザ－７－置換グアニン、７－デアザ－７－（Ｃ２－Ｃ６）アルキニルグアニン、７－デアザ－８－置換グアニン、８－ヒドロキシグアニン、６－チオグアニン、８－オキソグアニン、２－アミノプリン、２－アミノ－６－クロロプリン、２，４－ジアミノプリン、２，６－ジアミノプリン、８－アザプリン、置換７－デアザプリン、７－デアザ－７－置換プリン、７－デアザ－８－置換プリン、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

【０１６４】

ｓｇＲＮＡは、当業者に既知の任意の方法によって合成され得る。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、化学的に合成される。修飾されたｓｇＲＮＡは、２’－Ｏ－チオノカルバメート－保護ヌクレオシドホスホラミダイトを使用して合成され得る。方法は、例えば、Ｄｅｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，１３３，１１５４０－１１５５６（２０１１）、Ｔｈｒｅｌｆａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｏｒｇａｎｉｃ＆Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１０，７４６－７５４（２０１２）、及びＤｅｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，１２５，９４０－９５０（２００３）に説明される。修飾されたｓｇＲＮＡは、例えば、ＴｒｉＬｉｎｋ ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から市販されている。

【０１６５】

有用なｓｇＲＮＡの追加の詳細な説明は、例えば、Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，２０１５，３３（９）：９８５－９８９及びＤｅｖｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１６，５３９：３８４－３８９に見出され得、その開示は、参照によりその全体で全ての目的のために本明細書に組み込まれる。

【０１６６】

当業者であれば、本開示に開示されているガイドＲＮＡが、当該技術分野で既知の任意のＣａｓタンパク質（例えば、任意の好適な生物又は細菌種からのものと組み合わせて使用され得ることを理解するであろう。

【０１６７】

Ｃａｓタンパク質は、Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型、Ｖ型、又はＶＩ型Ｃａｓタンパク質であり得る。Ｃａｓタンパク質は、１つ以上のドメインを含み得る。ドメインの非限定的な例としては、ガイド核酸認識及び／又は結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン（例えば、ＤＮａｓｅ又はＲＮａｓｅドメイン、ＲｕｖＣ、ＨＮＨ）、ＤＮＡ結合ドメイン、ＲＮＡ結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質間相互作用ドメイン、及び二量体化ドメインが挙げられる。ガイド核酸認識及び／又は結合ドメインは、ガイド核酸と相互作用し得る。ヌクレアーゼドメインは、核酸切断のための触媒活性を含み得る。ヌクレアーゼドメインは、核酸切断を予防するように触媒活性を欠き得る。Ｃａｓタンパク質は、他のタンパク質又はポリペプチドに融合されるキメラＣａｓタンパク質であってもよい。Ｃａｓタンパク質は、例えば、異なるＣａｓタンパク質由来のドメインを含む、様々なＣａｓタンパク質のキメラであってもよい。

【０１６８】

Ｃａｓタンパク質の非限定的な例としては、ｃ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ５ｅ（ＣａｓＤ）、Ｃａｓｈ、Ｃａｓ６ｅ、Ｃａｓ６ｆ、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８ａ、Ｃａｓ８ａ１、Ｃａｓ８ａ２、Ｃａｓ８ｂ、Ｃａｓ８ｃ、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１又はＣｓｘ１２）、Ｃａｓ１０、Ｃａｓ１０ｄ、Ｃａｓ１Ｏ、Ｃａｓ１Ｏｄ、ＣａｓＦ、ＣａｓＧ、ＣａｓＨ、Ｃｐｆ１、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１（ＣａｓＡ）、Ｃｓｅ２（ＣａｓＢ）、Ｃｓｅ３（ＣａｓＥ）、Ｃｓｅ４（ＣａｓＣ）、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５

、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、及びＣｕｌ９６６、並びにそれらの相同体又は修飾されたバージョンが挙げられる。

【０１６９】

Ｃａｓタンパク質は、任意の好適な生物由来であり得る。非限定的な例としては、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、Ｎｏｃａｒｄｉｏｐｓｉｓ ｄａｓｓｏｎｖｉｌｌｅｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｐｒｉｓｔｉｎａｅ ｓｐｉｒａｌｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏ ｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、ＡｌｉｃｙｃｌｏｂａｃＨｌｕｓ ａｃｉｄｏｃａｌｄａｒｉｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｓｅｕｄｏｍｙｃｏｉｄｅｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｅｌｅｎｉｔｉｒｅｄｕｃｅｎｓ、Ｅｘｉｇｕｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｉｂｉｒｉｃｕｍ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓａｌｉｖａｒｉｕｓ、Ｍｉｃｒｏｓｃｉｌｌａ ｍａｒｉｎａ、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａｌｅｓ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ ｎａｐｈｔｈａｌｅｎｉｖｏｒａｎｓ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ ｓｐ．、Ｃｒｏｃｏｓｐｈａｅｒａ ｗａｔｓｏｎｉｉ、Ｃｙａｎｏｔｈｅｃｅ ｓｐ．、Ｍｉｃｒｏｃｙｓｔｉｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ａｃｅｔｏｈａｌｏｂｉｕｍ ａｒａｂａｔｉｃｕｍ、Ａｍｍｏｎｉｆｅｘ ｄｅｇｅｎｓｉｉ、Ｃａｌｄｉｃｅｌｕｌｏｓｉｒｕｐｔｏｒ ｂｅｃｓｃｉｉ、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｄｅｓｕｌｆｏｒｕｄｉｓ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ、Ｆｉｎｅｇｏｌｄｉａ ｍａｇｎａ、Ｎａｔｒａｎａｅｒｏｂｉｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｅｌｏｔｏｍａｃｕｌｕｍ ｔｈｅｒｍｏｐｒｏｐｉｏｎｉｃｕｍ、Ａｃｉｄｉｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｃａｌｄｕｓ、Ａｃｉｄｉｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｆｅｒｒｏｏｘｉｄａｎｓ、Ａｌｌｏｃｈｒｏｍａｔｉｕｍ ｖｉｎｏｓｕｍ、Ｍａｒｉｎｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ．、Ｎｉｔｒｏｓｏｃｏｃｃｕｓ ｈａｌｏｐｈｉｌｕｓ、Ｎｉｔｒｏｓｏｃｏｃｃｕｓ ｗａｔｓｏｎｉ、Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ ｈａｌｏｐｌａｎｋｔｉｓ、Ｋｔｅｄｏｎｏｂａｃｔｅｒ ｒａｃｅｍｉｆｅｒ、Ｍｅｔｈａｎｏｈａｌｏｂｉｕｍ ｅｖｅｓｔｉｇａｔｕｍ、Ａｎａｂａｅｎａ ｖａｒｉａｂｉｌｉｓ、Ｎｏｄｕｌａｒｉａ ｓｐｕｍｉｇｅｎａ、Ｎｏｓｔｏｃ ｓｐ．、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｍａｘｉｍａ、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｐｌａｔｅｎｓｉｓ、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｓｐ．、Ｌｙｎｇｂｙａ ｓｐ．、Ｍｉｃｒｏｃｏｌｅｕｓ ｃｈｔｈｏｎｏｐｌａｓｔｅｓ、Ｏｓｃｉｌｌａｔｏｒｉａ ｓｐ．、Ｐｅｔｒｏｔｏｇａ ｍｏｂｉｌｉｓ、Ｔｈｅｒｍｏｓｉｐｈｏ ａｆｒｉｃａｎｕｓ、Ａｃａｒｙｏｃｈｌｏｒｉｓ ｍａｒｉｎａ、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ、及びＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａが挙げられる。いくつかの態様では、生物は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）である。いくつかの態様では、生物は、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ）である。いくつかの態様では、生物は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）である。

【０１７０】

Ｃａｓタンパク質は、これらに限定されないが、Ｖｅｉｌｌｏｎｅｌｌａ ａｔｙｐｉｃａｌ、Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｕｃｌｅａｔｕｍ、Ｆｉｌｉｆａｃｔｏｒ ａｌｏｃｉｓ、Ｓｏｌｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｍｏｏｒｅｉ、Ｃｏｐｒｏｃｏｃｃｕｓ ｃａｔｕｓ、Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｄｅｎｔｉｃｏｌａ、Ｐｅｐｔｏｎｉｐｈｉｌｕｓ ｄｕｅｒｄｅｎｉｉ、Ｃａｔｅｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｍｉｔｓｕｏｋａｉ、Ｓｔｒｅｐ

tococcus mutans、Listeria innocua、Staphylococcus pseudintermedius、Acidaminococcus intestine、Olsenella uli、Oenococcus kitaharae、Bifidobacterium bifidum、Lactobacillus rhamnosus、Lactobacillus gasseri、Finegoldia magna、Mycoplasma mobile、Mycoplasma gallisepticum、Mycoplasma ovipneumoniae、Mycoplasma canis、Mycoplasma synoviae、Eubacterium rectale、Streptococcus thermophilus、Eubacterium dolichum、Lactobacillus coryniformis subsp. Torquens、Ilyobacter polytropus、Ruminococcus albus、Akkermansia muciniphila、Acidothermus cellulolyticus、Bifidobacterium longum、Bifidobacterium dentium、Corynebacterium diphtheria、Elusimicrobium minutum、Nitratifractor salsuginis、Sphaerochaeta globus、Fibrobacter succinogenes subsp. Succinogenes、Bacteroides fragilis、Capnocytophaga ochracea、Rhodopseudomonas palustris、Prevotella micans、Prevotella ruminicola、Flavobacterium columnare、Aminomonas paucivorans、Rhodospirillum rubrum、Candidatus Puniceispirillum marinum、Verminephrobacter eiseniae、Ralstonia syzygii、Dinoroseobacter shibae、Azospirillum、Nitrobacter hamburgensis、Bradyrhizobium、Wolinella succinogenes、Campylobacter jejuni subsp. Jejuni、Helicobacter mustelae、Bacillus cereus、Acidovorax ebreus、Clostridium perfringens、Parvibaculum lavamentivorans、Roseburia intestinalis、Neisseria meningitidis、Pasteurella multocida subsp. Multocida、Sutterella wadsworthensis、proteobacterium、Legionella pneumophila、Parasutterella excrementihominis、Wolinella succinogenes、及びFrancisella noviciaを含む様々な細菌種由来であり得る。「由来」という用語は、この事例では、天然型の様々な細菌種に対して有意な部分又は有意な相同性を維持するために、天然型の様々な細菌種から修飾されたものとして定義される。有意な部分は、少なくとも１０個の連続ヌクレオチド、少なくとも２０個の連続ヌクレオチド、少なくとも３０個の連続ヌクレオチド、少なくとも４０個の連続ヌクレオチド、少なくとも５０個の連続ヌクレオチド、少なくとも６０個の連続ヌクレオチド、少なくとも７０個の連続ヌクレオチド、少なくとも８０個の連続ヌクレオチド、少なくとも９０個の連続ヌクレオチド、又は少なくとも１００個の連続ヌクレオチドであり得る。有意な相同性は、少なくとも５０％相同、最後の６０％相同、少なくとも７０％相同、少なくとも８０％相同、少なくとも９０％相同、又は少なくとも９５％相同であり得る。派生種は、天然型の種類の活性を保持しながら修飾されてもよい。

【０１７１】

遺伝子編集方法

上で考察されたように、本開示の実施形態は、関節障害を治療するために組成物及び方

法を提供し、関節細胞の一部分は、関節障害を治療するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾される。本開示の実施形態は、１つ以上のタンパク質の発現の促進、及び１つ以上のタンパク質の発現の阻害、並びにそれらの組み合わせの両方のために、ヌクレオチド挿入（ＲＮＡ若しくはＤＮＡ）、又は組換えタンパク質挿入を通した滑膜細胞の集団への遺伝子編集を包含する。本開示の実施形態はまた、遺伝子編集組成物を関節細胞に送達する、特に遺伝子編集組成物を滑膜細胞に送達するための方法を提供する。関節細胞を遺伝子修飾するために使用され得る数個の遺伝子編集技術が存在し、これは、本開示による使用に好適である。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、関節細胞を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生のための遺伝子の安定的な組み込みのステップを含む。一実施形態では、関節の滑膜細胞の一部分を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入のステップを含む。一実施形態では、関節の滑膜細胞の一部分を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入のステップを含む。レンチウイルス形質導入システムは、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ１９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号に説明され、これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態では、関節の滑膜細胞の一部分を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入のステップを含む。ガンマ－レトロウイルス形質導入システムは、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｃｅｐｋｏ ａｎｄ Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に説明され、この開示は、参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態では、関節の滑膜細胞の一部分を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入のステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入システムは、当該技術分野で既知であり、トランスポサーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとして、又は発現性ＲＮＡ若しくはタンパク質として提供され、それにより、トランスポサーゼの長期発現が、トランスジェニック細胞、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡテールを含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポサーゼで起こらないシステムを含む。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ型Ｔｅｌ様トランスポサーゼ（ＳＢ又はＳｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポサーゼ）、並びに増加した酵素活性を伴う操作された酵素を含む、好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入システムは、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ ２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に説明されており、それらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１７３】

いくつかの態様では、ウイルスベクター又はシステムは、関節を含む細胞に遺伝子編集システムを導入するために使用される。いくつかの態様では、細胞は、滑膜線維芽細胞である。いくつかの態様では、ウイルスベクターは、ＡＡＶベクターである。いくつかの態様では、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ１（Ｙ７０５＋７３１Ｆ＋Ｔ４９２Ｖ）、ＡＡＶ２（Ｙ４４４＋５００＋７３０Ｆ＋Ｔ４９１Ｖ）、ＡＡＶ３（Ｙ７０５＋７３１Ｆ）、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ５（Ｙ４３６＋６９３＋７１９Ｆ）、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６（ＶＰ３バリアントＹ７０５Ｆ／Ｙ７３１Ｆ／Ｔ４９２Ｖ）、ＡＡＶ－７ｍ８、ＡＡＶ８、ＡＡＶ８（Ｙ７３３Ｆ）、ＡＡＶ９、ＡＡＶ９（ＶＰ３バリアントＹ７３１Ｆ）、ＡＡＶ１０（Ｙ７３３Ｆ）、ＡＡＶ－ＳｈＨ１０、及びＡＡＶ－ＤＪ／８からなる群から選択される血清型を含む。いくつかの態様では、ＡＡＶベクターが、ＡＡＶ１、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６（Ｙ７０５Ｆ／Ｙ７３１Ｆ／Ｔ４９２Ｖ）、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、及びＡＡＶ９（Ｙ７３１Ｆ）からなる群から選択される血清型を含む。

【０１７４】

いくつかの態様では、ウイルスベクターは、レンチウイルスである。一態様では、レン

チウイルスは、ヒト免疫不全－１（ＨＩＶ－１）、ヒト免疫不全－２（ＨＩＶ－２）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ネコ免疫不全ウイルス（ＦＩＶ）、ウシ免疫不全ウイルス（ＢＩＶ）、ジャンブラナ病ウイルス（ＪＤＶ）、ウマ感染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）、及びヤギ関節炎脳炎ウイルス（ＣＡＥＶ）からなる群から選択される。

【０１７５】

一実施形態では、関節の滑膜細胞の一部分を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生又は阻害（例えば、サイレンシング）のための遺伝子を安定的な組み込みの工程を含む。一実施形態では、関節の滑膜細胞の一部分を遺伝子修飾する方法は、リポソーム形質導入のステップを含む。カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及び濾過水中のジオレオイルホホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法などのリポソームトランスフェクション法は、当該技術分野で既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ１９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、並びに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されている。一実施形態では、関節の滑膜細胞の一部分を遺伝子修飾する方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載される方法を使用するトランスフェクションのステップを含み、これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１７６】

実施形態によると、遺伝子編集プロセスは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子で二本鎖又は一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能ヌクレアーゼの使用を含み得る。そのようなプログラム可能ヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって、精密なゲノム編集を可能にし、すなわち、それらは、ゲノム内の特定のＤＮＡ配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの場所に標的化し、標的配列における二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡの二本鎖切断は、その後、切断部位に内因性修復機構を呼び起こして、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）又は相同性指向修復（ＨＤＲ）のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、結果として、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンシング、抑制、又は増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらし得る。

【０１７７】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発された主要なクラスのヌクレアーゼとしては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写アクチベーター様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９）が挙げられる。これらのヌクレアーゼシステムは、それらのＤＮＡ認識の様式に基づいて、大きく２つのカテゴリーに分類され得る。ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特異的ＤＮＡ結合を達成するが、それに対して、Ｃａｓ９などのＣＲＩＳＰＲシステムは、標的ＤＮＡと直接塩基対となる短いＲＮＡガイド分子によって、及びタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって、特異的ＤＮＡ配列に標的化される。例えば、Ｃｏｘ　ｅｔ　ａｌ．，ＮａｔｕｒｅＭｅｄｉｃｉｎｅ，２０１５，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．２を参照されたい。

【０１７８】

本開示の方法に従って使用され得る遺伝子編集方法の非限定的な例としては、以下により詳細に説明される、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及びＺＦＮ法が挙げられる。

【０１７９】

ＣＲＩＳＰＲ法

遺伝子編集システムを含む関節の疾患又は状態の治療又は予防のための医薬組成物であって、遺伝子編集システムが、関節機能に関連する少なくとも１つの遺伝子座を標的とし

、関節の滑膜細胞の少なくとも一部分をＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３ａ、又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１２ａとしても既知）によって遺伝子編集する、医薬組成物。特定の実施形態によると、関節滑膜細胞を遺伝子編集するためのＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、関節の滑膜細胞の少なくとも一部分でサイレンシング又は低減させる。

【０１８０】

ＣＲＩＳＰＲは、「クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔｓ）」の略である。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲシステムを使用する方法はまた、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込み、かつ本開示に従って使用され得る、３つのタイプのＣＲＩＳＰＲシステム、ＩＩ型、Ｖ型、及びＶＩ型が存在する。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ（Ｃａｓ９によって例示される）は、最もよく特徴付けされたシステムのうちの１つである。

【０１８１】

ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から転用された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来ＲＮＡ、及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来性侵入者のＤＮＡ又はＲＮＡを細断及び破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を妨げる。ＣＲＩＳＰＲは、２つの別個の特徴、ヌクレオチド反復及びスペーサーの存在を有する、ＤＮＡの専門領域である。ヌクレオチドの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布し、外来性ＤＮＡの短いセグメント（スペーサー）が反復配列中に散在する。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムでは、スペーサーは、ＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、短いＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に転写され、処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）をアニールし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的切断及びサイレンシングを誘導する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識は、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列、及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流の保存されたジヌクレオチド含有プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列を必要とする。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、それによって、再標的化されて、ｃｒＲＮＡを再設計することによって、事実上、任意のＤＮＡ配列を切断することができる。天然システム内のｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子操作で使用するために、およそ１００ヌクレオチドのシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に単純化され得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを発現するプラスミド、並びに必要なｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡ（又はｓｇＲＮＡ）成分の同時送達によって、ヒト細胞に直接移植可能である。Ｃａｓタンパク質の異なるバリアントが、標的化制限を低減するために使用され得る（例えば、Ｃｐｆ１などのＣａｓ９のオルソログ）。

【０１８２】

ＣＲＳＩＰＲ－Ｃａｓ媒介相同組換え

相同組換え（ＨＲ）のためのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼ）又はそのバリアント若しくは断片と、Ｃａｓヌクレアーゼを標的ゲノムＤＮＡに標的化するガイド配列及びＣａｓヌクレアーゼと相互作用する足場配列を含有するＤＮＡ標的化ＲＮＡ（例えば、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ））と、ドナーテンプレートと、を含む。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、細胞のゲノム中の所望の標的遺伝子座で二本鎖切断を生じさせ、細胞の内因性機構を利用して、相同性指向修復（ＨＤＲ）によって誘発された切断を修復するために利用され得る。

【０１８３】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、ＡＡＶベクターによって送達される外因性ＤＮＡの遺伝子座特異的染色体組み込みを容易にし得る。典型的には、組み込まれ得る外因性ＤＮＡ（例えば、導入遺伝子、発現カセットなど）のサイズは、約４．０ｋｂであるＡＡＶベクターのＤＮＡパッケージング能力によって制限される。相同組換えに必要である

２つの相同アームを含めると、単一のＡＡＶベクターは、約３．７ｋｂ未満の外因性ＤＮＡのみを送達し得る。本明細書に説明される方法は、２つの異なるＡＡＶベクター間でヌクレオチド配列を分割することによって、４ｋｂ以上である外因性ＤＮＡの送達を可能にする。ドナーテンプレートは、ヌクレオチド配列の２つの部分を組み込み、融合し得る、連続相同組換え事象のために設計される。

【０１８４】

本開示の相同組換えは、これらに限定されないが、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、操作されたメガヌクレアーゼなどの、ゲノム編集のための操作されたヌクレアーゼシステムを使用して実施され得る。一態様では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓベースのヌクレアーゼシステムが使用される。有用なヌクレアーゼシステムの詳細な説明は、例えば、Ｇａｊ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，２０１３，Ｊｕｌ：３１（７）：３９７－４０５に見出され得る。

【０１８５】

任意の好適なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、本明細書に開示される方法及び組成物に使用され得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、様々な命名システムを使用して言及され得る。例示的な命名システムは、Ｍａｋａｒｏｖａ，Ｋ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ，“Ａｎ　ｕｐｄａｔｅｄ　ｅｖｏｌｕｔｉｏｎａｒｙ　ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ　ｓｙｓｔｅｍｓ，”Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ（２０１５）１３：７２２－７３６、及びＳｈｍａｋｏｖ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ，“Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　ａｎｄ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｄｉｖｅｒｓｅ　Ｃｌａｓｓ　２　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，”Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ（２０１５）６０：１－１３に提供されている。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型、Ｖ型、ＶＩ型、又は任意の他の好適なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムであり得る。本明細書で使用される場合、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、クラス１、クラス２、又は任意の他の好適に分類されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムであり得る。クラス１のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、複数のＣａｓタンパク質の複合体を使用して、調節効果をもたらし得る。クラス１のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、例えば、Ｉ型（例えば、Ｉ、ＩＡ、ＩＢ、ＩＣ、ＩＤ、ＩＥ、ＩＦ、ＩＵ）、ＩＩＩ型（例えば、ＩＩＩ、ＩＩＩＡ、ＩＩＩＢ、ＩＩＩＣ、ＩＩＩＤ）、及びＩＶ型（例えば、ＩＶ、ＩＶＡ、ＩＶＢ）のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓの型を含み得る。クラス２のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、単一の大きいＣａｓタンパク質を使用して、調節効果をもたらし得る。クラス２のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、例えば、ＩＩ型（例えば、ＩＩ、ＩＩＡ、ＩＩＢ）及びＶ型のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓの型を含み得る。ＣＲＩＳＰＲシステムは、互いに相補的であってもよく、かつ／又はＣＲＩＳＰＲ遺伝子座の標的化を容易にするために、トランスにおいて機能単位を与え得る。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、組換え発現ベクター中に存在する。ある特定の事例では、組換え発現ベクターは、ウイルス構築物、例えば、組換えアデノ随伴ウイルス構築物、組換えアデノウイルス構築物、組換えレンチウイルス構築物などである。例えば、ウイルスベクターは、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ＳＶ４０、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルスなどに基づき得る。レトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、及び、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、レンチウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、乳腺腫瘍ウイルスなどのレトロウイルス由来のベクターに基づき得る。有用な発現ベクターは、当業者に既知であり、多くが市販されている。真核宿主細胞に対する例として、以下のベクター、ｐＸＴｌ、ｐＳＧ５、ｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧ、及びｐＳＶＬＳＶ４０が提供される。しかしながら、任意の他のベクターが、宿主細胞と適合性がある場合に使用され得る。例えば、Ｃａｓ９酵素をコードするヌクレオチド配列を含む有用な発現

ベクターは、例えば、Ａｄｄｇｅｎｅ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、及びＯｒｉｇｅｎｅから市販されている。

【０１８７】

宿主細胞は、感染性ＡＡＶベクターを生成するために、並びに開示されたＡＡＶベクターに基づいてＡＡＶビリオンを生成するために必要である。様々な宿主細胞が当該技術分野で既知であり、本開示の方法における使用を見出す。本明細書に説明される、又は当該技術分野で既知の任意の宿主細胞が、本明細書に説明される組成物及び方法とともに用いられ得る。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、感染性ビリオンの生成に使用するための宿主細胞は、原核（例えば、細菌）細胞を含む任意の生物有機体、並びに昆虫細胞、酵母細胞、及び哺乳動物細胞を含む真核細胞から選択され得る。様々な細胞、例えば、マウス細胞を含む、例えば、哺乳動物細胞、及び霊長類細胞（例えば、ヒト細胞）は、使用され得る。特に所望の宿主細胞は、限定なしで、Ａ５４９、ＷＥＨＩ、３Ｔ３、１０Ｔ１／２、ＢＨＫ、ＭＤＣＫ、ＣＯＳ　１、ＣＯＳ　７、ＢＳＣ　１、ＢＳＣ　４０、ＢＭＴ　１０、ＶＥＲＯ、ＷＩ３８、ＨｅＬａ、ＣＨＯ、２９３、Ｖｅｒｏ、ＮＩＨ　３Ｔ３、ＰＣ１２、Ｈｕｈ－７　Ｓａｏｓ、Ｃ２Ｃ１２、ＲＡＴ１、Ｓｆ９、Ｌ細胞、ＨＴ１０８０、ヒト胚性腎臓（ＨＥＫ）、ヒト胚性幹細胞、ヒト成人組織幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、リプログラミング幹細胞、オルガノイド幹細胞、骨髄幹細胞、ＨＬＨｅｐＧ２、ＨｅｐＧ２、並びにヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、及びハムスターを含む哺乳動物由来の初代線維芽細胞、肝細胞、及び筋芽細胞などの、細胞を含む、任意の哺乳動物種の中から選択される。使用される細胞の要件は、ＡＡＶベクターによる感染又はトランスフェクションが可能であることである。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ｒｅｐを有し、かつ細胞内で安定的にトランスフェクトされたｃａｐを有するものである。

【０１８９】

いくつかの実施形態では、本開示による宿主細胞の調製は、選択されたＤＮＡ配列のアセンブリなどの技術を伴う。このアセンブリは、従来的な技術を利用して達成され得る。そのような技術は、周知であり、上記に引用されたＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．に説明されているｃＤＮＡ及びゲノムクローニング、ポリメラーゼ連鎖反応と組み合わせられたアデノウイルス及びＡＡＶゲノムの重複オリゴヌクレオチド配列の使用、合成方法、並びに所望のヌクレオチド配列を提供するための任意の他の好適な方法を含む。

【０１９０】

ＡＡＶベクターに加えて、宿主細胞は、ＡＡＶカプシドポリペプチドの発現を駆動する配列を含有し得る（宿主細胞、並びにＡＡＶベクター内に見出されるＡＡＶ逆位末端反復（ＩＴＲ）の血清型と同じ血清型、又は交差相補血清型のｒｅｐ（複製）配列において。ＡＡＶカプシド及びｒｅｐ（複製）配列は、ＡＡＶソースから独立して取得され得、当業者に既知の任意の様式で、又は本明細書に説明されるように宿主細胞内に導入され得る。加えて、ＡＡＶ８カプシドにおいてＡＡＶベクターをシュードタイピングするとき、例えば、必須のｒｅｐ（複製）タンパク質の各々をコードする配列は、ＡＡＶ８によって供給され得るか、又はｒｅｐ（複製）タンパク質をコードする配列は、異なるＡＡＶ血清型（例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、及び／又はＡＡＶ９）によって供給され得る。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、好適なプロモーターの制御下でカプシドタンパク質を安定的に含む。いくつかの実施形態では、カプシドタンパク質は、トランスにおいて宿主細胞に供給される。トランスにおいて宿主細胞に送達されるとき、カプシドタンパク質は、宿主細胞中の選択されたカプシドタンパク質の発現を指示するために必要な配列を含有するプラスミドを介して送達され得る。いくつかの実施形態では、トランスにおいて宿主細胞に送達されるとき、カプシドタンパク質をコードするベクターはまた、ＡＡＶをパッケージングするために必要な他の配列、例えば、ｒｅｐ（複製）配列も担持する。

【０１９２】
いくつかの実施形態では、宿主細胞は、好適なプロモーターの制御下でｒｅｐ（複製）配列を安定的に含む。別の実施形態では、ｒｅｐ（複製）タンパク質は、トランスにおいて宿主細胞に供給される。トランスにおいて宿主細胞に送達されるとき、ｒｅｐ（複製）タンパク質は、宿主細胞中の選択されたｒｅｐ（複製）タンパク質の発現を誘導するために必要な配列を含有するプラスミドを介して送達され得る。いくつかの実施形態では、トランスにおいて宿主細胞に送達されるとき、カプシドタンパク質をコードするベクター（はまた、ＡＡＶベクターをパッケージングするために必要な他の配列、例えば、ｒｅｐ（複製）配列も担持する。

【０１９３】
いくつかの実施形態では、ｒｅｐ（複製）配列及びカプシド配列は、単一の核酸分子上で宿主細胞内にトランスフェクトされ、細胞内で組み込まれていないエピソームとして安定して存在し得る。別の実施形態では、ｒｅｐ（複製）及びカプシド配列は、細胞の染色体内に安定的に統合される。別の実施形態は、宿主細胞中に一時的に発現されるｒｅｐ（複製）配列及びカプシド配列を有する。例えば、そのようなトランスフェクションのための有用な核酸分子は、５’から３’の方向に、プロモーター、プロモーターとｒｅｐ（複製）遺伝子配列の開始部位との間に介在される任意選択のスペーサー、ＡＡＶ　ｒｅｐ（複製）遺伝子配列、及びＡＡＶカプシド遺伝子配列を含む。

【０１９４】
ｒｅｐ（複製）及びカプシドを提供する分子は、宿主細胞に一時的に（すなわち、トランスフェクションを通じて）存在し得るが、いくつかの実施形態では、ｒｅｐ（複製）及びカプシドタンパク質並びにそれらの発現を制御するプロモーターのうちの一方又は両方は、宿主細胞内で、例えば、エピソームとして、又は宿主細胞の染色体への組み込みによって、安定的に発現される。本開示の実施形態を構築するために用いられる方法は、上記の参考文献に説明されるものなどの、従来の遺伝子工学又は組換え工学技術である。

【０１９５】
ＡＡＶビリオンを生成する様々な方法は、当該技術分野で既知であり、本明細書に説明されるＡＡＶベクターを含むＡＡＶビリオンを生成するために使用され得る。一般的に、本開示のＡＡＶベクターを、ＡＡＶベクターをＡＡＶビリオンにパッケージングすることができる宿主細胞に挿入又は形質導入することを伴った。例示的な方法は、以下に説明及び参照されるが、当業者に既知の任意の方法は、本開示のＡＡＶビリオンを生成するために用いられ得る。

【０１９６】
異種核酸（例えば、ドナーテンプレート）を含み、かつＡＡＶビリオンを生成するために使用されるＡＡＶベクターは、当該技術分野で周知である方法を使用して構築され得る。例えば、Ｋｏｅｒｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００９）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，１７：２０８８、Ｋｏｅｒｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ．，１６：１７０３－１７０９、並びに米国特許第７，４３９，０６５号、同第６，９５１，７５８号、及び同第６，４９１，９０７号を参照されたい。例えば、異種配列は、主要なＡＡＶオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）がそこから切除された状態で、ＡＡＶゲノムに直接挿入され得る。ＩＴＲの十分な部分が複製及びパッケージング機能を可能にするように残っている限り、ＡＡＶゲノムの他の部分もまた、欠失され得る。そのような構築物は、当該技術分野で周知の技術を使用して設計され得る。例えば、米国特許第５，１７３，４１４号及び同第５，１３９，９４１号、国際公開第９２／０１０７０号（１９９２年１月２３日公開）及び同第９３／０３７６９号（１９９３年３月４日公開）、Ｌｅｂｋｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｍｏｌｅｃ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．８：３９８８－３９９６、Ｖｉｎｃｅｎｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｖａｃｃｉｎｅｓ　９０（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ）、Ｃａｒｔｅｒ，Ｂ．Ｊ．（１９９２）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３：５３３－５３９、Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｎ．（１９９２）Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ　Ｍｉ

ｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：９７－１２９、Ｋｏｔｉｎ，Ｒ．Ｍ．（１９９４）Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：７９３－８０１、Ｓｈｅｌｌｉｎｇ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ（１９９４）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：１６５－１６９、並びにＺｈｏｕ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７９：１８６７－１８７５を参照されたい。

【０１９７】

ＡＡＶビリオンを産生するために、ＡＡＶベクターは、トランスフェクションなどによって、既知の技術を使用して好適な宿主細胞に導入される。いくつかのトランスフェクション技術は、当該技術分野で一般的に既知である。例えば、Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．（１９７３）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，５２：４５６、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｂａｓｉｃ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、及びＣｈｕ ｅｔ ａｌ．（１９８１）Ｇｅｎｅ １３：１９７を参照されたい。特に好適なトランスフェクション方法としては、リン酸カルシウム共沈殿法（Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．（１９７３）Ｖｉｒｏｌ．５２：４５６－４６７）、培養細胞への直接マイクロインジェクション（Ｃａｐｅｃｃｈｉ，Ｍ．Ｒ．（１９８０）Ｃｅｌｌ２２：４７９－４８８）、電気穿孔（Ｓｈｉｇｅｋａｗａ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｂｉｏ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ６：７４２－７５１）、リポソーム媒介遺伝子導入（Ｍａｎｎｉｎｏ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｂｉｏ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ６：６８２－６９０）、脂質媒介形質導入（Ｆｅｌｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８４：７４１３－７４１７）、及び高速マイクロプロジェクタを使用した核酸送達（Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ ３２７：７０－７３）が挙げられる。

【０１９８】

使用される発現システムに応じて、プロモーター、転写エンハンサー、転写ターミネーターなどを含む、いくつかの転写及び翻訳制御エレメントのいずれかが、発現ベクターに使用され得る。有用なプロモーターは、ウイルス、又は任意の生物、例えば、原核若しくは真核生物に由来し得る。好適なプロモーターとしては、これらに限定されないが、ＳＶ４０初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス長い末端反復（ＬＴＲ）プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（Ａｄ ＭＬＰ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）プロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター（ＣＭＶ最初期プロモーター領域、ＣＭＶＩＥなどの）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーター、ヒトＵ６核内低分子プロモーター（Ｕ６）、増強されたＵ６プロモーター、及びヒトＨＩプロモーター（ＨＩ）などが挙げられる。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドが本開示で使用され得る。そのようなポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）は、例えば、ＴｒｉＬｉｎｋ ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＧＥ Ｄｈａｒｍａｃｏｎ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒなどから商業的に取得され得る。

【０２００】

ある特定の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９ポリペプチド）は、本開示で使用され得る。有用なＣａｓ９ポリペプチドの詳細な説明は、例えば、Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，２０１５，３３（９）：９８５－９８９及びＤｅｖｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１６，５３９：３８４－３８９に見出され得、その開示は、参照によりその全体で全ての目的のために本明細書に組み込まれる。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９ポリペプチド）は、ｓｇＲＮＡと複合体化されて、Ｃａｓリボ核タンパク質（例えば、Ｃａｓ９リボ核タンパ

ク質）を形成する。ＣａｓヌクレアーゼとｓｇＲＮＡとのモル比は、標的化ＡＡＶベクター及び標的遺伝子座の連続相同組換えを容易にする任意の範囲とすることができる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９ポリペプチドとｓｇＲＮＡとのモル比は、約１：５、１：４、１：３、１：２．５、１：２、又は１：１である。他の実施形態では、Ｃａｓ９ポリペプチドとｓｇＲＮＡとのモル比は、約１：２～約１：３である。ある特定の実施形態では、Ｃａｓ９ポリペプチドとｓｇＲＮＡとのモル比は、約１：２．５である。

【０２０２】

Ｃａｓヌクレアーゼ及びそのバリアント若しくは断片は、Ｃａｓポリペプチド又はそのバリアント若しくは断片、Ｃａｓポリペプチド又はそのバリアント若しくは断片をコードするｍＲＮＡ、Ｃａｓポリペプチド又はそのバリアント若しくは断片をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクター、あるいはＣａｓリボ核タンパク質として、細胞（例えば、対象から単離された細胞、又は対象などのインビボ細胞）に導入され得る。当業者は、外因性ポリヌクレオチド、ポリペプチド、又はリボ核タンパク質を送達する任意の方法が使用され得ることを認識するであろう。そのような方法の非限定的な例としては、電気穿孔、ヌクレオフェクション、トランスフェクション、リポフェクション、形質導入、マイクロインジェクション、エレクトロインジェクション、電気融合、ナノ粒子衝撃、形質転換、コンジュゲーションなどが挙げられる。

【０２０３】

一態様では、本開示は、ＣＲＩＳＰＲ構成要素をそれを必要とする対象に送達する手段としてのナノ粒子の使用を提供する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）又はリポソーム、ハイドロゲルナノ粒子、金属有機ナノ粒子、金ナノ粒子、及び磁性ナノ粒子から選択される。例えば、Ｘｕ，Ｃ．Ｆ．，ｅｔ ａｌ．（２０２１）．Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ，１６８，３－２９を参照されたく、またＢｕｓｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（２０２１）．Ｖａｃｃｉｎｅｓ ９：６５、Ｋｅｎｊｏ，Ｅ．，ｅｔ ａｌ．（２０２１）．Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，１２（１），７１０１を参照されたい。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ構成要素は、ナノ粒子によって送達される。いかなる特定の理論によっても束縛されることを望むものではないが、ある特定の実施形態では、核酸は、ナノ粒子中に存在するとき、ヌクレアーゼによる分解に対して水溶液中で耐性がある。核酸を含む脂質ナノ粒子及びその調製方法は、少なくともＷＯ２０１７／０１９９３５、ＷＯ２０１７／０４９０７４、ＷＯ２０１７／２０１３４６、ＷＯ２０１７／２１８７０４、ＷＯ２０１８／００６０５２、ＷＯ２０１８／０１３５２５、ＷＯ２０１８／０８９５４０、ＷＯ２０１８／１１９１１５、ＷＯ２０１８／１２６０８４、ＷＯ２０１８／１５７００９、ＷＯ２０１８／１７０３３６、ＷＯ２０１８／２２２８９０、ＷＯ２０１９／０４６８０９、ＷＯ２０１９／０８９８２８、ＷＯ２０２０／０６１２８４、ＷＯ２０２０／０６１３１７、ＷＯ２０２０／０８１９３８、ＷＯ２０２０／０９７５１１、ＷＯ２０２０／０９７５２０、ＷＯ２０２０／０９７５４０、ＷＯ２０２０／０９７５４８、ＷＯ２０２０／２１４９４６、ＷＯ２０２０／２１９９４１、ＷＯ２０２０／２３２２７６、ＷＯ２０２０／２２７６１５、ＷＯ２０２０／０６１２９５、ＷＯ２０２１／００７２７８、ＷＯ２０２１／０１６４３０、ＷＯ２０２１／０２１９８８、欧州特許第２９７２３６０号、ＵＳ２０２０／０１５５６９１、ＵＳ２０２０／０２３７６７１、米国特許第８，０５８，０６９号、同第８，４９２，３５９号、同第８，８２２，６６８号、同第９，３６４，４３５号、同第９，４０４，１２７号、同第９，５０４，６５１号、同第９，５９３，０７７号、同第９，７３８，５９３号、同第９，８６８，６９１号、同第９，８６８，６９２号、同第９，９５０，０６８号、同第１０，１３８，２１３号、同第１０，１６６，２９８号、同第１０，２２１，１２７号、同第１０，２３８，７５４号、同第１０，２６６，４８５号、同第１０，３８３，９５２号、同第１０，７３０，９２４号、同第１０，７６６，８５２号、同第１１，１４１，３７８号、及び同第１１，２４６，９３３号に開示されており、それらは、全ての目的のためにそれらの全体が参

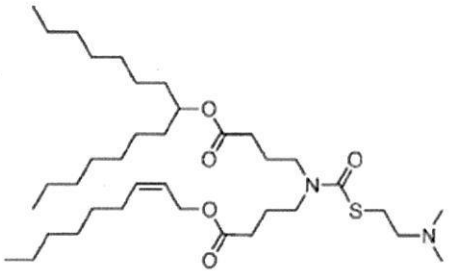
照により本明細書に組み込まれる。
【０２０５】
脂質ナノ粒子組成物
いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の最大寸法は、例えば、動的光散乱（ＤＬＳ）、透過型電子顕微鏡法、走査電子顕微鏡法、又は別の方法によって測定された場合、１マイクロメートル以下（例えば、１マイクロメートル、９００ｎｍ、８００ｎｍ、７００ｎｍ、６００ｎｍ、５００ｎｍ、４００ｎｍ、３００ｎｍ、２００ｎｍ、１７５ｎｍ、１５０ｎｍ、１２５ｎｍ、１００ｎｍ、７５ｎｍ、５０ｎｍ、又はそれ未満）である。ナノ粒子組成物は、例えば、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、リポソーム、脂質小胞、及びリポプレックスを含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物は、１つ以上の脂質二重層を含む小胞である。ある特定の実施形態では、ナノ粒子組成物は、水性区画によって分離された２つ以上の同心円二重層を含む。脂質二重層は、互いに官能化及び／又は架橋されてもよい。脂質二重層は、１つ以上のリガンド、タンパク質、又はチャネルを含んでもよい。
【０２０６】
様々な実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子は、約３０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約５０ｎｍ～約１５０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１３０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１１０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１００ｎｍ、約８０ｎｍ～約１００ｎｍ、約９０ｎｍ～約１００ｎｍ、約７０ｎｍ～約９０ｎｍ、約８０ｎｍ～約９０ｎｍ、約７０ｎｍ～約８０ｎｍ、又は約３０ｎｍ、３５ｎｍ、４０ｎｍ、４５ｎｍ、５０ｎｍ、５５ｎｍ、６０ｎｍ、６５ｎｍ、７０ｎｍ、７５ｎｍ、８０ｎｍ、８５ｎｍ、９０ｎｍ、９５ｎｍ、１００ｎｍ、１０５ｎｍ、１１０ｎｍ、１１５ｎｍ、１２０ｎｍ、１２５ｎｍ、１３０ｎｍ、１３５ｎｍ、１４０ｎｍ、１４５ｎｍ、若しくは１５０ｎｍの平均直径を有し、実質的に非毒性である。
【０２０７】
ある特定の実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子は、脂質構成成分、及び（任意選択で）構造的構成成分を含む、１つ以上の構成成分を含む。脂質成分は、イオン性脂質及び／又はカチオン性脂質（すなわち、生理学的ｐＨで正又は部分的正電荷を有し得る脂質）、中性脂質（例えば、リン脂質、又はスフィンゴ脂質）、及びポリマーコンジュゲート脂質（例えば、ＰＥＧ化脂質）から選択される脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質構成成分は、単一のイオン性脂質を含む。他の実施形態では、脂質構成成分は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、又は２０個のイオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質構成成分は、単一の中性脂質を含む。他の実施形態では、脂質構成成分は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、又は２０個の中性脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質構成成分は、単一のポリマーコンジュゲート脂質を含む。他の実施形態では、脂質構成成分は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、又は２０個のポリマーコンジュゲート脂質を含む。いくつかの実施形態では、構造的構成成分は、単一の構造脂質を含む。他の実施形態では、構造的構成成分は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、又は２０個の構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、脂質構成成分は、少なくとも１つのカチオン性脂質、少なくとも１つの中性脂質、及び少なくとも１つのポリマーコンジュゲート脂質を含む。本開示は、脂質構成成分が前述の成分の任意の組み合わせを含み得ることを企図する。
【０２０８】
イオン性／カチオン性脂質
いくつかの実施形態では、脂質構成成分は、イオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、イオン性脂質は、アニオン性である。他の実施形態では、イオン性脂質は、カチオン性脂質である。いくつかの実施形態では、脂質構成成分は、これらに限定されないが、３－（ジドデシルアミノ）－Ｎ１，Ｎ１，４－トリドデシル－１－ピペラジンエタンアミン（ＫＬ１０）、Ｎ１－［２－（ジドデシルアミノ）エチル］－Ｎ１，Ｎ４，Ｎ４－トリドデシル－１，４－ピペラジンジエタンアミン（ＫＬ２２）、１４，２５－ジトリデシル－１５，１８，２１，２４－テトラアザ－オクタトリアコンタン（ＫＬ２５）、１，２－

ジリノレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎ－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノメチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ）、ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ）、２，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）、１，２－ジオレイルオキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＯＤＭＡ）、２－（｛８－［（３．ベータ．）－コレスト－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ，１２Ｚ）－－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ）、（２Ｒ）－２－（｛８－［（３．ベータ．）－コレスト－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ－，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｒ））、（２Ｓ）－２－（｛８－［（３．ベータ）－コレスト－５－エン－３－イルオキシ］オクチル｝オキシ）－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－［（９Ｚ－，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン－１－イルオキシ］プロパン－１－アミン（オクチル－ＣＬｉｎＤＭＡ（２Ｓ））、環状アミン基を含む脂質、及びそれらの混合物からなる群から選択されるカチオン性脂質を含む、カチオン性脂質を含む。

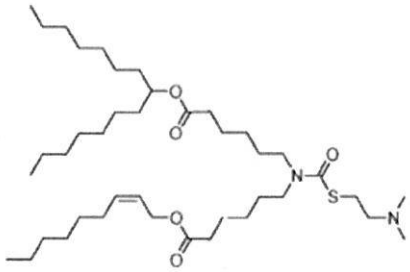
【０２０９】

カチオン性脂質の非網羅的及び非限定的な例としては、以下が挙げられる。

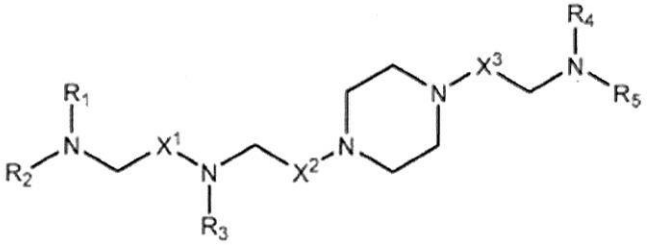
【化１－１】

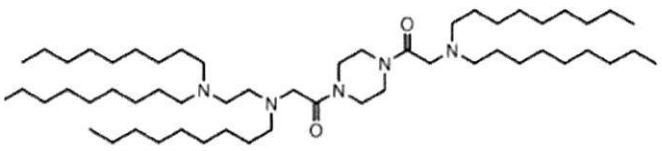


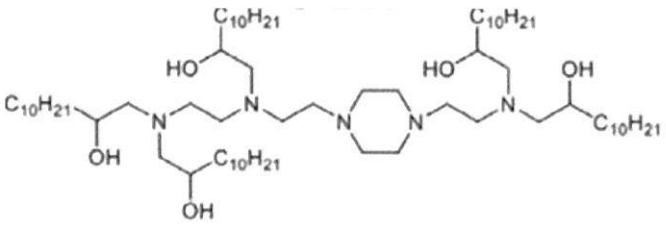
ATX-0081



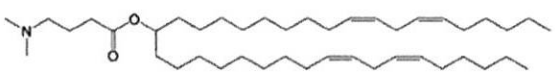
ATX-0095



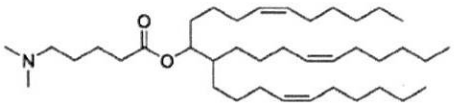


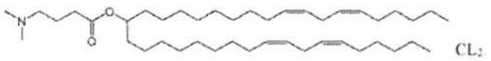


【化１－２】

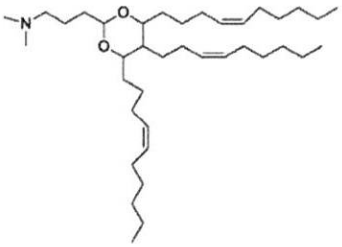


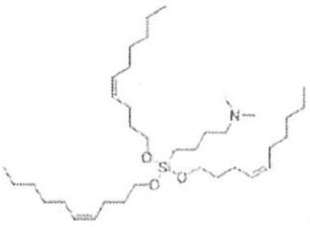
MC3



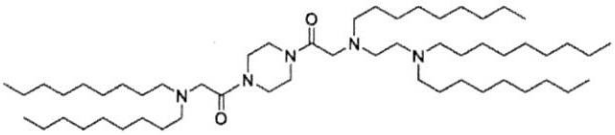


Genevant CL_1

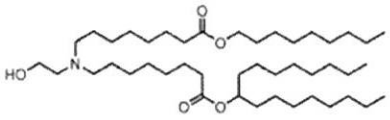




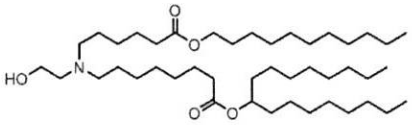
CL_3



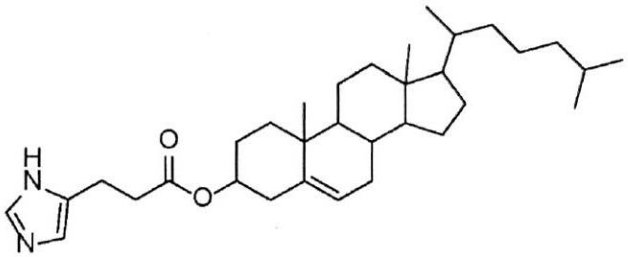
化合物（A）



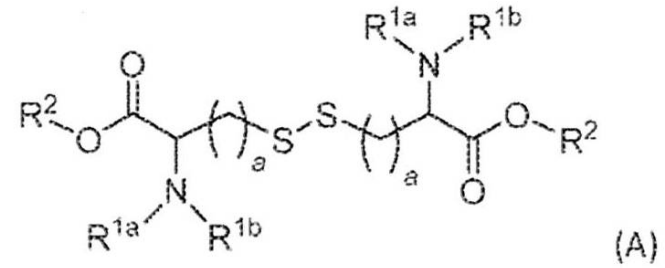
Ｍｏｄｅｒｎａ　脂質５



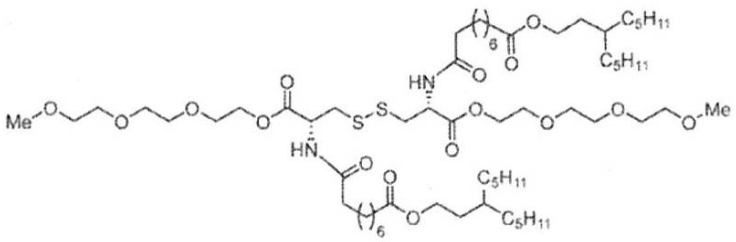
Ｍｏｄｅｒｎａ　脂質Ｈ

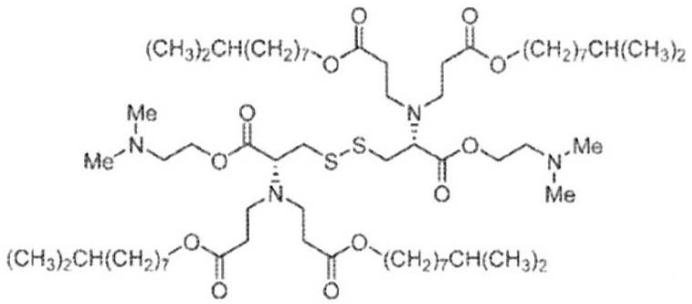


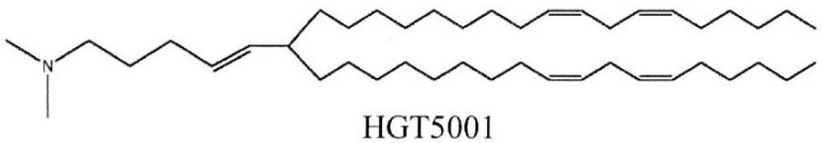
【化１－３】



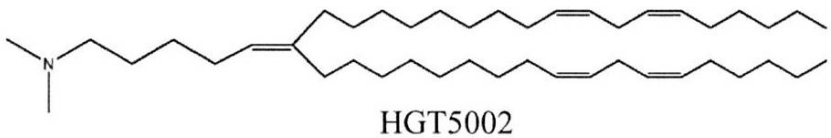
(A)





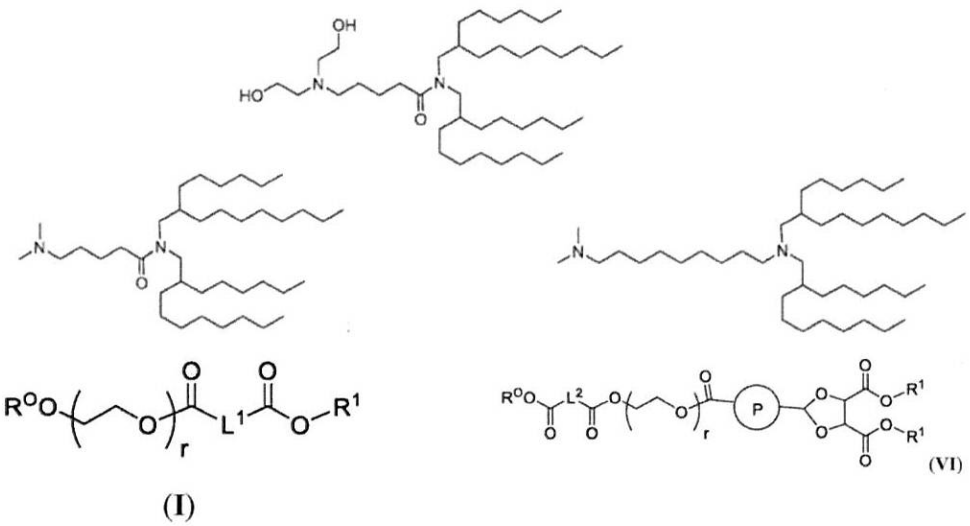


HGT5001

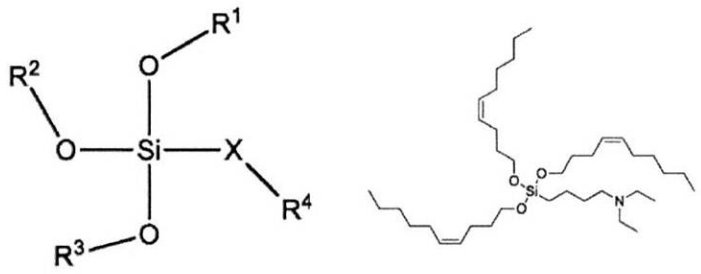


HGT5002

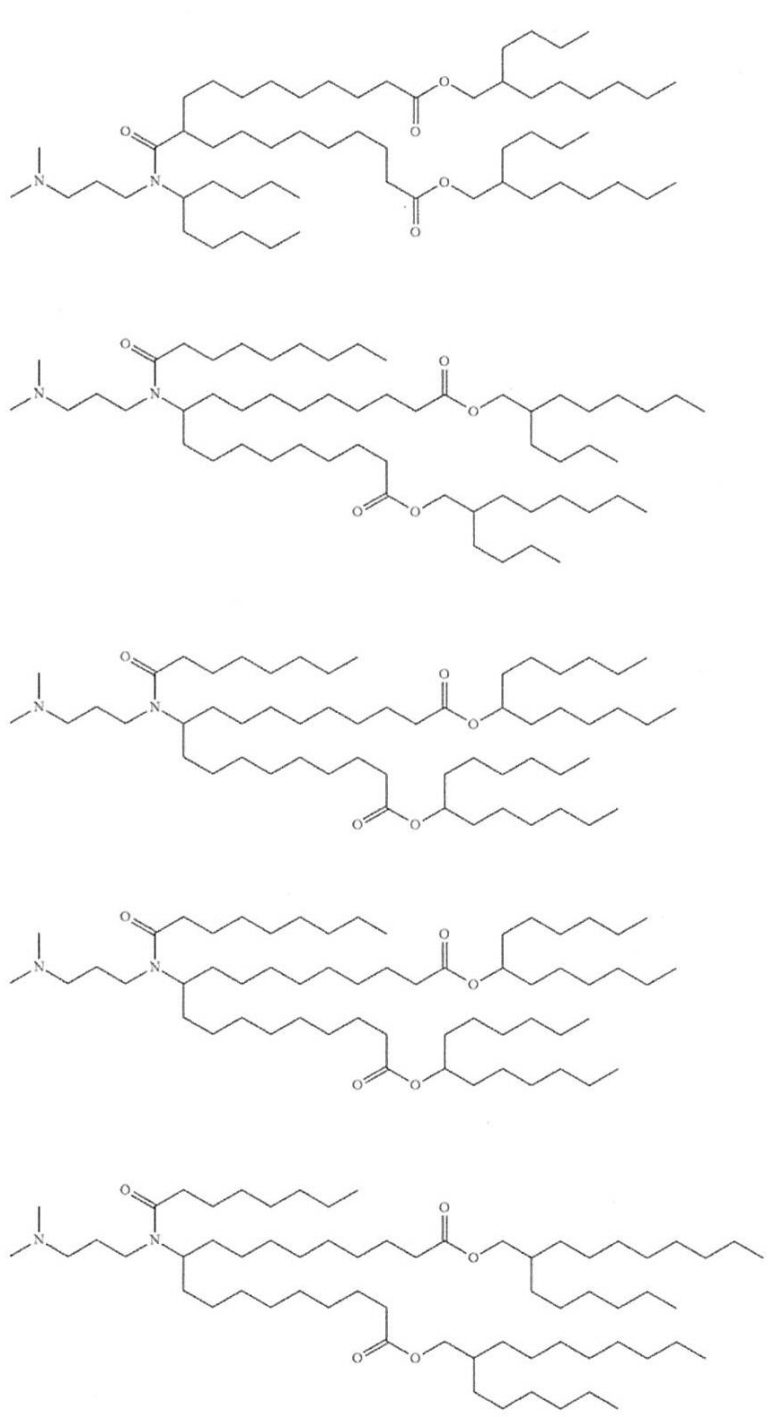
【化１－４】



(I)



【化１－５】



【０２１０】

中性脂質／リン脂質

いくつかの実施形態では、脂質構成成分は、これらに限定されないが、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＬＰＣ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＰＰＣ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、１，２－ジウンデカノイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホコリン（ＤＵＰＣ）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＰＯＰＣ）、１

，２－ジ－Ｏ－オクタデセニル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（１８：０のジエーテルＰＣ）、１－オレオイル－２－コレステリルヘミスクシノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＯＣｈｅｍｓＰＣ）、１－ヘキサデシル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（Ｃ１６　Ｌｙｓｏ　ＰＣ）、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＭＥ　１６．０　ＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジリノレノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジドコサヘキサエノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホ－ｒａｃ－（１－グリセロール）ナトリウム塩（ＤＯＰＧ）、スフィンゴミエリン（ＳＭ）、及びそれらの混合物を含む中性脂質を更に含む。

【０２１１】

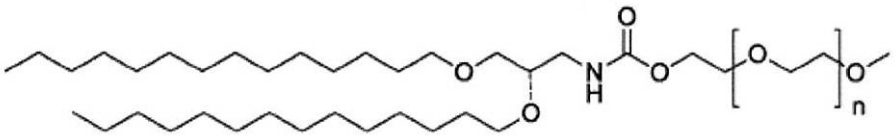
ポリマーコンジュゲート脂質

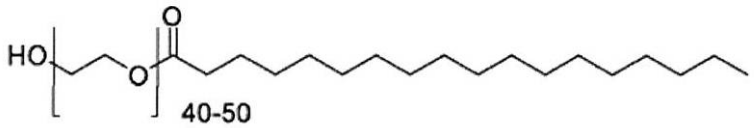
いくつかの実施形態では、脂質構成成分は、これらに限定されないが、ＰＥＧ修飾ホスファチジルエタノールアミン、ＰＥＧ修飾ホスファチジン酸、ＰＥＧ修飾セラミド、ＰＥＧ修飾ジアルキルアミン、ＰＥＧ修飾ジアシルグリセロール、ＰＥＧ修飾ジアルキルグリセロール、及びそれらの混合物からなる群から選択されるＰＥＧ化脂質を含む、ポリマーコンジュゲート脂質を更に含む。例えば、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ＤＬＰＥ、ＰＥＧ－ＤＭＰＥ、ＰＥＧ－ＤＰＰＣ、ＰＥＧ－ＤＭＡ、又はＰＥＧ－ＤＳＰＥ脂質であってもよい。

【０２１２】

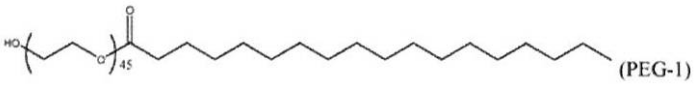
ＰＥＧ脂質の非網羅的及び非限定的な例としては、以下が挙げられる。

【化２－１】

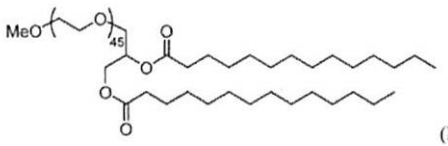




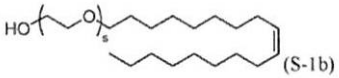
ステアリン酸ＰＥＧ（化合物（Ｉ））



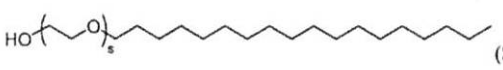
(PEG-1)



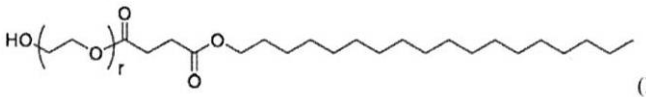
(PEG-2)



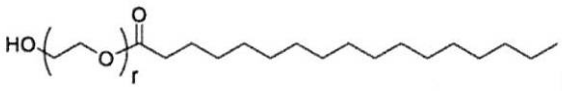
(S-1b)



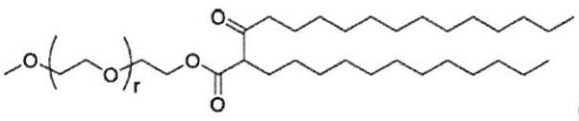
(S-1a)



(L1)

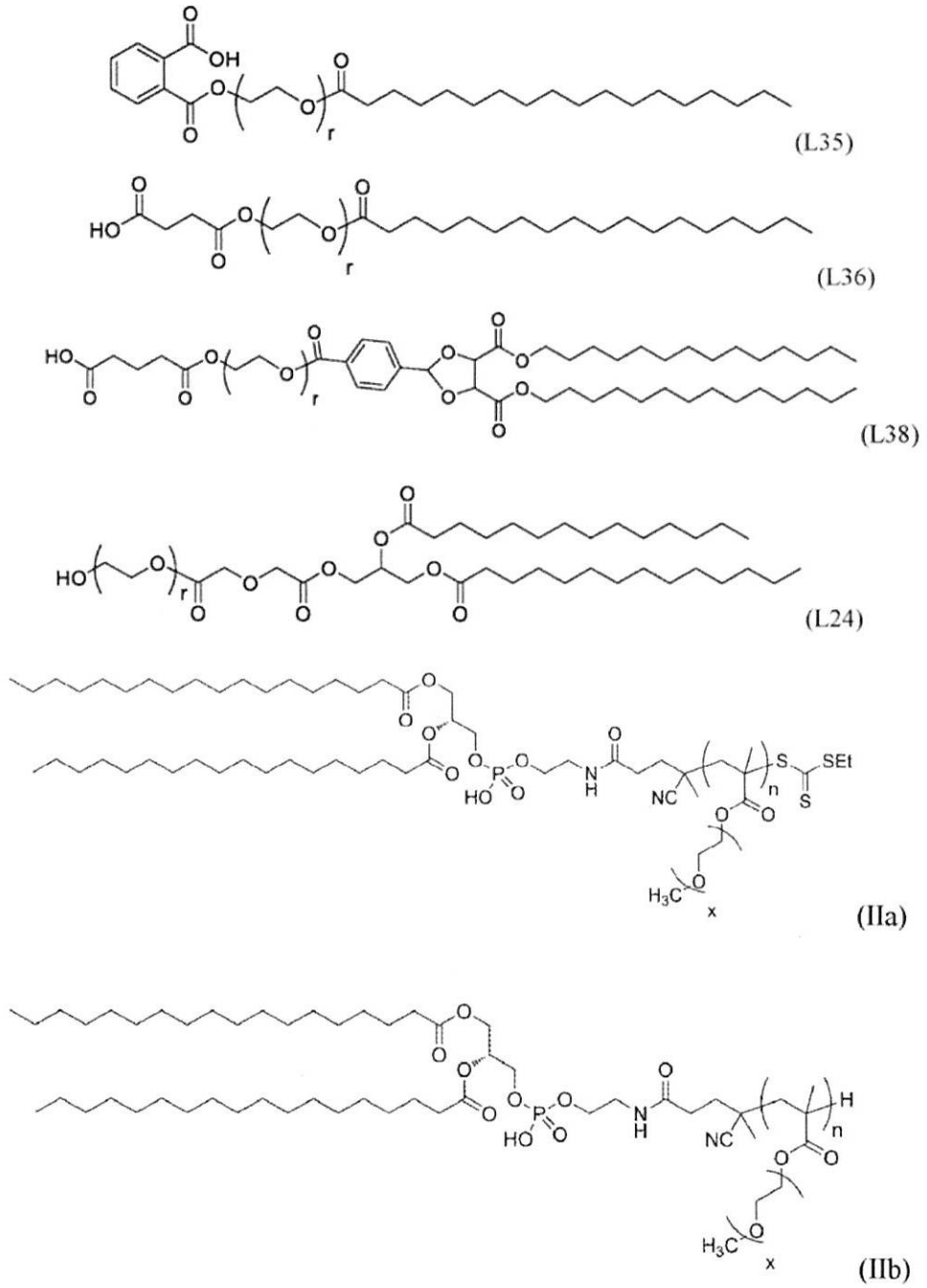


(L16)



(L20)

【化２－２】



【０２１３】

構造脂質／ステロール

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、構造的構成成分を更に含む。概して、Ｐａｔｅｌ，Ｓ．，ｅｔ　ａｌ．（２０２０）．Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，１１（１），１－１３を参照されたい。いくつかの実施形態では、構造的構成成分は、これらに限定されないが、コレステロール、フェコステロール、スチグマステロール、スチグマスタノール、シトステロール、β－シトステロール、ルペオール、ベツリン、ウルソール酸、オレアノール酸、カンペステロール、フコステロール、ブラシカステロール、エルゴステロール、９，１１－デヒドロエルゴステロール、トマチジン、トマチン、α－トコフェロール、及びそれらの混合物からなる群から選択されるステロールを含む、ステロールを含む。他の実施形態では、構造脂質は、コレステロール及びコルチコステロイド（例

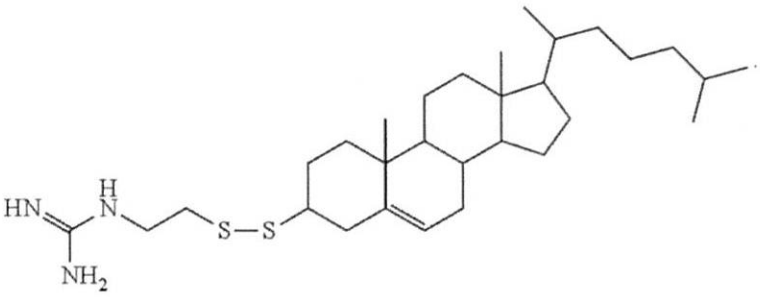
えば、プレドニゾロン、デキサメタゾン、プレドニゾン、及びヒドロコルチゾン）、又はそれらの組み合わせを含む。

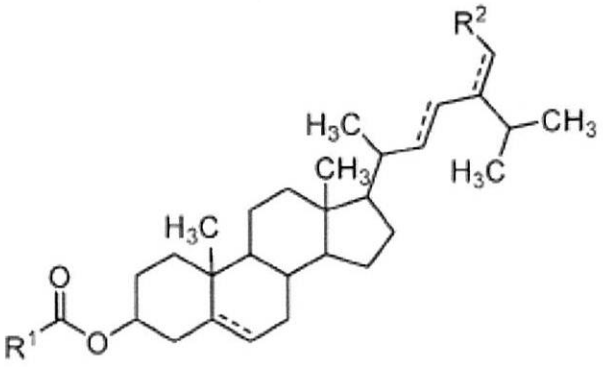
【０２１４】

構造的脂質の非網羅的及び非限定的な例としては、以下が挙げられる。

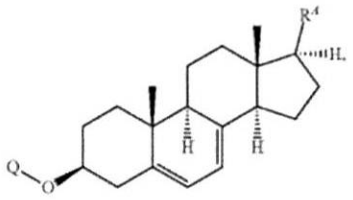
【化３】

(HGT4002)

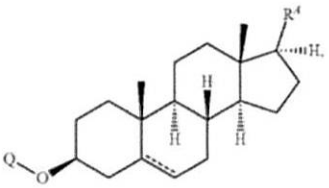


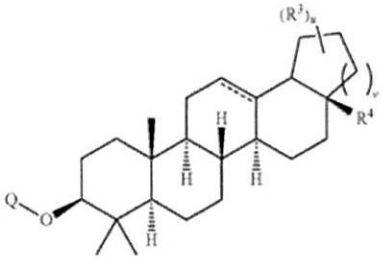


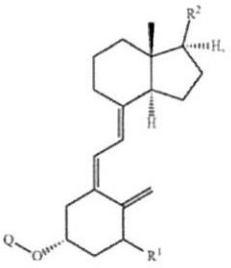
(A2)



(A1)







【０２１５】

製剤

ナノ粒子組成物は、脂質構成成分、並びに治療薬及び／又は予防薬などの１つ以上の追加の構成成分を含み得る。ナノ粒子組成物は、１つ以上の特定の用途又は標的のために設計され得る。ナノ粒子組成物の要素は、特定の用途又は標的に基づいて、及び／又は１つ以上の要素の有効性、毒性、費用、使用の容易さ、可用性、若しくは他の特徴に基づいて選択され得る。同様に、ナノ粒子組成物の特定の製剤は、例えば、特定の要素の組み合わ

せの有効性及び毒性に従って、特定の用途又は標的のために選択され得る。

【０２１６】

ナノ粒子組成物の脂質構成成分は、例えば、カチオン性脂質、リン脂質（不飽和脂質、例えば、ＤＯＰＥ又はＤＳＰＣなど）、ＰＥＧ脂質、及び構造脂質を含み得る。脂質構成成分の要素は、特定の画分で提供されてもよい。

【０２１７】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の脂質構成成分は、イオン性脂質、リン脂質、ＰＥＧ脂質、及び構造脂質を含む。ある特定の実施形態では、ナノ粒子組成物の脂質構成成分は、総ｍｏｌ％が１００％を超えないことを条件として、約３０ｍｏｌ％～約６０ｍｏｌ％のイオン性脂質、約０ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％のリン脂質、約０ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質、及び約１７．５ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％の構造脂質を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の脂質構成成分は、約３５ｍｏｌ％～約５５ｍｏｌ％のイオン性脂質の化合物、約５ｍｏｌ％～約２５ｍｏｌ％のリン脂質、約０ｍｏｌ％～約１０ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質、及び約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％の構造脂質を含む。特定の実施形態では、脂質構成成分は、約５０ｍｏｌ％の当該化合物、約１０ｍｏｌ％のリン脂質、約３８．５ｍｏｌ％の構造脂質、及び約１．５ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質を含む。別の実施形態では、脂質構成成分は、約４０ｍｏｌ％の当該化合物、約２０ｍｏｌ％のリン脂質、約３８．５ｍｏｌ％の構造脂質、及び約１．５ｍｏｌ％のＰＥＧ脂質を含む。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ＤＯＰＥ又はＤＳＰＣであってもよい。他の実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧであってもよく、かつ／又は構造脂質は、コレステロールであってもよい。

【０２１８】

いくつかの実施形態では、イオン性脂質は、約２０～約６０ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。他の実施形態では、イオン性脂質は、約３５～約５５ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。様々な実施形態では、イオン性脂質は、約２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、又は６０ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。

【０２１９】

いくつかの実施形態では、中性脂質は、約０～約３０ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。他の実施形態では、中性脂質は、約５～約２５ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。様々な実施形態では、中性脂質は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、又は３０ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。

【０２２０】

いくつかの実施形態では、ポリマーコンジュゲート脂質は、約０～約１５ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。他の実施形態では、ポリマーコンジュゲート脂質は、約０．５～約１０ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。様々な実施形態では、ポリマーコンジュゲート脂質は、約０．５、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９．５、１０、又は１５ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。

【０２２１】

いくつかの実施形態では、構造的構成成分は、約１７．５ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。他の実施形態では、構造的構成成分は、約３０ｍｏｌ％～約４０ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。様々な実施形態では、構造的構成成分は、約１７．５、２０、２２．５、２５、２７．５、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、又は５０ｍｏｌ％の脂質構成成分を含む。

【０２２２】

代替的に、構造的構成成分は、脂質構成成分に対する比として表され得る。いくつかの実施形態では、構造的構成成分は、脂質構成成分（ステロール：脂質）と約１：１の比率である。他の実施形態では、構造的構成成分は、脂質構成成分（ステロール：脂質）と約

１：５の比率である。様々な実施形態では、構造的構成成分は、脂質構成成分（ステロール：脂質）と約１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１５、１：２０、又は１：２５の比率である。

【０２２３】

ナノ粒子組成物は、１つ以上の特定の用途又は標的のために設計され得る。例えば、ナノ粒子組成物は、哺乳動物の体内の特定の細胞、組織、器官、若しくは系又はその群にＲＮＡなどの治療薬及び／又は予防薬を送達するように設計され得る。ナノ粒子組成物の生理化学的特性は、特定の身体標的に対する選択性を増加させるために変更され得る。例えば、粒子サイズは、異なる器官の開窓サイズに基づいて調整され得る。ナノ粒子組成物に含まれる治療薬及び／又は予防薬はまた、所望の送達標的に基づいて選択され得る。例えば、治療薬及び／又は予防薬は、特定の適応症、状態、疾患、若しくは障害に対して、及び／又は特定の細胞、組織、器官、若しくは系又はそれらの群への送達（例えば、局所的又は特異的送達）に対して選択され得る。ある特定の実施形態では、ナノ粒子組成物は、細胞内で翻訳されて、目的のポリペプチドを産生することができる目的のポリペプチドをコードするｍＲＮＡを含み得る。こうした組成物は、特定の器官に特異的に送達されるように設計され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、哺乳類関節に特異的に送達されるように設計され得る。

【０２２４】

ナノ粒子組成物中の治療薬及び／又は予防薬の量は、ナノ粒子組成物のサイズ、組成物、所望の標的及び／若しくは用途、又は他の特性、並びに治療薬及び／又は予防薬の特性に依存し得る。例えば、ナノ粒子組成物に有用なＲＮＡの量は、ＲＮＡのサイズ、配列、及び他の特徴に依存し得る。ナノ粒子組成物中の治療薬及び／又は予防薬並びに他の要素（例えば、脂質）の相対量もまた変化し得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物中の脂質構成成分対治療薬及び／又は予防薬の重量／重量比は、約５：１～約６０：１、例えば、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、２５：１、３０：１、３５：１、４０：１、４５：１、５０：１、及び６０：１であってもよい。例えば、脂質構成成分対治療薬及び／又は予防薬の重量／重量比は、約１０：１～約４０：１であってもよい。ある特定の実施形態では、重量／重量比は、約２０：１である。ナノ粒子組成物中の治療薬及び／又は予防薬の量は、例えば、吸収分光法（例えば、紫外線可視分光法）を使用して測定され得る。

【０２２５】

いくつかの実施形態では、治療薬及び／又は予防薬は、核酸構成成分を含む。いくつかの実施形態では、核酸構成要素は、これらに限定されないが、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）、ｔｒａｃｒＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）、短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、及びそれらの混合物からなる群から選択されるＲＮＡを含む、ＲＮＡを含む。他の実施形態では、核酸構成要素は、これらに限定されないが、直鎖ＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びそれらの混合物からなる群から選択されるＤＮＡを含む、ＤＮＡを含む。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物は、１つ以上のＲＮＡを含み、１つ以上のＲＮＡ、脂質、及びその量は、特定のＮ：Ｐ比を提供するように選択され得る。組成物のＮ：Ｐ比は、１つ以上の脂質中の窒素原子対ＲＮＡ中のリン酸基の数のモル比を指す。一般に、より低いＮ：Ｐ比が好ましい。１つ以上のＲＮＡ、脂質、及びその量は、約２：１～約３０：１、例えば、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１２：１、１４：１、１６：１、１８：１、２０：１、２２：１、２４：１、２６：１、２８：１、又は３０：１のＮ：Ｐ比を提供するように選択され得る。ある特定の実施形態では、Ｎ：Ｐ比は、約２：１～約８：１であってもよい。他の実施形態では、Ｎ：Ｐ比は、約５：１～約８：１である。例えば、Ｎ：Ｐ比は、約５．０：１、約５

．５：１、約５．６７：１、約６．０：１、約６．５：１、又は約７．０：１であってもよい。例えば、Ｎ：Ｐ比は、約５．６７：１であってもよい。

【０２２７】

いくつかの実施形態では、核酸構成要素は、修飾核酸からなる。例えば、ＲＮＡは、修飾ＲＮＡであってもよい。すなわち、ＲＮＡは、非天然型である１つ以上の核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、又はリンカーを含み得る。「修飾」種はまた、本明細書では「改変」種と称され得る。種は、化学的、構造的、又は機能的に修飾又は改変されてもよい。例えば、修飾核酸塩基種は、天然型ではない１つ以上の置換を含み得る。

【０２２８】

ある特定の実施形態では、本開示は、関節の疾患又は障害を治療するための方法を含む。他の実施形態では、本開示は、変形性関節炎を治療するための方法を含む。いくつかの実施形態では、本開示は、関節の炎症を治療するための方法を含み、方法は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内に封入された、又は脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と関連付けられた治療有効量のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ組成物を投与することを含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする１つ以上の非天然型ポリヌクレオチド及び少なくとも１つのｓｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、関節内投与される。

【０２２９】

ある特定の実施形態では、本開示は、線維症又は瘢痕を治療するための方法を含む。いくつかの実施形態では、線維症及び／又は瘢痕は、術後及び／又は手術後の線維症及び／又は瘢痕である。いくつかの実施形態では、線維症及び／又は瘢痕は、靭帯再建後である。いくつかの実施形態では、線維症及び／又は瘢痕は、前十字靭帯（ＡＣＬ）再建後である。いくつかの実施形態では、線維症及び／又は瘢痕は、自家移植前十字靭帯（ＡＣＬ）再建後である。いくつかの実施形態では、線維症及び／又は瘢痕は、同種移植前十字靭帯（ＡＣＬ）再建後である。いくつかの実施形態では、線維症及び／又は瘢痕は、膝の関節線維症に起因する。いくつかの実施形態では、線維症及び／又は瘢痕は、関節内線維性結節に起因する。いくつかの実施形態では、線維症及び／又は瘢痕は、人工膝関節置換術（ＴＫＡ）後である。いくつかの実施形態では、線維症及び／又は瘢痕は、ＴＫＡ後の膝の関節線維症に起因する。いくつかの実施形態では、線維症及び／又は瘢痕は、椎間板切除術後である。いくつかの実施形態では、線維症及び／又は瘢痕は、椎間板切除術後の硬膜外線維症に起因する。いくつかの実施形態では、本開示は、線維症又は瘢痕を治療するための方法を含み、方法は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内に封入された、又は脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と関連付けられた治療有効量のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ組成物を投与することを含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質及び少なくとも１つのｓｇＲＮＡをコードする１つ以上の非天然型ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、局所投与される。他の実施形態では、ＬＮＰは、関節内投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、手術中及び／又は手術後に投与される。

【０２３０】

ある特定の実施形態では、本開示は、腰痛を治療するための方法を含む。他の実施形態では、本開示は、発病性障害を治療するための方法を含む。いくつかの実施形態では、本開示は、局所侵害受容、炎症、又は背部若しくは脊椎の状態若しくは障害に関連する形態学的変化の治療を必要とする対象においてそれを行う方法を含み、方法は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内に封入された、又は脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と関連付けられた治療有効量のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ組成物を投与することを含み、組成物は、Ｃａｓタンパク質及び少なくとも１つのｓｇＲＮＡをコードする１つ以上の非天然型ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、くも膜下腔内に投与される。他の実施形態では、ＬＮＰは、硬膜外投与される。

【０２３１】

本明細書で使用される場合、「脂質構成成分」は、１つ以上の脂質を含むナノ粒子組成物の構成成分である。例えば、脂質構成成分は、１つ以上のカチオン性／イオン性、ＰＥＧ化、構造、又はリン脂質などの他の脂質を含み得る。

【０２３２】
本明細書で使用される場合、「送達」という用語は、実体を目的地に提供することを意味する。例えば、治療薬及び／又は予防薬を対象に送達することは、治療薬及び／又は予防薬を含むナノ粒子組成物を対象に（例えば、静脈内、筋肉内、皮内、皮下、関節内、又は椎間板内経路によって）投与することを伴い得る。哺乳類又は哺乳類細胞へのナノ粒子組成物の投与は、１つ以上の細胞をナノ粒子組成物と接触させることを伴い得る。
【０２３３】
本明細書で使用される場合、「天然型」とは、人工的な補助なしで自然界に存在することを意味する。
【０２３４】
本明細書で使用される場合、「ＰＥＧ脂質」又は「ＰＥＧ化脂質」は、ポリエチレングリコール構成成分を含む脂質を指す。これらの脂質は、ＰＥＧ修飾脂質とも称され得る。
【０２３５】
本明細書で使用される場合、「リン脂質」は、リン酸部分と、不飽和脂肪酸鎖などの１つ以上の炭素鎖とを含む脂質である。リン脂質は、１つ以上の複数の（例えば、二重又は三重）結合（例えば、１つ以上の不飽和）を含み得る。特定のリン脂質は、膜への融合を促進し得る。例えば、カチオン性リン脂質は、膜（例えば、細胞膜又は細胞内膜）の１つ以上の負に荷電したリン脂質と相互作用し得る。リン脂質の膜への融合は、脂質含有組成物の１つ以上の要素が膜を通過することを可能にし、例えば、１つ以上の要素の細胞への送達を可能にし得る。
【０２３６】
物理的性質
ナノ粒子組成物の特性は、その構成成分に依存し得る。例えば、構造脂質としてコレステロールを含むナノ粒子組成物は、異なる構造脂質を含むナノ粒子組成物とは異なる特性を有し得る。同様に、ナノ粒子組成物の特性は、その構成成分の絶対量又は相対量に依存し得る。例えば、リン脂質のものより高いモル画分を含むナノ粒子組成物は、リン脂質のものより低いモル画分を含むナノ粒子組成物とは異なる特性を有し得る。特徴はまた、ナノ粒子組成物の調製の方法及び条件に応じて変化し得る。
【０２３７】
ナノ粒子組成物は、様々な方法によって特徴付けられ得る。例えば、顕微鏡（例えば、透過型電子顕微鏡法又は走査電子顕微鏡法）を使用して、ナノ粒子組成物の形態学及びサイズ分布を調べてもよい。動的光散乱又は電位差測定（例えば、電位差測定滴定）を使用して、ゼータ電位を測定してもよい。動的光散乱を利用して、粒子サイズを決定してもよい。Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｌｔｄ、Ｍａｌｖｅｒｎ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）などの機器も、粒子サイズ、多分散度指数、及びゼータ電位などのナノ粒子組成物の複数の特性を測定するために使用され得る。
【０２３８】
ナノ粒子組成物の平均サイズは、１０ｎｍ～１マイクロメートルであり得、例えば、動的光散乱（ＤＬＳ）によって測定される。例えば、平均サイズは、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍ、例えば、約４０ｎｍ、４５ｎｍ、５０ｎｍ、５５ｎｍ、６０ｎｍ、６５ｎｍ、７０ｎｍ、７５ｎｍ、８０ｎｍ、８５ｎｍ、９０ｎｍ、９５ｎｍ、１００ｎｍ、１０５ｎｍ、１１０ｎｍ、１１５ｎｍ、１２０ｎｍ、１２５ｎｍ、１３０ｎｍ、１３５ｎｍ、１４０ｎｍ、１４５ｎｍ、又は１５０ｎｍであり得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の平均サイズは、約５０ｎｍ～約１００ｎｍ、約５０ｎｍ～約９０ｎｍ、約５０ｎｍ～約８０ｎｍ、約５０ｎｍ～約７０ｎｍ、約５０ｎｍ～約６０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１００ｎｍ、約６０ｎｍ～約９０ｎｍ、約６０ｎｍ～約８０ｎｍ、約６０ｎｍ～約７０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１００ｎｍ、約７０ｎｍ～約９０ｎｍ、約７０ｎｍ～約８０ｎｍ、約８０ｎｍ～約１００ｎｍ、約８０ｎｍ～約９０ｎｍ、又は約９０ｎｍ～約１００ｎｍであり得る。ある特定の実施形態では、ナノ粒子組成物の平均サイズは、約７０ｎｍ～約１００ｎｍで

あり得る。特定の実施形態では、平均サイズは、約８０ｎｍであり得る。他の実施形態では、平均サイズは、約１００ｎｍであり得る。

【０２３９】

ナノ粒子組成物は、比較的均質であり得る。多分散度指数を使用して、ナノ粒子組成物の均質性、例えば、ナノ粒子組成物の粒子サイズ分布を示してもよい。小さな（例えば、０．３未満）多分散指数は、概して、狭い粒子サイズ分布を示す。ナノ粒子組成物は、約０～約０．２５、例えば、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１０、０．１１、０．１２、０．１３、０．１４、０．１５、０．１６、０．１７、０．１８、０．１９、０．２０、０．２１、０．２２、０．２３、０．２４、又は０．２５の多分散度指数を有し得る。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物の多分散度指数は、約０．１０～約０．２０であってもよい。

【０２４０】

ナノ粒子組成物のゼータ電位は、組成物の電気動力学電位を示すために使用され得る。例えば、ゼータ電位は、ナノ粒子組成物の表面電荷を説明し得る。比較的低い電荷、正又は負のナノ粒子組成物は、より高電荷の種が望ましくないことに体内の細胞、組織、及び他の要素と相互作用し得るため、一般的に望ましい。いくつかの実施形態では、ナノ粒子組成物のゼータ電位は、約－１０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約－５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－５ｍＶ～約０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約＋５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、又は約＋５ｍＶ～約＋１０ｍＶであり得る。

【０２４１】

治療薬及び／又は予防薬の封入の効率は、提供される初期量に対する、調製後にナノ粒子組成物に封入されるか、又はそうでなければナノ粒子組成物に関連付けられる治療薬及び／又は予防薬の量を記載する。封入効率は高いことが望ましい（例えば、１００％に近い）。封入効率は、例えば、ナノ粒子組成物を分解する前後のナノ粒子組成物を含む溶液中の治療薬及び／又は予防薬の量と、１つ以上の有機溶媒又は洗浄剤とを比較することによって測定され得る。蛍光を使用して、溶液中の遊離治療薬及び／又は予防薬（例えば、ＲＮＡ）の量を測定し得る。本明細書に記載のナノ粒子組成物について、治療薬及び／又は予防薬の封入効率は、少なくとも５０％、例えば、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％であり得る。いくつかの実施形態では、封入効率は、少なくとも８０％であってもよい。ある特定の実施形態では、封入効率は、少なくとも９０％であってもよい。

【０２４２】

ナノ粒子組成物は、任意選択で、１つ以上のコーティングを含んでもよい。例えば、ナノ粒子組成物は、コーティングを有するカプセル、フィルム、又は錠剤で製剤化されてもよい。本明細書に記載の組成物を含むカプセル、フィルム、又は錠剤は、任意の有用なサイズ、引張強さ、硬度、又は密度を有してもよい。

【０２４３】

ＣＲＩＳＰＲ法を介して滑膜細胞を恒久的に遺伝子編集することによってサイレンシング又は阻害され得る遺伝子の非限定的な例としては、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、及びＴＮＦ－αが挙げられる。

【０２４４】

ＣＲＩＳＰＲ法を介して滑膜細胞を恒久的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例としては、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、及びＴＮＦ－αが挙げられる。

【０２４５】

ＣＲＩＳＰＲ法によって標的遺伝子配列の発現を改変するための、及び本開示の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，６９７，３５９号、同第８，９９３，２３３号、同第８，７９５，９６５号、同第８，７７１，９４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８６５，４０６号、同第８，９９９，６４１号、同第８，９４５，８３９号、同第８，９３２，８１４号、同第８，８７１，４４５号、同第８，９０６，６１６号、及び同第８，８９５，３０８号に説明されており、これらは、参照によって本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなどの、ＣＲＩＳＰＲ法を実施するためのリソースは、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【０２４６】

一実施形態では、本明細書に説明される関節の滑膜細胞の少なくとも一部分の遺伝子修飾は、米国特許第９，７９０，４９０号に説明されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃｐｆ１システムを使用して実施され得、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

一実施形態では、本明細書に説明される関節の滑膜細胞の少なくとも一部分の遺伝子修飾は、米国特許第９，９０７，８６３号に説明される単一ベクターシステムを含むＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを使用して実施され得、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。ＴＡＬＥ法

【０２４７】

遺伝子編集システムを含む関節の疾患又は状態の治療又は予防のための医薬組成物であって、遺伝子編集システムが、関節機能に関連する少なくとも１つの遺伝子座を標的とし、方法が、ＴＡＬＥ法によって関節滑膜細胞の少なくとも一部分を遺伝子編集することを更に含む。特定の実施形態によると、関節機能に関連する少なくとも１つの遺伝子座を標的化するためのＴＡＬＥ法の使用であって、関節の滑膜細胞の少なくとも一部分を遺伝子編集する。あるいは、関節機能に関連する少なくとも１つの遺伝子座を標的化する間のＴＡＬＥ法の使用であって、関節の滑膜細胞の少なくとも一部分を遺伝子編集して、関節機能遺伝子に関連する少なくとも１つの遺伝子座の発現を、関節滑膜細胞の少なくとも一部分で増強させる。

【０２４８】

ＴＡＬＥは、ＴＡＬＥＮ（「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ Ｎｕｃｌｅａｓｅｓ）」）を含む、「転写活性化因子様エフェクター（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ）」タンパク質の略である。遺伝子編集のためにＴＡＬＥシステムを使用する方法はまた、本明細書ではＴＡＬＥ法とも称され得る。ＴＡＬＥは、Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属の植物病原性細菌由来の天然型タンパク質であり、各々が単一の塩基対を認識する一連の３３～３５のアミノ酸反復ドメインから構成されるＤＮＡ結合ドメインを含有する。ＴＡＬＥ特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥ反復は、連続ＤＮＡ配列を認識するように一緒に連結される。ＤＮＡ結合ドメイン内の特定のＲＶＤは、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測可能なＤＮＡ結合ドメインをアセンブルする構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、ＩＩＳ型ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合されて、標的化可能なＴＡＬＥヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域によって分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームは、ＦｏｋＩモノマーを近接して、二量体化し、標的二重鎖切断を産生する。

【０２４９】

様々なアセンブリ方法を利用するいくつかの大規模で体系的な研究は、ＴＡＬＥ反復が、事実上、任意のユーザー定義配列を認識するために組み合わせられ得ることを示した。カスタム設計ＴＡＬＥアレイはまた、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ、Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ、ＫＹ、ＵＳＡ）、及びＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉ

ｅｓ（Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ、ＵＳＡ）を通じて市販されている。本開示における使用に好適なＴＡＬＥ及びＴＡＬＥＮ法は、米国特許出願公開第２０１１／０２０１１１８Ａ１号、同第２０１３／０１１７８６９Ａ１号、同第２０１３／０３１５８８４Ａ１号、同第２０１５／０２０３８７１Ａ１号、及び同第２０１６／０１２０９０６Ａ１号に説明され、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２５０】

ＴＡＬＥ法を介して滑膜細胞を恒久的に遺伝子編集することによってサイレンシング又は阻害され得る遺伝子の非限定的な例としては、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、及びＴＮＦ－αが挙げられる。

【０２５１】

ＴＡＬＥ法を介して滑膜細胞を恒久的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例としては、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、及びＴＮＦ－αが挙げられる。

【０２５２】

ＴＡＬＥ法によって標的遺伝子配列の発現を改変するための、及び本開示の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，５８６，５２６号に説明されており、これは、参照によって本明細書に組み込まれる。

【０２５３】

ジンクフィンガー法

遺伝子編集システムを含む関節の疾患又は状態の治療又は予防のための医薬組成物であって、遺伝子編集システムが、関節機能に関連する少なくとも１つの遺伝子座を標的とし、方法が、ジンクフィンガー又はジンクフィンガーヌクレアーゼ法によって関節滑膜細胞の少なくとも一部分を遺伝子編集することを更に含む。特定の実施形態によると、関節機能に関連する少なくとも１つの遺伝子座を標的化するためのジンクフィンガー法の使用であって、関節の滑膜細胞の少なくとも一部分を遺伝子編集する。あるいは、関節機能に関連する少なくとも１つの遺伝子座を標的化する間のジンクフィンガー法の使用であって、関節の滑膜細胞の少なくとも一部分を遺伝子編集して、関節機能遺伝子に関連する少なくとも１つの遺伝子座の発現を、関節滑膜細胞の少なくとも一部分で増強させる。

【０２５４】

個々のジンクフィンガーは、保存されたββα構成で約３０個のアミノ酸を含有する。αヘリックスの表面上の数個のアミノ酸は、典型的には、ＤＮＡの主溝の３ｂｐに、様々なレベルの選択性で接触する。ジンクフィンガーは、２つのタンパク質ドメインを有する。第１のドメインは、真核生物の転写因子を含み、かつジンクフィンガーを含有するＤＮＡ結合ドメインである。第２のドメインは、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、かつＤＮＡの触媒的切断に関与するヌクレアーゼドメインである。

【０２５５】

個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的には、３～６個の個々のジンクフィンガー反復を含有し、各々９～１８塩基対を認識し得る。ジンクフィンガードメインが、それらの意図された標的部位に特異的である場合、合計１８塩基対を認識する３フィンガーのＺＦＮの対でも、理論上、哺乳動物ゲノム中の単一の遺伝子座を標的とし得る。新しいジンクフィンガーアレイを生成する１つの方法は、既知の特異性のより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、３塩基対ＤＮＡ配列を各々認識し得る３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対標的部位を認識し得る３フィンガーアレイを生成することを伴う。あるいは、オリゴマー化プール工学（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチが、隣接フィンガー間のコンテキスト依存性相互作用を考慮する無作為化されたライブラリーから新しいジンクフィンガーアレイを選択するために使用され得る。操作されたジンクフィンガーは、市販されており、Ｓａｎｇａｍｏ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）と提携して、ジンクフィンガー構築物用の固有プラットフォーム（ＣｏｍｐｏＺｒ（登録商標）

）を開発している。
【０２５６】
ジンクフィンガー法を介して滑膜細胞を恒久的に遺伝子編集することによってサイレンシング又は阻害され得る遺伝子の非限定的な例としては、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＴＮＦ－αが挙げられる。ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１８、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、又はＮＬＲＰ３インフラマソームの成分。いくつかの実施形態では、ＮＬＲＰ３インフラマソームの構成成分は、ＮＬＲＰ３、ＡＳＣ（ＣＡＲＤを含むアポトーシス関連スペック様タンパク質）、カスパーゼ－１、及びそれらの組み合わせを含む。
【０２５７】
ジンクフィンガー法を介して滑膜細胞を恒久的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例としては、ＩＬ－１Ｒａ、ＴＩＭＰ－１、ＴＩＭＰ－２、ＴＩＭＰ－３、ＴＩＭＰ－４、及びそれらの組み合わせを含む群が挙げられる。一態様では、本開示は、抗炎症性サイトカインの上方調節のための組成物を提供する。
【０２５８】
ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を改変するための、及び本開示の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，７４６，８３８号、同第６，７９４，１３６号、同第６，８２４，９７８号、同第６，８６６，９９７号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、同第７，０３０，２１５号、同第７，２２０，７１９号、同第７，２４１，５７３号、同第７，２４１，５７４号、同第７，５８５，８４９号、同第７，５９５，３７６号、同第６，９０３，１８５号、及び同第６，４７９，６２６号に説明されており、これらは、参照によって本明細書に組み込まれる。
【０２５９】
いくつかの態様では、細胞は、エクスビボで遺伝子編集され得、遺伝子編集は、１つ以上の抗炎症性サイトカイン遺伝子座を標的とする。いくつかの態様では、細胞は、被滑膜細胞である。いくつかの態様では、細胞は、間葉系幹細胞である。いくつかの態様では、細胞は、マクロファージである。いくつかの態様では、本開示は、遺伝子編集された細胞の集団を含む関節の疾患又は状態の治療又は予防のための医薬組成物を提供し、遺伝子編集された細胞は、関節機能に関連する少なくとも１つの遺伝子座を標的とする遺伝子編集システムによって編集される。一態様では、遺伝子編集された細胞の集団が滑膜関節内に注射される。
【０２６０】
ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を改変するための、及び本開示の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の他の例は、Ｂｅａｎｅ，ｅｔａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１５，２３　１３８０－１３９０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【０２６１】
例示的な実施形態
いくつかの実施形態では、本開示は、関節の疾患又は状態の治療又は予防のための医薬組成物を提供し、組成物が、治療有効量の、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）遺伝子編集システムをコードする１つ以上の核酸を含む。システムは、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９（Ｃａｓ９）タンパク質と、ＩＬ－１α又はＩＬ－１β遺伝子を標的とする少なくとも１つのガイドＲＮＡであって、標的配列が、Ｃａｓ９タンパク質のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列に隣接している、ガイドＲＮＡと、を含む。
【０２６２】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含

む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２６６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列

は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２６７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２６８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２又はエクソン３の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２又はエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２６９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３又はエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２７０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２７１】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン５又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン５又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン６又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。
【０２７２】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。
【０２７３】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。
【０２７４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２７５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２７７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮ

Ａは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン５、エクソン６、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号２９８～３８７からなる群から選択される配列と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２９８～３８７からなる群から選択される配列と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２９８～３８７からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２９８～３８７からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２９８～３８７からなる群から選択される配列と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２９８～３８７からなる群から選択される。

【０２７９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号３０１と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０１と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０１と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０１と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０１と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０１である。

【０２８０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号３０９と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０９と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０９と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０９と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０９と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０９である。

【０２８１】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性を有する。

いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される。

【０２８２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２８３】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２８４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２８５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、

ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２８６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２８７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０２８８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２又はエクソン３の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２又はエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２８９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３又はエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエク

ソン３又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。
【０２９０】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。
【０２９１】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン５又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン５又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン６又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。
【０２９２】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。
【０２９３】
いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ

配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２９４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２９５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２９６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β

遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２９７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン５、エクソン６、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０２９８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号４６２と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４６２と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４６２と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４６２と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４６２と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４６２である。

【０２９９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号３９１と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９１と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９１と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９１と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９１と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９１である。

【０３００】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号３９３と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９３と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９３と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９３と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９３と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９３である。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号３８８と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８８と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８８と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８８と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８８と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８８である。

【０３０２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号３８９と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８９と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８９と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８９と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８９と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８９である。

【０３０３】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号２０２～２１６、５２２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２０２～２１６、５２２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２０２～２１６、５２２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２０２～２１６、５２２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２０２～２１６、５２２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２０２～２１６、５２２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される。

【０３０４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号５５２と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５２と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５２と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５２と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５２と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５２である。

【０３０５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号５５４と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５４と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５４と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５４と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５４と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５４である。

【０３０６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号５７８と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７８と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７８と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７８と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７８と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７８である。

【０３０７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号５７９と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７９と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７９と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７９と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７９と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７９である。

【０３０８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される。

【０３０９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号４９８と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４９８と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４９８と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４９８と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４９８と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４９８である。

【０３１０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号５０６と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５０６と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５０６と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５０６と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５０６と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５０６である。

【０３１１】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書に説明されるように、１つ以上の核酸を集合的に含む１つ以上のウイルスベクターを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、及び単純ヘルペスウイルス－１から選択される組換えウイルスを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のウイルスベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を含む。いくつかの実施形態では、組換えＡＡＶは、血清型５（ＡＡＶ５）のものである。いくつかの実施形態では、組換えＡＡＶは、血清型６（ＡＡＶ６）のものである。

【０３１２】

いくつかの実施形態では、１つ以上のウイルスベクターは、Ｃａｓ９タンパク質をコードする、１つ以上の核酸のうちの第１の核酸を含む第１のウイルスベクターと、少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする、１つ以上の核酸のうちの第２の核酸を含む第２のウイルスベクターと、を含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のウイルスベクターは、単一の核酸を含むウイルスベクターを含み、単一の核酸が、Ｃａｓ９タンパク質及び少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする。

【０３１３】

いくつかの実施形態では、組成物は、１つ以上の核酸を集合的に含む１つ以上のリポソームを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の核酸は、裸の状態で存在する。

【０３１４】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９ポリペプチドである。

【０３１５】

いくつかの実施形態では、組成物は、非経口投与のために製剤化される。いくつかの実施形態では、組成物は、対象の関節内の関節内注射のために製剤化される。

【０３１６】

別の態様では、本開示は、関節の疾患又は状態の治療又は予防を必要とする対象においてそれを行うための方法を提供する。方法は、対象の関節に、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）遺伝子編集システムをコードする１つ以上の核酸を含む薬学的有効量の組成物を含む医薬組成物を投与することを含む。システムは、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９（Ｃａｓ９）タンパク質と、ＩＬ－１α又はＩＬ－１β遺伝子を標的とする少なくとも１つのガイドＲＮＡであって、標的配列は、Ｃａｓ９タンパク質のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列に隣接している、ガイドＲＮＡと、を含む。

【０３１７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号１６８～１８７、２９８～３８７、及び６８１～７１０からなる群から選択される配列と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１６８～１８７、２９８～３８７、及び６８１～７１０からなる群から選択される配列と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１６８～１８７、２９８～３８７、及び６８１～７１０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１６８～１８７、２９８～３８７、及び６８１～７１０からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１６８～１８７、２９８～３８７、及び６８１～７１０からなる群から選択される配列と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１６８～１８７、２９８～３８７、及び６８１～７１０からなる群から選択される。

【０３１８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号３０１と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。

いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０１と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０１と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０１と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０１と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０１である。

【０３１９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号３０９と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０９と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０９と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０９と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０９と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３０９である。

【０３２０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される配列と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号１８８～２０１、３８８～４９６、及び７１１～７４０からなる群から選択される。

【０３２１】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号４６２と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４６２と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４６２と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４６２と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４６２と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４６２である。

【０３２２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号３９１と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９１と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９１と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９１と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９１と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９１である。

【０３２３】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号３９３と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。

いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９３と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９３と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９３と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９３と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３９３である。

【０３２４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号３８８と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８８と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８８と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８８と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８８と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８８である。

【０３２５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、ヒトＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号３８９と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８９と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８９と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８９と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８９と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号３８９である。

【０３２６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号２０２～２１６、５５２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２０２～２１６、５５２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２０２～２１６、５５２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２０２～２１６、５５２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２０２～２１６、５５２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される配列と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２０２～２１６、５５２～５９０、及び７４１～７７０からなる群から選択される。

【０３２７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号５５２と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５２と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５２と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５２と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５２と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５２である。

【０３２８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号５５４と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。

いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５４と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５４と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５４と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５４と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５５４である。

【０３２９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号５７８と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７８と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７８と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７８と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７８と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７８である。

【０３３０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、配列番号５７９と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７９と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７９と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７９と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７９と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５７９である。

【０３３１】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン２の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３３２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン３の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３３３】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を

標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン４の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３３４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン５の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３３５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン６の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３３６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン７の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３３７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２又はエクソン３の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩ

Ｌ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２又はエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３３８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３又はエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３３９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３４０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン５又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン５又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン６又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３４１】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に相補的である

ｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３４２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３４３】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３４４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、

又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３４５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３４６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１α遺伝子を標的とし、ＩＬ－１α遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に対して相補的なｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３４７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１

、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される配列と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号２１７～２３５、４９７～５５１、及び７７１～８００からなる群から選択される。

【０３４８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号４９８と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４９８と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４９８と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４９８と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４９８と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号４９８である。

【０３４９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、配列番号５０６と少なくとも７５％の同一性を有するｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５０６と少なくとも８０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５０６と少なくとも８５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５０６と少なくとも９０％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５０６と少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、配列番号５０６である。

【０３５０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン２の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３５１】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン３の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３５２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含

む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン４の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３５３】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン５の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３５４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン６の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３５５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列と５つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列と４つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列と３つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列と２つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列と１つ以下のミスマッチを形成する。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン７の標的配列とのミスマッチを形成しない。

【０３５６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２又はエクソン３の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２又はエクソン４の標的配列に

相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３５７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３又はエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３５８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３５９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン５又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン５又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン６又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３６０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン４の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イ

ヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３６１】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３６２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３６３】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン５の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少な

くとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３６４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３６５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン５、エクソン６、又はエクソン６の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのガイドＲＮＡは、イヌＩＬ－１β遺伝子を標的とし、ＩＬ－１β遺伝子のエクソン２、エクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、又はエクソン７の標的配列に相補的であるｃｒＲＮＡ配列を含む。

【０３６６】

概して、本明細書に説明されるｃｒＲＮＡ配列は、例えば、標的配列の逆相補と比較して、１つ以上のヌクレオチド置換を含み得る。ヌクレオチド置換を作製するためのガイダンスは、例えば、Ｊｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．ａｎｄ Ｄｏｕｄｎａ（Ｊｉａｎｇ ａｎｄ Ｄｏｕｄｎａ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．，４６：５０５－２９（２０１７））に見出され得、その内容は、全ての目的のために、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。具体的には、Ｊｉａｎｇ及びＤｏｕｄｎａは、ａｐｏ Ｃａｓ９タンパク質（図３）から、侵入した二本鎖ＤＮＡ分子の標的鎖に結合したＣａｓ９－ｓｇＲＮＡ複合体（図５及び図７）までの範囲のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムの多くの異なる確認のために生成された分子構造を、図６のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９結合及び切断の詳細な分子モデルに到達するように考慮する。これらの分子モデルから、当業者は、ｃｒＲＮＡ配列

中のどのヌクレオチド位置が、標的配列とのミスマッチに対してより寛容であるかを知るであろう。

【０３６７】

例えば、Ｊｉａｎｇは、ｃｒＲＮＡ標的化配列の「シード領域」としても知られるＰＡＭ近位１０～１２ヌクレオチドが、強固なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９結合に対して最も重要であると教示している。具体的には、Ｊｉａｎｇは、シード領域のミスマッチが「標的ＤＮＡの結合及び切断を著しく損ねるか、又は完全に破壊するのに対し、シード領域で近い相同性が、他の場所で多くのミスマッチがあっても、多くの場合、オフターゲット結合事象につながる」、すなわち、ＰＡＭ－遠位８～１０ヌクレオチドにおけるミスマッチを開示している。Ｊｉａｎｇ　ａｔ　５１２。同様に、Ｊｉａｎｇは、ｓｇＲＮＡのシード領域と標的ＤＮＡとの間の”［ｐ］ｅｆｅｃｔ相補性がＣａｓ９媒介ＤＮＡ標的化及び切断に必要であるが、それに対して、非シード領域における不完全な塩基対合が、標的結合特異性に関してはるかに許容されることを教示する。同上、引用は省略。

【０３６８】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び／又は方法で使用されるｃｒＲＮＡ配列は、ＰＡＭ遠位８～１０ヌクレオチド内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つ以上のヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ＰＡＭ遠位８～１０ヌクレオチド内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ＰＡＭ遠位８～１０ヌクレオチド内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、２つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ＰＡＭ遠位８～１０ヌクレオチド内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、３つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ＰＡＭ遠位８～１０ヌクレオチド内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、４つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ＰＡＭ遠位８～１０ヌクレオチド内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、５つのヌクレオチド置換を含む。

【０３６９】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び／又は方法で使用されるｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の８の位置内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つ以上のヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の８の位置内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の８の位置内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、２つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の８の位置内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、３つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の８の位置内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、４つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の８の位置内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、５つのヌクレオチド置換を含む。

【０３７０】

同様に、いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び／又は方法で使用されるｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の１０の位置内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つ以上のヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の１０の位置内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の１０の位置内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、２つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の１０の位置内の、例えば、配列番号２９８～５

９０のいずれかに対する、３つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の１０の位置内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、４つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列の最初の１０の位置内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、５つのヌクレオチド置換を含む。

【０３７１】

更に、Ｊｉａｎｇ及びＤｏｕｄｎａは、ｃｒＲＮＡ標的化配列の１４～１７位におけるＰＡＭ遠位ヌクレオチドの塩基対合が、標的配列への結合後の切断活性に重要であると仮定している。

【０３７２】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び／又は方法で使用されるｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列のヌクレオチド位置１～３及び８～１０内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つ以上のヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列のヌクレオチド位置１～３及び８～１０内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列のヌクレオチド位置１～３及び８～１０内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、２つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列のヌクレオチド位置１～３及び８～１０内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、３つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列のヌクレオチド位置１～３及び８～１０内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、４つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列のヌクレオチド位置１～３及び８～１０内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、５つのヌクレオチド置換を含む。

【０３７３】

同様に、いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び／又は方法で使用されるｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列のヌクレオチド位置１～３及び８内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つ以上のヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列のヌクレオチド位置１～３及び８内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列のヌクレオチド位置１～３及び８内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、２つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列のヌクレオチド位置１～３及び８内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、３つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ配列は、ｃｒＲＮＡ配列のヌクレオチド位置１～３及び８内の、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、４つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、ｃｒＲＮＡ。

【０３７４】

更に他の実施形態では、本開示の組成物及び／又は方法で使用されるｃｒＲＮＡ配列は、例えば、実験を通じて決定されるように、ｃｒＲＮＡの配列全体を通して、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つ以上のヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び／又は方法で使用されるｃｒＲＮＡ配列は、例えば、実験を通じて決定されるように、ｃｒＲＮＡの配列全体を通して、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、１つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び／又は方法で使用されるｃｒＲＮＡ配列は、例えば、実験を通じて決定されるように、ｃｒＲＮＡの配列全体を通して、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、２つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、本

開示の組成物及び／又は方法で使用されるｃｒＲＮＡ配列は、例えば、実験を通じて決定されるように、ｃｒＲＮＡの配列全体を通して、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、３つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び／又は方法で使用されるｃｒＲＮＡ配列は、例えば、実験を通じて決定されるように、ｃｒＲＮＡの配列全体を通して、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、４つのヌクレオチド置換を含む。いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び／又は方法で使用されるｃｒＲＮＡ配列は、例えば、実験を通じて決定されるように、ｃｒＲＮＡの配列全体を通して、例えば、配列番号２９８～５９０のいずれかに対する、５つのヌクレオチド置換を含む。

【０３７５】

いくつかの実施形態では、関節の疾患又は状態は、関節炎である。いくつかの実施形態では、関節炎は、変形性関節炎である。

【０３７６】

いくつかの実施形態では、投与は、対象の関節内への医薬組成物の関節内注射を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、手術中に投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、手術後に投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、徐放性医薬組成物である。

【０３７７】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書に説明されるように、１つ以上の核酸を集合的に含む１つ以上のウイルスベクターを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、及び単純ヘルペスウイルス－１から選択される組換えウイルスを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のウイルスベクターは、組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を含む。いくつかの実施形態では、組換えＡＡＶは、血清型５（ＡＡＶ５）のものである。いくつかの実施形態では、組換えＡＡＶは、血清型６（ＡＡＶ６）のものである。

【０３７８】

いくつかの実施形態では、１つ以上のウイルスベクターは、Ｃａｓ９タンパク質をコードする、１つ以上の核酸のうちの第１の核酸を含む第１のウイルスベクターと、少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする、１つ以上の核酸のうちの第２の核酸を含む第２のウイルスベクターと、を含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のウイルスベクターは、単一の核酸を含むウイルスベクターを含み、単一の核酸が、Ｃａｓ９タンパク質及び少なくとも１つのガイドＲＮＡをコードする。

【０３７９】

いくつかの実施形態では、組成物は、１つ以上の核酸を集合的に含む１つ以上のリポソームを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の核酸は、裸の状態で存在する。

【０３８０】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９ポリペプチドである。

変形性関節炎及び他の疾患を治療する方法

【０３８１】

本明細書に説明される組成物及び方法は、疾患を治療するための方法で使用され得る。一実施形態では、それらは、炎症性関節障害を治療する際に使用するためのものである。これらはまた、本明細書及び以下の段落に説明される他の障害を治療する際に使用され得る。一態様では、組成物及び方法は、変形性関節炎（ＯＡ）を治療するために使用される。

【０３８２】

いくつかの実施形態では、本開示は、関節の疾患又は状態の治療又は予防のための方法であって、方法が、遺伝子編集システムを導入することを含み、遺伝子編集システムが、関節機能に関連する少なくとも１つの遺伝子座を標的とする、方法を提供する。いくつか

の実施形態では、関節疾患は、変形性関節炎である。一態様では、方法は、イヌを変形性関節炎で治療するために使用される。別の態様では、方法は、変形性関節疾患を有する哺乳動物を治療するために使用される。いくつかの態様では、方法は、関節疾患を患うイヌ又はウマを治療するために使用される。いくつかの態様では、方法は、変形性関節炎、外傷後関節炎、感染後関節炎、関節リウマチ、痛風、偽痛風、自己免疫媒介性関節炎、炎症性関節炎、炎症介在性及び免疫介在性の関節の疾患を治療するために使用される。

【０３８３】

いくつかの実施形態では、方法は、関節滑膜細胞の一部分を遺伝子編集して、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、及びＴＮＦ－αのうちの１つ以上の発現を低減させるか、又はサイレンシングすることを更に含む。一態様では、方法は、関節滑膜細胞の一部分を遺伝子編集して、ＩＬ－１α、ＩＬ－１βのうちの１つ以上の発現を低減させるか、又はサイレンシングすることを更に含む。

【０３８４】

一態様では、方法は、遺伝子編集を更に含み、遺伝子編集が、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ジンクフィンガー法、及びそれらの組み合わせから選択される１つ以上の方法を含む。

【０３８５】

いくつかの態様では、方法は、ＡＡＶベクター、レンチウイルスベクター、又はレトロウイルスベクターを使用して遺伝子編集を送達することを更に含む。好ましい実施形態では、方法は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ１（Ｙ７０５＋７３１Ｆ＋Ｔ４９２Ｖ）、ＡＡＶ２（Ｙ４４４＋５００＋７３０Ｆ＋Ｔ４９１Ｖ）、ＡＡＶ３（Ｙ７０５＋７３１Ｆ）、ＡＡＶ５、ＡＡＶ５（Ｙ４３６＋６９３＋７１９Ｆ）、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６（ＶＰ３バリアントＹ７０５Ｆ／Ｙ７３１Ｆ／Ｔ４９２Ｖ）、ＡＡＶ－７ｍ８、ＡＡＶ８、ＡＡＶ８（Ｙ７３３Ｆ）、ＡＡＶ９、ＡＡＶ９（ＶＰ３バリアントＹ７３１Ｆ）、ＡＡＶ１０（Ｙ７３３Ｆ）、及びＡＡＶ－ＳｈＨ１０を使用して遺伝子編集を送達することを更に含む。いくつかの態様では、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６（Ｙ７０５Ｆ／Ｙ７３１Ｆ／Ｔ４９２Ｖ）、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、及びＡＡＶ９（Ｙ７３１Ｆ）からなる群から選択される血清型を含む。

【０３８６】

医薬組成物及び投与の方法

本明細書に説明される方法は、活性成分としてＣＲＩＳＰＲ遺伝子（例えば、ＩＬ－１α及び／又はＩＬ－１β）編集複合体を含む医薬組成物の使用を含む。

【０３８７】

投与の方法／経路に応じて、医薬剤形は、数個のタイプでもたらされる。これらは、多くの種類の液体、固体、及び半固体剤形を含む。一般的な医薬剤形としては、多くの他のものの中でも、丸薬、錠剤、又はカプセル、飲料又はシロップ、並びに植物又は食品などの天然又はハーブ形態が挙げられる。特に、薬物送達の投与の経路（ＲＯＡ）は、問題の物質の剤形に依存する。液体医薬剤形は、投与又は消費を意図する薬物又は医薬品として使用される化合物の用量の液体形態である。

【０３８８】

一実施形態では、本開示の組成物は、皮下（例えば、関節内注射）、皮膚（例えば、パッチを介して経皮的に）、及び／又はインプラントを介して対象に送達され得る。例示的な医薬剤形としては、例えば、丸薬、浸透圧送達システム、エリキシル、エマルション、ハイドロゲル、懸濁液、シロップ、カプセル、錠剤、経口溶解錠剤（ＯＤＴ）、ゲルカプセル、薄膜、粘着性局所パッチ、ロリポップ、ロゼンジ、チューインガム、乾燥粉末吸入器（ＤＰＩ）、気化器、ネブライザー、定量吸入器（ＭＤＩ）、軟膏、経皮パッチ、皮内インプラント、皮下インプラント、及び経皮インプラントが挙げられる。

【０３８９】

本明細書で使用される場合、「皮膚送達」又は「皮膚投与」は、医薬剤形が真皮（すなわち、表皮（皮膚を構成する）と皮下組織との間の皮膚の層）に、又はそれらを通して投

与される投与の経路を指し得る。「皮下送達」は、医薬剤形が皮下組織層に対して又はその下である投与の経路を指し得る。

【０３９０】

好適な医薬組成物を製剤化する方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２１ｓｔ ｅｄ．，２００５、及びｔｈｅ ｂｏｏｋｓ ｉｎ ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ Ｄｒｕｇｓ ａｎｄ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ：ａ Ｓｅｒｉｅｓ ｏｆ Ｔｅｘｔｂｏｏｋｓ ａｎｄ Ｍｏｎｏｇｒａｐｈｓ（Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎ．Ｙ．）を参照されたい。例えば、非経口、皮内、又は皮下適用に使用される溶液又は懸濁液は、注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒などの滅菌希釈剤、ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤、アスコルビン酸又は重硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤、エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤、酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩などの緩衝剤、塩化ナトリウム又はブドウ糖などの毒性の調整のための薬剤を含み得る。ｐＨは、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの、酸又は塩基で調整され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、又はガラス若しくはプラスチックで作製された複数回投与バイアルに封入され得る。

【０３９１】

注射可能な使用に好適な医薬組成物は、滅菌注射可能な溶液又は分散液の即時調製のための滅菌水溶液（水溶性である）又は分散液及び滅菌粉末を含み得る。静脈内投与については、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ ＥＬ（商標）（ＢＡＳＦ，Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，Ｎ．Ｊ．）、又はリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌されなければならず、注射容易性が存在する程度に流体であるべきである。それは、製造及び保管の条件下で安定であるべきであり、細菌及び真菌などの微生物の混入作用に抗して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、並びにそれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散の場合に必要な粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどによって達成され得る。多くの場合、組成物中に、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどのポリアルコールを含むことが好ましいことになる。注射可能な組成物の長期間の吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物中に含むことによってもたらされ得る。

【０３９２】

滅菌注射可能な溶液は、活性化合物を、上記で列挙された成分のうちの１つ又は組み合わせを用いて、適切な溶媒中に必要な量で組み込み、必要に応じて、その後に濾過滅菌されることによって調製され得る。一般に、分散剤は、塩基性分散媒体、及び上記で列挙されたものからの必要な他の成分を含有する活性化合物を滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥及び凍結乾燥であり、活性成分の粉末に、その以前に滅菌濾過された溶液からの任意の追加の所望の成分を加えて得られる。

【０３９３】

核酸であるか、又は核酸を含む治療用化合物は、ＤＮＡワクチンなどの核酸剤の投与に好適な任意の方法によって投与され得る。これらの方法としては、遺伝子銃、バイオインジェクター、及び皮膚パッチ、並びに米国特許第６，１９４，３８９号に開示される微粒子ＤＮＡワクチン技術、及び米国特許第６，１６８，５８７号に開示される粉末形態ワクチンを有する哺乳動物経皮無針ワクチン接種などの無針方法が挙げられる。加えて、鼻腔内送達が、特に、Ｈａｍａｊｉｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍ

ｕｎｏｐａｔｈｏｌ．，８８（２），２０５－１０（１９９８）に記載されるように可能である。リポソーム（例えば、米国特許第６，４７２，３７５号に記載される）及びマイクロカプセル化もまた、使用され得る。生分解性標的可能微粒子送達システムもまた、使用され得る（例えば、米国特許第６，４７１，９９６号に記載される）。

【０３９４】

治療用化合物は、インプラント及びマイクロカプセル化送達システムを含む、徐放性製剤などの、身体からの急速な排除に対して治療用化合物を保護することになる担体を用いて調製され得る。コラーゲン、エチレンビニルアセテート、ポリ無水物（例えば、ポリ［１，３－ビス（カルボキシフェノキシ）プロパン－ｃｏ－セバシン酸］（ＰＣＰＰ－ＳＡ）基質、脂肪酸二量体－セバシン酸（ＦＡＤ－ＳＡ）コポリマー、ポリ（ラクチド－ｃｏ－グリコリド）、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオールトリエステル、ポリエチレングリコール被覆リポソーム、及びポリ乳酸などの、生分解性の生体適合性のポリマーが使用され得る。そのような製剤は、標準的な技術を使用して調製されるか、又は、例えば、Ａｌｚａ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ及びＮｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．から商業的に取得され得る。リポソーム懸濁液（細胞抗原に対するモノクローナル抗体を有する選択された細胞に標的化されたリポソームを含む）もまた、薬学的に許容される担体として使用され得る。これらは、例えば、米国特許第４，５２２，８１１号に記載されるように、当業者に既知の方法によって調製され得る。半固体、ゲル化、ソフトゲル、又は他の製剤（徐放性を含む）が、例えば、外科手術部位への投与が所望されるときに、使用され得る。そのような製剤を作製する方法は、当該技術分野で既知であり、生分解性の生体適合性ポリマーの使用を含み得る。例えば、Ｓａｗｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｙａｌｅ　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｍｅｄ．２００６　Ｄｅｃｅｍｂｅｒ；７９（３－４）：１４１－１５２を参照されたい。

【０３９５】

医薬組成物は、容器、キット、パック、又はディスペンサーに、投与の説明書と一緒に含まれ得る。

【実施例】

【０３９６】

ここで、本明細書に包含される実施形態を、以下の実施例を参照して説明する。これらの実施例は、例示のみの目的のために提供され、本明細書に包含される本開示は、決してこれらの実施例に限定されるものとして解釈されるべきではないが、むしろ、本明細書に提供される教示の結果として明らかになる、ありとあらゆる変形例を包含するように解釈されるべきである。

【０３９７】

実施例１．変形性関節炎のマウスモデルにおけるＣＲＩＳＰＲ遺伝子操作によるＩＬ－１発現を低減する。

６０匹のＣ５７Ｂマウスが選択され、各々１５匹のマウスの４群に分布される。ＤＭＭ外科的方法を使用して、マウスの各々にＯＡを誘導する。マウスがＯＡを発症すると、マウスを以下のように処理した：

第１群：ＩＬ－１α及びＩＬ－１βを標的とするように操作されたＣＲＩＳＰＲ　ＡＡＶベクターをＯＡ関節に直接注射、ＩＬ－１タンパク質の発現をサイレンシング又は低減する。

第２群：ＩＬ－１産生に影響しない「ナンセンス」量で操作されたＣＲＩＳＰＲ　ＡＡＶベクターをＯＡ関節に直接注射、陰性対照。

第３群：ＩＬ－１Ｒａを標的とするように操作されたＣＲＩＳＰＲ　ＡＡＶベクターをＯＡ関節に直接注射、ＩＬ－１Ｒａタンパク質の発現をサイレンシング又は低減する。

第４群：ＯＡ関節の滅菌緩衝生理食塩水への直接注射、注射プロセスに関する対照。

【０３９８】

マウスは、処理の前及び後に監視され、それらの移動運動及び探索的活動に対する効果を評価する。機械的感受性及び歩行の変化もまた、監視される。アロディニア及び後肢の

握力もまた、監視され得る。
【０３９９】
約８週間後、動物を殺傷し、肉眼的組織病理、及びＩＨＣによるＩＬ－１発現についてＯＡ関節組織を評価する。炎症のバイオマーカー、例えば、ＯＡ関節におけるＭＭＰ－３発現もまた、評価される。
【０４００】
ＩＬ－１α及びＩＬ－１βを標的とし、かつＩＬ－１タンパク質の発現をサイレンシング又は低減するように操作されたＣＲＩＳＰＲ　ＡＡＶベクターで処理された第１群マウスは、ＩＨＣによるＩＬ－１の低減されたレベル、組織病理学による組織再生、及び３つの他の群のうちのいずれかよりも低いレベルの炎症バイオマーカーを示すことになる。第３群マウスは、他の３つの群のうちのいずれかよりも比較的高いレベルの炎症バイオマーカーを示すことになる。
【０４０１】
実施例２．マウスＩＬ１Ａ及びＩＬ１Ｂに対するガイド切断効率を評価する
インビトロ切断アッセイ
ＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ（ホスフォロチオネート修飾されたｓｇＲＮＡ、表３）を、Ｉｌ１ａのエクソン４及びＩｌ１ｂのエクソン４に対して設計した（Ｉｌ１ａ－２０１　ＥＮＳＭＵＳＴ０００００００２８８８２．１及びＩｌ１ｂ－２０１　ＥＮＳＭＵＳＴ０００００００２８８８１．１３、Ｉｌ１ａのエクソン４及びＩｌ１ｂのエクソン４上の標的配列に関する表２を参照されたい）。Ｃ５７ＢＬ／６マウスゲノムＤＮＡを使用して、ＰＣＲ（Ｐｈｕｓｉｏｎ　Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ、ＮＥＢ、カタログ＃Ｍ０５３０Ｓ）によってＩｌ１ａ及びＩｌ１ｂのエクソン４を増幅する、Ｉｌ１ａプライマー順配列：ＣＡＴＴＧＧＧＡＧＧＡＴＧＣＴＴＡＧＧＡ（配列番号６２０）、Ｉｌ１ａプライマー逆配列：ＧＧＣＴＧＣＴＴＴＣＴＣＴＣＣＡＡＣＡＧ（配列番号６２１）、Ｉｌ１ｂプライマー順配列：ＡＧＧＡＡＧＣＣＴＧＴＧＴＣＴＧＧＴＴＧ（配列番号６２２）、Ｉｌ１ｂプライマー逆配列：ＴＧＧＣＡＴＣＧＴＧＡＧＡＴＡＡＧＣＴＧ（配列番号６２３）。アンプリコンをＰＣＲ精製した（ＱｉａＱｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キット、カタログ＃２８１０６）。１００ｎｇの精製ＰＣＲ産物、２００ｎｇの修飾ガイドＲＮＡ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）、及び０．５ｕｇのＴｒｕｅＣｕｔ　Ｓｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質Ｖ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ａ３６４９８）又は０．５ｕｇのＧｅｎｅ　Ｓｎｉｐｐｅｒ　ＮＬＳ　Ｓａｕ　Ｃａｓ９（ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ、カタログ＃Ｍ１２８１－５０－１）を使用して、インビトロ切断アッセイを使用して、ガイド切断効率を決定した。Ｃａｓ９の２つのタイプ、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９及びＳ．ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９を、それらの編集能力について比較した。２％アガロースゲルを、切断アッセイの定性読み取りに使用した。
【０４０２】
細胞株の編集
ＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ（ホスフォロチオネート修飾されたｓｇＲＮＡ、表２）を、Ｉｌ１ａのエクソン４及びＩｌ１ｂのエクソン４に対して設計した（Ｉｌ１ａ－２０１　ＥＮＳＭＵＳＴ０００００００２８８８２．１及びＩｌ１ｂ－２０１　ＥＮＳＭＵＳＴ０００００００２８８８１．１３）。ガイドＲＮＡ切断効率を、Ｓａｎｇｅｒシーケンシング、及びＳｙｎｔｈｅｇｏ　ＩＣＥ（例えば、全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ　ｏｆ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｅｄｉｔｓ　ｆｒｏｍ　Ｓａｎｇｅｒ　Ｔｒａｃｅ　Ｄａｔａ，Ｈｓｉａｕ　Ｔ，Ｍａｕｒｅｓ　Ｔ，Ｗａｉｔｅ　Ｋ，Ｙａｎｇ　Ｊ　ｅｔ　ａｌ．ｂｉｏｒｘｉｖ．２０１８を参照されたい）、又は編集率を計算するＴＩＤＥ（全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Ｅａｓｙ　ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ　ｏｆ　ｇｅｎｏｍｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ　ｂｙ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｔｒａｃｅ　ｄｅｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ，Ｂｒｉｎｋｍａｎ　Ｅ，Ｃｈｅｎ　Ｔ，Ａｍｅｎｄｏｌａ　Ｍ　ａｎｄ　Ｖａｎ　Ｓｔｅｅｎｓｅｌ　Ｂ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　ｒｅｓ　２０１４を参照されたい）ウェブツールを使用して

、Ｊ７７４．２及びＮＩＨ３Ｔ３細胞のプールで決定した。実験はまた、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９とＳ．ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９との効率を比較した。細胞を、５ｕｇのＴｒｕｅＣｕｔ　Ｓｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質Ｖ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ａ３６４９８）又は１００ｐｍｏｌの修飾ガイドＲＮＡ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を有する５ｕｇのＥｎＧｅｎ　Ｓａｕ　Ｃａｓ９タンパク質（ＮＥＢ　Ｍ０６５４Ｔ）を用いて、電気穿孔した（Ａｍａｘａ　４Ｄ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　ｕｎｉｔ，Ｌｏｎｚａ）。ＳＦヌクレオフェクタ溶液及びプログラムＣＭ１３９をＪ７７４．２細胞に使用し、ＳＧヌクレオフェクタ溶液及びプログラムＥＮ１５８をＮＩＨ３Ｔ３細胞に使用した。電気穿孔の３日後に細胞ペレットを採取し、各プールからｇＤＮＡを抽出した（Ｑｉａｇｅｎ，ＤＮｅａｓｙ　ｂｌｏｏｄ　ａｎｄ　ｔｉｓｓｕｅ　ｋｉｔ，６９５０６）。Ｉｌ１ａ又はＩｌ１ｂのエクソン４を、ＰＣＲ（Ｐｈｕｓｉｏｎ　Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ、ＮＥＢ、カタログ＃Ｍ０５３０Ｓ）によって適切なプール内で増幅した。Ｉｌ１ａプライマー順配列：ＴＧＧＴＴＣＡＧＧＡＡＡＣＣＣＡＡＧ（配列番号６２４）、Ｉｌ１ａプライマー逆配列：ＧＣＡＧＴＡＴＧＧＣＣＡＡＧＡＡＡＧＧＡ（配列番号６２５）、Ｉｌ１ｂプライマー順配列：ＡＧＧＡＡＧＣＣＴＧＴＧＴＣＴＧＧＴＴＧ（配列番号６２２）、Ｉｌ１ｂプライマー逆配列：ＣＴＧＧＧＣＡＡＧＡＡＣＡＴＴＧＧＡＴＴ（配列番号６２６）。アンプリコンをＳａｎｇｅｒシーケンシングに供し、Ｓｙｎｔｈｅｇｏ　ＩＣＥ又はＴＩＤＥウェブツールのいずれかを使用して分析して、各クローンに野生型配列が存在しないこと、及びｃＤＮＡ配列にフレームシフトを結果的にもたらすインデルの存在を決定した。

【表５】

表２．標的Ｉｌ１ａ及びＩｌ１ｂ配列

識別子	ガイドID	遺伝子	エクソン	Cas9	標的配列 5'-3'	PAM
配列番号7	sg43	Il1a	4	S.pyogenes	GTATCAGCAACGTCAAGCAA	CGG
配列番号8	sg44	Il1a	4	S.pyogenes	CTGCAGGTCATCTTCAGTGA	AGG
配列番号9	sg45	Il1a	4	S.pyogenes	TATCAGCAACGTCAAGCAAC	GGG
配列番号10	sg46	Il1a	4	S.pyogenes	GCCATAGCTTGCATCATAGA	AGG
配列番号11	sg47	Il1b	4	S.pyogenes	CATCAACAAGAGCTTCAGGC	AGG
配列番号12	sg48	Il1b	4	S.pyogenes	TGCTCTCATCAGGACAGCCC	AGG
配列番号13	sg49	Il1b	4	S.pyogenes	GCTCATGTCCTCATCCTGGA	AGG
配列番号14	sg50	Il1b	4	S.pyogenes	CCTCATCCTGGAAGGTCCAC	GGG
配列番号15	sg51	Il1a	4	S.aureus	TTACTCCTTACCTTCCAGATC	ATGGGT
配列番号16	sg52	Il1a	4	S.aureus	GAAACTCAGCCGTCTCTTCTT	CAGAAT
配列番号17	sg53	Il1a	4	S.aureus	CAACTTCACCTTCAAGGAGAG	CCGGGT
配列番号18	sg54	Il1b	4	S.aureus	GTGTCTTTCCCGTGGACCTTC	CAGGAT
配列番号19	sg55	Il1b	4	S.aureus	CACAGCTTCTCCACAGCCACA	AGTAGT
配列番号20	sg56	Il1b	4	S.aureus	GTGCTGCTGCGAGATTTGAAG	CTGGAT

【表６】

表３．ＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ。

識別子	ガイドID	遺伝子	エクソン	Cas9	cRNA配列 5'-3'	PAM
配列番号 21	sg43	Il1a	4	S.pyogenes	GUAUCAGCAACGUCAAGCAA	CGG
配列番号 22	sg44	Il1a	4	S.pyogenes	CUGCAGGUCAUCUUCAGUGA	AGG
配列番号 23	sg45	Il1a	4	S.pyogenes	UAUCAGCAACGUCAAGCAAC	GGG
配列番号 24	sg46	Il1a	4	S.pyogenes	GCCAUAGCUUGCAUCAUAGA	AGG
配列番号 25	sg47	Il1b	4	S.pyogenes	CAUCAACAAGAGCUUCAGGC	AGG
配列番号 26	sg48	Il1b	4	S.pyogenes	UGCUCUCAUCAGGACAGCCC	AGG
配列番号 27	sg49	Il1b	4	S.pyogenes	GCUCAUGUCCUCAUCCUGGA	AGG
配列番号 28	sg50	Il1b	4	S.pyogenes	CCUCAUCCUGGAAGGUCCAC	GGG
配列番号 29	sg51	Il1a	4	S.aureus	UUACUCCUUACCUUCCAGAUC	ATGGGT
配列番号 30	sg52	Il1a	4	S.aureus	GAAACUCAGCCGUCUCUUCUU	CAGAAT
配列番号 31	sg53	Il1a	4	S.aureus	CAACUUCACCUUCAAGGAGAG	CCGGGT
配列番号 32	sg54	Il1b	4	S.aureus	GUGUCUUUCCCGUGGACCUUC	CAGGAT
配列番号 33	sg55	Il1b	4	S.aureus	CACAGCUUCUCCACAGCCACA	AGTAGT
配列番号 34	sg56	Il1b	4	S.aureus	GUGCUGCUGCGAGAUUUGAAG	CTGGAT

【０４０３】

各ｃＲＮＡ（例えば、表３を参照されたい）を、以下のｔｒａｃｒＲＮＡ配列に融合された上記のｃＲＮＡ配列からなるシングルガイドＲＮＡとして合成した（例えば、配列番号３５及び３６を参照されたい）。ある特定の実施形態では、Ａ＜＞Ｕは、ガイドＲＮＡ活性を増加させるために使用される。

【０４０４】

Ｓａｕ　Ｃａｓ９：ＧＵＵＡＵＡＧＵＡＣＵＣＵＧＧＡＡＡＣＡＧＡＡＵＣＵＡＣＵＡＡＡＡＣＡＡＧＧＣＡＡＡＡＵＧＣＣＧＵＧＵＵＵＡＵＣＵＣＧＵＣＡＡＣＵＵＧＵＵＧＧＣＧＡＧＡＵＵＵＵＵ（配列番号３５）

【０４０５】

Ｓｐｙ　Ｃａｓ９：ＧＵＵＡＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵＵＵ（配列番号３６）

【０４０６】

インビトロ切断アッセイ

図１Ａは、０．５ｕｇのＳｐｙ　Ｃａｓ９並びに２００ｎｇの修飾ガイドＲＮＡのＩｌ１ａ遺伝子に対する４３～４６及びＩＬ１Ｂに対する４７～５０によって切断された、１００ｎｇのマウスＤＮＡのアガロースゲル電気泳動分析を例示する。ＤＮＡは、ガイドＲＮＡを使用して、Ｃａｓ９によって特定の部位で切断されて、未切断対照と比較してアガロースゲル上に予測可能なバンドパターンを生じさせる（いかなる特定の理論によって縛られることを望まず、ｓｇ８＊に対するアガロースゲル電気泳動は、失敗した合成を示すように見える）。

【０４０７】

図１Ｂは、０．５ｕｇのＳａｕ　Ｃａｓ９並びに２００ｎｇの修飾ガイドＲＮＡのＩｌ１ａ遺伝子に対する５１～５３及びＩｌ１ｂに対する５４～５６によって切断された、１００ｎｇのマウスＤＮＡのアガロースゲル電気泳動分析を例示する。ＤＮＡは、ガイドＲＮＡを使用してＣａｓ９によって特定の部位で切断されて、未切断対照と比較してアガロースゲル上に予測可能なバンドパターンを生じさせる。

【０４０８】

細胞株の編集

ゲノムＤＮＡを、編集されたプールから抽出し、Ｉｌ１ａ又はＩｌ１ｂエクソン４を、適切なプールでＰＣＲ増幅した。ＰＣＲ産物をサンガーシーケンシングのために送って、次いで、ＴＩＤＥ又はＳｙｎｔｈｅｇｏ　ＩＣＥソフトウェアを使用して逆畳み込みした

。Ｓｙｎｔｈｅｇｏ　ＩＣＥを使用して、Ｓｐｙ　Ｃａｓ９プールを逆畳み込みした。ソフトウェアは、ガイドＲＮＡ配列及びＰＡＭ部位に基づいて、各プール内の編集のパターンを決定し得る。それは、切断された機能性タンパク質につながり得るインフレーム欠失を引き起こした編集と、真のノックアウトにつながることになるフレームシフト変異を引き起こした編集とを区別することができる。Ｓｙｎｔｈｅｇｏ　ＩＣＥソフトウェアがＳａｕＣａｓ９の編集を逆畳み込みすることができないため、ＳａｕＣａｓ９プールをＴＩＤＥで分析した。ＴＩＤＥ分析は、ガイドＲＮＡ及びＰＡＭ部位に基づいて、プール内の編集のパターンを決定することによって、ＩＣＥと同様の方式で機能する。しかしながら、真のノックアウトスコアを与えるのではなく、それは、インフレーム及びフレームシフト編集パターンの間を区別することができない編集効率スコアを与える。したがって、編集効率スコアは、タンパク質をノックアウトするガイドＲＮＡの能力を超えて表現する可能性がある。ＳｐｙＣａｓ９は、ＣＲＩＳＰＲ遺伝子編集に使用される標準タンパク質である。しかしながら、それは、３１５６ｂｐであるＳａｕ　Ｃａｓ９と比較して、４１０１ｂｐである。ＡＡＶなどの一部のウイルスをパッケージングするサイズ制限に起因して、それは、ＳａｕＣａｓ９及びＳｐｙＣａｓ９の編集能力を比較して、より小さいＳａｕＣａｓ９が、このプロジェクト用に設計されているベクターに使用され得るか否かを確認するために決定された。

【０４０９】

図２Ａ～図２Ｄは、Ｊ７７４．２（「Ｊ」）及びＮＩＨ３Ｔ３（「Ｎ」）細胞におけるガイドＲＮＡの範囲とともに使用されるＳｐｙ　Ｃａｓ９（図２Ａ及び図２Ｂ）並びにＳａｕＣａｓ９（図２Ｃ及び図２Ｄ）の編集効率を表示するグラフを例示する。編集効率は、Ｓｙｎｔｈｅｇｏ　ＩＣＥ又はＴＩＤＥサンガー逆畳み込みソフトウェアを使用して決定された。図２Ａ：Ｊ７７４．２及びＮＩＨ３Ｔ３のＳｐｙＣａｓ９とともにガイドＲＮＡ４３～４６を使用したＩｌ１ａのノックアウト効率。Ｓｙｎｔｈｅｇｏ　ＩＣＥを使用して、サンガー配列トレースを逆畳み込みし、ノックアウト効率を決定した。図２Ｂ：Ｊ７７４．２及びＮＩＨ３Ｔ３のＳｐｙＣａｓ９とともにガイドＲＮＡ４７～５０を使用したＩｌ１ｂのノックアウト効率であり、いかなる特定の理論に縛られることを望まず、ｓｇＲＮＡ８に関するデータは、失敗した合成を示すように見える。Ｓｙｎｔｈｅｇｏ　ＩＣＥを使用して、サンガー配列トレースを逆畳み込みし、ノックアウト効率を決定した。図２Ｃ：Ｊ７７４．２及びＮＩＨ３Ｔ３におけるｓａＣａｓ９とともにガイドＲＮＡ５１～５３を使用したＩｌ１ａのノックアウト効率。ＴＩＤＥを使用して、サンガー配列トレースを逆畳み込みし、編集効率を決定した。図２Ｄ：Ｊ７７４．２及びＮＩＨ３Ｔ３におけるＳａｕ　Ｃａｓ９とともにガイドＲＮＡ５４～５６を使用したＩｌ１ｂのノックアウト効率。ＴＩＤＥを使用して、サンガー配列トレースを逆畳み込みし、編集効率を決定した。

【０４１０】

実施例３．マウス尿酸モデルにおけるＣＲＩＳＰＲ遺伝子操作によるＩＬ－１β発現を低減する。

最適な前処理時間を決定するための経時的実験

パイロット実験を実施して、マウスを尿酸に曝露させる前に、ウイルスを有するマウスの最適な前処理時間を決定する。マウスは、ＧＦＰ標識ＡＡＶ５ベクターを膝関節内に注射される。次いで、ウイルス量がＰＣＲによって定量化され、ウイルス感染の場所が、感染の３、５、及び７日後に組織学によって定量化される。ＩＬ－１ｂを標的とし、かつＩＬ－１ｂの発現をサイレンシング又は低減するように操作されたＣＲＩＳＰＲ　ＡＡＶベクターによるマウス尿酸モデルにおけるＩＬ－１ｂの低減をけって得する実験では、マウスへウイルスベクターを注射するための最適なリードタイムとして、関節内のウイルスの強固な発現が得られる処理時間が選択される。

【０４１１】

尿酸モデルにおけるｌＬ－１ｂ発現及び治療効果のＣＲＩＳＰＲ　ＡＡＶ（ＡＡＶ－ｓｐＣａｓ９）ノックダウンを確認するための実験

マウスが選択され、以下の３つの群に分けられる：
第１群：ＩＬ－１ｂを標的とし、かつＩＬ－１タンパク質の発現をサイレンシング又は低減するように操作されたＣＲＩＳＰＲ　ＡＡＶベクター（ＡＡＶ－ｓｐＣａｓ９）を注射されたマウス、
第２群：ＩＬ－１産生に影響を与えないことになる量で操作されたＣＲＩＳＰＲ　ＡＡＶベクターである、「スクランブル」ガイドＲＮＡ／Ｃａｓ９（ＡＡＶ－ｓｐＣａｓ９）を注射されたマウス、及び
第３群：生理食塩水を注射されたマウス。

【０４１２】

次いで、マウスは、最適な前処理時間の後に尿酸にチャレンジされる。尿酸の注射から２４時間以内に、動物を殺傷し、関節組織がサイトカイン発現について分析される（例えば、ＩＨＣによるＩＬ－１発現について評価される）。関節組織はまた、肉眼的組織病理、及び炎症のバイオマーカーの発現についても評価され得る。

【０４１３】

ＩＬ－１ｂを標的とし、かつＩＬ－１タンパク質の発現をサイレンシング又は低減するように操作されたＣＲＩＳＰＲ　ＡＡＶベクターで処理された第１群マウスは、ＩＨＣによるＩＬ－１の低減されたレベル、及び２つの他の群のうちのいずれかよりも低いレベルの炎症バイオマーカーを示すことになる。

【０４１４】

実施例４．マウスにおけるＡＡＶの関節内注射の経時的試験

オスのＣ５７ＢＬ／６マウスの関節にＡＡＶを注射することについて経時的に評価するために、試験を実施した。

【０４１５】

物質及び方法

試験物品の識別及び調製－ｅＧＦＰ　ＡＡＶＰｒｉｍｅ（商標）精製アデノ随伴ウイルス粒子：ＧＦＰタグ付きＡＡＶ５　ＧｅｎｅＣｏｐｏｅｉａ（商標）、カタログ番号ＡＢ２０１、ロット番号ＧＣ０８２２２Ｋ１９０２、１．１８×１０^{13}ゲノムコピー／ｍＬ）及びＡＡＶ６（ＧｅｎｅＣｏｐｏｅｉａ（商標）、カタログ番号ＡＢ４０１、ロット番号ＧＣ０９２４２Ｋ１９０５、５．４７×１０^{12}ゲノムコピー／ｍＬ）を我々が供給した。ＡＡＶ－粒子を、ドライアイスで出荷し、受領直後に－８０℃で保存した。投与直前に、ＡＡＶ粒子を、１０μＬ／膝のＩＡ投与のために、リン酸緩衝生理食塩水（カルシウム及びマグネシウムを含まないＰＢＳ：Ｃｏｒｎｉｎｇ、ロット番号１１４１９００５）中で再構築した。試験物品の調製、保管、及び取り扱いに関する追加の詳細は、試験プロトコル（付録Ａ）を参照されたい。

【０４１６】

試験システム識別－８～１０週齢のオスのＣ５７ＢＬ／６マウス（Ｎ＝３０）を、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（Ｂａｒ　Ｈａｒｂｏｒ、ＭＥ）から取得した。マウスが計量され、試験０日目の登録時に約２４～２９グラム（平均２６ｇ）であった。動物を、群及び動物番号を記す尾の付け根の別個のマークによって識別した。無作為化後、全てのケージを、プロトコル番号、群番号、及び動物番号を適切な色コードで標識化した（付録Ａ）。

【０４１７】

環境及び管理－到着時に、動物を、木製チップのベッド及び吊るされた飼料及び水ボトルを有するポリカーボネートケージに１ケージ当たり３～５匹で収容した。マウスを、フィルタートップを有するシューボックスケージ（静止空気流、約７０インチ２のフロア空間）又は個別に換気されたパイケージ（受動的気流、約７０～７５インチ２のフロア空間）のいずれかに収容した。部屋、ケージ、及び機器の衛生を含む動物ケアは、ｔｈｅ　Ｇｕｉｄｅ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　ｏｆ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌｓ（８ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ）．Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｕｎｃｉｌ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｗａｓｈｉ

ｎｇｔｏｎ，ＤＣ，２０１１に引用されたガイドラインに適合しており、これは、参照によりその全体が全ての目的のために本明細書に組み込まれる。

【０４１８】

試験で歩調を追う前に、動物を４日間馴化させた。試験のライブフェーズ中、主治医の獣医師が現場に居たか、又は待機していた。併用薬剤は投与しなかった。

【０４１９】

馴化及び試験期間中、動物を、１９℃～２５℃の範囲の温度及び３０％～７０％の相対湿度の実験室環境に収容した。自動タイマーで、１２時間の明るい状態及び１２時間の暗い状態を提供した。動物が、Ｅｎｖｉｇｏ　Ｔｅｋｌａｄ　８６４０の飼料及び新鮮な水道水を自由に摂取することを可能にした。

【０４２０】

実験設計－試験０日目に、マウスを体重によって処理群に無作為化した。無作為化後、動物は、表４に示されるように関節内（ＩＡ）注射によって投与された。動物体重を、セクション８．５．１に説明されるように測定した。マウスを、「死体解剖標本」と題されるセクションで以下に説明されるように、３つの時点（３、５、及び７日目）で死体解剖及び組織採取のために安楽死させた。

【表７】

表４．群及び治療情報

群	N	治療	投与レベル (粒子)	用量 体積	投与濃度 (粒子/ml)	用量 経路	レジメン
1	30	GFP タグ付き AAV5	5×10^{9}	10μL	$5\times10_{11}$/mL	IA(右膝)	1×(0 日目)
		GFP タグ付き AAV6	5×10^{9}	10μL	5×10^{11}/mL	IA(左膝)	1×(0 日目)

【０４２１】

観察、測定、及び標本

体重測定－マウスを、試験０日目に、また、１、３、５、及び７日目に再び無作為化のために計量した。体重の測定値は、表６に見出され得る。

【０４２２】

死体解剖標本－表５に示されるように、試験３、５、及び７日目にマウスを死体解剖した。

【表８】

表５．死体解剖スケジュール

群	動物番号	時点
1	1-10	3 日目
1	11-20	5 日目
1	21-30	7 日目

【０４２３】

死体解剖では、マウスを心臓穿刺を介して放血させ、その後、頸椎脱臼させた。左右の膝を全動物から採取した。関節包を無傷に保ちながら、皮膚及び筋肉を関節から除去した。関節を、マウス番号、採取日、及び右又は左脚のみで標識された１５ｍＬの円錐管で別々に急速冷凍した。膝関節を－８０℃で冷凍して発送のために保管した。

【０４２４】

動物の処分－動物の死体を、ＢＢＰ　ＳＯＰに従って処分した。

【０４２５】
検体及び未加工データの保存－標本（右及び左膝関節）、試験データ、及び報告書を、試験中又は試験完了時に送達した。
【０４２６】
試験の質及び完全性に対する逸脱の影響に関する声明－試験プロトコルからの逸脱は存在しなかった。
【０４２７】
結果／結論
試験０日目に、オスのＣ５７ＢＬ／６マウスは、ＧＦＰタグ付きＡＡＶ５のＩＡ注射（５×１０^{9}粒子、１０μＬ）を右膝に、ＧＦＰタグ付きＡＡＶ６のＩＡ注射（５×１０^{9}粒子、１０μＬ）を左膝に受けた。動物を、試験０、１、３、５、及び７日目に計量した。死体解剖は、試験３日目（動物１～１０）、５日目（動物１１～２０）、及び７日目（動物２１～３０）に実施され、右及び左膝関節を発送のために採取した。動物の計量、投与、及び生体試料採取を含む本研究のライブ部分を成功裏に完了した。全ての動物は、試験終了まで生存した。
【０４２８】
参考文献
Ｇｕｉｄｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ（８ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ）．Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｕｎｃｉｌ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ，２０１１、これは、参照によりその全体が全ての目的のために本明細書に組み込まれる。

【表９－１】

表６．体重及び用量計算データ（ＭＴＣ－ＵＣＭ－１）

治療群								
群1 C57Bl/6 IA, 1x (D0)	0日目	0日目	1日目		3日目			
	体重 (g)	投与体積 10 µl (ml)	体重 (g)	体重 %Δ ベースライン	体重 (g)	体重 %Δ ベースライン
1	26.68	0.01	26.53	-0.6%	26.22	-1.7%
2	27.65	0.01	27.55	-0.4%	26.54	-4.0%
3	28.64	0.01	27.97	-2.3%	28.57	-0.2%
4	28.13	0.01	27.60	-1.9%	27.63	-1.8%
5	26.18	0.01	26.07	-0.4%	25.87	-1.2%
6	26.38	0.01	26.02	-1.4%	26.30	-0.3%
7	29.13	0.01	29.11	-0.1%	28.83	-1.0%
8	24.22	0.01	23.90	-1.3%	23.51	-2.9%
9	25.40	0.01	24.97	-1.7%	24.49	-3.6%
10	24.85	0.01	24.21	-2.6%	23.86	-4.0%
11	27.76	0.01	27.26	-1.8%	28.02	0.9%
12	25.23	0.01	24.77	-1.8%	24.90	-1.3%
13	24.92	0.01	24.45	-1.9%	24.59	-1.3%
14	24.33	0.01	24.19	-0.6%	23.86	-1.9%
15	23.82	0.01	23.81	0.0%	23.26	-2.4%
16	24.83	0.01	24.39	-1.8%	24.15	-2.7%
17	25.94	0.01	25.93	0.0%	26.28	1.3%
18	27.21	0.01	27.44	0.8%	27.60	1.4%
19	25.61	0.01	25.17	-1.7%	25.22	-1.5%
20	27.81	0.01	27.26	-2.0%	26.99	-2.9%
21	26.63	0.01	26.63	0.0%	26.71	0.3%
22	26.96	0.01	27.40	1.6%	25.75	-4.5%
23	27.69	0.01	27.21	-1.7%	27.22	-1.7%
24	25.90	0.01	25.71	-0.7%	25.45	-1.7%
25	24.03	0.01	24.11	0.3%	23.40	-2.6%
26	27.60	0.01	26.67	-3.4%	27.00	-2.2%
27	27.87	0.01	27.59	-1.0%	27.22	-2.3%
28	24.43	0.01	24.25	-0.7%	24.14	-1.2%
29	26.75	0.01	26.02	-2.7%	26.46	-1.1%
30	25.93	0.01	25.99	0.2%	25.80	-0.5%
平均	**26.28**		**26.01**	**-1.0%**	**25.86**	**-1.6%**
SE	**0.27**		**0.27**	**0.2%**	**0.29**	**0.3%**

【表９－２】

表６（続き）．体重及び用量計算データ（ＭＴＣ－ＵＣＭ－１）

治療群							
		5日目		7日目		ベースラインからの体重の変化（g）
群1 C57Bl/6 IA, 1x (D0)		体重 (g)	体重 %Δ ベースライン	体重 (g)	体重 %Δ ベースライン	
1						-0.46
2						-1.11
3						-0.07
4						-0.50
5						-0.31
6						-0.08
7						-0.30
8						-0.71
9						-0.91
10						-0.99
11		28.62	3.1%			0.86
12		25.04	-0.8%			-0.19
13		24.94	0.1%			0.02
14		23.68	-2.7%			-0.65
15		23.71	-0.5%			-0.11
16		24.26	-2.3%			-0.57
17		26.15	0.8%			0.21
18		27.88	2.5%			0.67
19		25.64	0.1%			0.03
20		27.71	-0.4%			-0.10
21		26.44	-0.7%	26.70	0.3%	0.07
22		25.76	-4.5%	25.75	-4.5%	-1.21
23		27.53	-0.6%	27.33	-1.3%	-0.36
24		25.61	-1.1%	26.00	0.4%	0.10
25		23.76	-1.1%	24.10	0.3%	0.07
26		27.44	-0.6%	27.18	-1.5%	-0.42
27		27.09	-2.8%	27.30	-2.0%	-0.57
28		24.50	0.3%	24.76	1.4%	0.33
29		26.48	-1.0%	26.48	-1.0%	-0.27
30		25.73	-0.8%	25.89	-0.2%	-0.04
平均		**25.90**	**-0.6%**	**26.15**	**-0.8%**	**-0.25**
SE		**0.33**	**0.4%**	**0.34**	**0.5%**	**0.09**

【０４２９】

プロトコル

試験システム

動物数：３３（３０＋３の余分）

種／株又は育種：Ｃ５７ＢＬ／６

ベンダー：Ｊａｃｋｓｏｎ

到着時の年齢／体重：８～１０週齢（約２０グラム）

性別：オス

試験開始時の年齢／体重範囲：試験開始までに少なくとも９週間

馴化：ＢＢＰ到着後少なくとも３日間馴化させる

収容：３～５匹／ケージ

【表１０】

試験カレンダー

月曜日	火曜日	水曜日	木曜日	金曜日	土曜日	日曜日
１週目 -4 日目	１週目 -3 日目	１週目 -2 日目	１週目 -1 日目	１週目 ０日目	１週目 １日目	１週目 ２日目
到着時に動物を馴化のために群に分ける				計量及び無作為化 IA 注射	計量	
２週目 ３日目	２週目 ４日目	２週目 ５日目	２週目 ６日目	２週目 ７日目	２週目 ８日目	２週目 ９日目
計量、死体解剖動物 1~10		計量、死体解剖動物 11~20		計量、死体解剖動物 2130		

【０４３０】

物質

【表１１】

名称	供給者	Cat 番号*
イソフルラン	VetOne	502017
シリンジ及び針	BD	適宜
血清分離管(必要な場合)	Greiner Bio-One	#450472(Fisher 経由)
Li Hep Mini-Collect(必要な場合)	Greiner Bio-One	#450480(Fisher 経由)
EDTA Mini-Collect(必要な場合)	Greiner Bio-One	#450477(Fisher 経由)
K3EDTA(必要な場合)	Covidien	#8881311149(Fisher 経由)
K2EDTA Vacutainer(必要な場合)	BD	#367856(Fisher 経由)
Na Hep Vacutainer(必要な場合)	BD	#367871(Fisher 経由)
Li Hep Vacutainer(必要な場合)	BD	#367960(Fisher 経由)

【０４３１】

試験物品及びビヒクル情報

製剤化されていない試験物品保管条件－ＧＦＰタグ付きＡＡＶ５（第１群）：－８０Ｃ、ＧＦＰタグ付きＡＡＶ６（第１群）：－８０℃。

【０４３２】

ビヒクル情報－ＧＦＰタグ付きＡＡＶ５（第１群）：ＰＢＳ（ｗ／ｏ　Ｃａ及びＭｇ）、ＧＦＰタグ付きＡＡＶ６（第１群）：ＰＢＳ（ｗ／ｏ　Ｃａ及びＭｇ）。

【０４３３】

試験物品製剤の説明及び計算－ＧＦＰタグ付きＡＡＶ５（第１群）：ＰＢＳを使用して適切な濃度にストックを希釈する、ＧＦＰタグ付きＡＡＶ６（第１群）：ＰＢＳを使用して適切な濃度にストックを希釈する。

【０４３４】

投与製剤及びビヒクルの保管及び安定性－ＧＦＰタグ付きＡＡＶ５（第１群）：注射直前に希釈する、ＧＦＰタグ付きＡＡＶ６（第１群）：注射直前に希釈する。

【０４３５】

投与後の試験物品の処分－ＧＦＰタグ付きＡＡＶ５（第１群）：製剤を廃棄し、将来の試験のためにストック溶液を保持する、ＧＦＰタグ付きＡＡＶ６（第１群）：製剤を廃棄し、将来の試験のためにストック溶液を保持する。

【０４３６】

ライブフェーズ成果物
【表１２】

ライブフェーズデータ収集			
タイプ	試験日	群(An)	詳細
体重	0、1、3、5、7日目	全て (残り)	

【０４３７】
死体解剖情報
殺傷スケジュール：第１群Ａｎ１～１０：３日目
第１群Ａｎ１１～２０：５日目
第１群Ａｎ２１～３０：７日目
安楽死の方法：心臓穿刺による出血で放血させ、その後、頸椎脱臼させる。
時点：時間指定なし
【表１３】

死体解剖組織試料の採取:				
タイプ	Gr/An	詳細	保管条件	処分
右膝注射	全て	皮膚及び関節を無傷に維持している筋肉を除去する	急速冷凍 (15ml 円錐バイアル*)	発送
左膝注射	全て	皮膚及び関節を無傷に維持している筋肉を除去する	急速冷凍 (15ml 円錐バイアル*)	発送

＊管をマウス番号、採取日、及び左又は右脚のみで標識付けする。試料は、それらがＡＡＶ－２又はＡＡＶ－５注射であるか否かを参照せずに試験されることになる。キーはＰＣＲ完了後のみ提供されることになる。

【０４３８】
試料分析
組織標本－ＡＡＶ注射マウス由来の後肢を瞬間凍結し、発送した。到着時に、標本を保管のために－８０℃の冷凍庫に移した。
【０４３９】
標的組織におけるＧＦＰ発現－後肢（対）を室温で解凍し、ＩＶＩＳ生物発光撮像システム（Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩＩ、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）で撮像した。ＧＦＰ蛍光を、４８８ｎｍにおける励起及び５１０ｎｍにおける放射の測定を使用して定量化した。合計４匹のマウスを各時点で評価した（３日、５日、及び７日）。各時点で残りの６匹の動物からの組織を、リアルタイムＰＣＲを使用してウイルス量のその後の確認のために保持した。
【０４４０】
結果－図３に見られるように、注射された膝関節内で高レベルのＧＦＰの発現が注射後３日目に存在した。ウイルス量は、５日目にわずかに減少し、その後、７日目まで再び上昇した。このパイロット試験における限定されたサンプルサイズにより、ＡＡＶ－５及びＡＡＶ－６の挙動の間に有意差はなかった。
【０４４１】
考察－本試験からのデータは、マウス膝関節へのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９の関節内送達のためのＡＡＶ－５又はＡＡＶ－６のいずれかの使用を支持する。両方のウイルス血清型のレベルは、５～７日に上昇し、追跡期間が２週間又は３週間まで延長された場合、更に上昇する可能性が残された。これを確認するために追加の研究が必要となるが、これまでのデータは、ベクターの注射、及び関節内のモノヨードアセテート（ＭＩＡ）結晶による

チャレンジ前に少なくとも１週間の間隔が存在するべきであることを示唆するものとなる。

【０４４２】

背景及び根拠－モノヨードアセテート（ＭＩＡ）誘発性ＯＡモデルが、２つの理由でこの研究で使用される。第１に、自然（自然発生）ＯＡは、マウスでは極めて稀であるのに対し、ＭＩＡの注射は、結果として、比較的早く発症し、予測可能であり、かつ関節内炎症、疼痛、及び軟骨変性を含む、ヒトＯＡ患者で見られる疾患表現型と良好な臨床相関を提供する、ＯＡの誘発性モデルをもたらす。第２に、内側半月板（ＤＭＭ）の不安定化及び前十字靭帯離断（ＡＣＬＴ）などの外科的モデルとは対照的に、ＭＩＡモデルは、関節包の外科的切開を伴わず、ＯＡを有するヒト患者の関節包にはるかに関連させる。

【０４４３】

げっ歯類におけるＭＩＡ結晶の注射は、挙動試験及び客観的遅延評価などの技術によって分析及び定量化され得るＯＡ様病変及び機能障害を再現する。ＭＩＡは、グリセルアルデヒド－３－ホスファターゼの阻害剤であり、結果として生じる細胞解糖の改変は、最終的に、軟骨細胞を含む関節内の細胞の死を引き起こす。軟骨細胞死は、軟骨変性及びプロテオグリカン染色の改変として現れる。ＭＩＡを注射されたマウスは、通常、７２時間以内に疼痛様挙動、及び注射後約４週までに軟骨の喪失を呈する。ＩＬ－１発現の増加は、ラット及びマウスにおける注射から２～３日以内に実証されている。

【０４４４】

試験設計－マウスは、ＭＩＡ又は生理食塩水ビヒクル対照のいずれかを片側のみに注射される（動物当たり１つの関節）。各群内で、動物の半分をマウスＩＬ－１ベータ遺伝子を標的とするＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ベクターで前処理し、残りの半分にＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９スクランブル対照を注射する。両群の動物は、２つの時点のうち１つの時点で試験から外される：滑液中のＩＬ－１のレベルに対する療法の影響の評価を可能にするために４８時間のより早い時点、及び軟骨破壊及び変形性関節炎の組織学的証拠に対する治療の影響の評価を可能にするために４週間のより後の時点。

【０４４５】

方法

実験動物－この研究では、合計８０匹のマウスが使用される。実験手順は、現地のＩＡＣＵＣによってレビューされ、承認される。マウスは、マイクロアイソレーターケージに収容され、標準的な実験動物飼料を与えられ、水の自由な利用を可能にされている。

【０４４６】

ＭＩＡモデル及びＡｎｔｉ－ＩＬ１療法－マウスは、試験前の７日間で馴化される。試験の初日に、マウスを、酸素中のイソフルランの吸入混合物で麻酔する。外科手術面の麻酔が確認されると、右後肢を切り取り、外科用消毒液を用いて皮膚を擦り洗いする。４０匹のマウス（処理された）は、ＩＬ－１を標的とするＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ベクターの関節内注射を受け、残りの４０匹の動物（対照）は、ＡＡＶ－ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９スクランブル対照を関節内注射される。７日後、各群の動物の半数がＭＩＡを同じ関節に注射され、半数が生理食塩水ビヒクルを注射される。これは、４つの試験群の確立につながる：

第１群：処置されたＭＩＡ（２０匹のマウス）
第２群：対照ＭＩＡ（２０匹のマウス）
第３群：処置されたビヒクル（２０匹のマウス）
第４群：対照ビヒクル（２０匹のマウス）

【０４４７】

１群当たり１０匹のマウスを、膝関節のＩＬ－１レベルを記録するために、ＭＩＡチャレンジの４８時間後に安楽死させる。残りの動物は、疼痛挙動（ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ試験を含む挙動試験）、跛行（四肢使用）、関節腫脹（キャリパー測定）、及び関節病理（病理組織学）に対する療法の効果を評価するために、４週間収容されることになる。

【０４４８】

安楽死及び組織採取－マウスは、放血、その後の頸椎脱臼によって殺傷される。。関節は、開腹され、ＩＬ－１測定のために洗浄される（４８時間群）か、又は脱石灰組織病理のために１０％のホルマリン中で浸漬固定される（４週間群）。

【０４４９】

実施例５．マウスにおけるＭＳＵ結晶誘発性関節炎のＡＡＶ－６及びＡＡＶ－５媒介ＣＲＩＳＰＲ治療の有効性

導入及び目的

これらの研究の目的は、尿酸一ナトリウム（ＭＳＵ）結晶誘発性のインターロイキン１Ｊ３（ＩＬ－１Ｊ３）の放出によって誘発される炎症を阻害する化合物／タンパク質を識別することである。これは、様々なタイプの抗炎症剤、特に、ＩＬ－１又はＩＬ１Ｒ１を遮断するインターロイキン受容体拮抗薬又は抗体のようなＩＬ－１経路遮断薬の抗炎症活性を識別する、単純なプレスクリーニングである（Ｔｏｒｒｅｓ Ｒ，ｅｔ ａｌ．Ｈｙｐｅｒａｌｇｅｓｉａ，ｓｙｎｏｖｉｔｉｓ ａｎｄ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｂｉｏｍａｒｋｅｒｓ ｏｆ ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ ａｒｅ ｓｕｐｐｒｅｓｓｅｄ ｂｙ ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ １ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｉｎ ａ ｎｏｖｅｌ ａｎｉｍａｌ ｍｏｄｅｌ ｏｆ ｇｏｕｔｙ ａｒｔｈｒｉｔｉｓ．Ａｎｎ Ｒｈｅｙｍ Ｄｉｓ．２００９；６８（１０）：１６０２－１６０８、これは、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。痛風は、炎症性関節炎の最も一般的な形態であり、世界中で有病率が増加している（Ｒｏｄｄｙ Ｅ ａｎｄ Ｄｏｈｅｒｔｙ Ｍ．Ｅｐｉｄｅｍｉｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｇｏｕｔ．Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ＆Ｔｈｅｒａｐｙ．２０１０；１２（６）：２２３、これは、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。痛風関節炎は、関節内及び関節周囲の血清尿酸濃度の上昇及び尿酸一ナトリウム結晶（ＭＳＵ）の沈着によって特徴付けられ、腫脹した関節及び重度の疼痛につながる（Ｓａｂｉｎａ ＥＰ，Ｃｈａｎｄｅｌ Ｓ，ａｎｄ Ｒａｓｏｏｌ ＭＫ．Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ｍｏｎｏｓｏｄｉｕｍ ｕｒａｔｅ ｃｒｙｓｔａｌ－ｉｎｄｕｃｅｄ ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ ｂｙ ｗｉｔｈａｆｅｒｉｎ Ａ．Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔ Ｓｃｉ．２００８；１１（４）：４６－５５、これは、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。現在の治療としては、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、ステロイド、又はコルヒチンが挙げられる。一部の患者について、これらの治療は、痛風の治療に有効ではないか、又は有害な副作用を有する可能性がある（Ｓａｂｉｎａ，２００８；Ｇｅｔｔｉｎｇ ＳＪ，ｅｔ ａｌ．Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｅｌａｎｏｃｏｒｔｉｎ ｔｙｐｅ ３ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｓ ａ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｍｅｃｈａｎｉｓｍ ｆｏｒ ａｄｒｅｎｏｃｏｒｔｉｃｏｔｒｏｐｉｃ ｈｏｒｍｏｎｅ ｅｆｆｉｃａｃｙ ｉｎ ｇｏｕｔｙ ａｒｔｈｒｉｔｉｓ．Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ＆Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ．２００２；４６（１０）：２７６５－２７７５、これは、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。ＭＳＵ誘発性炎症モデルは、全身性関節炎及びより複雑なＩＬ－１駆動性疾患などの、より複雑な疾患プロセスで活性を有し得る化合物を識別するための、良好で単純なスクリーニングツールを提供する。

【０４５０】

マウスにおける尿酸一ナトリウム（ＭＳＵ）結晶誘発性炎症のアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介ＣＲＩＳＰＲ療法の有効性を評価するために試験を実施した。試験０日目、オスのＣ５７ＢＬ／６マウスは、プラセボ対照（希釈剤、リン酸緩衝生理食塩水［ＰＢＳ］）、ＡＡＶ－６の２つのバリアントの混合物（一方はガイドＲＮＡ１を担持し、他方はガイドＲＮＡ２を担持する、５×１０９ウイルスゲノム［ｖｇ］コピー／ｍＬ）、ＡＡＶ－５の２つのバリアントの混合物（ガイド１＋ガイド２、５×１０９ｖｇ／ｍＬ）、スクランブルＡＡＶ－６対照（非標的化ガイドＲＮＡを担持する、１×１０１０ｖｇ／ｍＬ）、又はスクランブルＡＡＶ－５対照（１×１０１０ｖｇ／ｍＬ）の単一（１×）関節内（ＩＡ）注射を右膝に投与された。試験７日目、マウスは、ＭＳＵ結晶（２５ｍｇ／ｍＬ：１０ｕＬのＰＢＳ中２５０μｇ）を右膝（治療と同じ関節）に注射された。マウスを、試験

７日目のＭＳＵ注射の約６時間後に死体解剖のために安楽死させた。有効性評価は、動物の体重、ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ検査、及び膝キャリパーの測定値に基づいた。

【０４５１】

ＡＡＶ－６（ガイド１＋２：５×１０９ｖｇ／ガイド／膝）でＩＡ処理されたマウス（０日目に１回）は、ＡＡＶ－５スクランブルベクターをＩＡ投与されたマウスと比較して、７日目にＭＳＵ注射後６時間で、ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ試験によって測定された関連痛の統計的に有意な低減（ｐ＝０．０２５）を示し、ＡＡＶ－６スクランブルベクター及びＰＢＳ対照群（それぞれ、ｐ＝０．０５１及びｐ＝０．０７５）と比較してほぼ有意である結果を示した。ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ評価に対する曲線下面積（ＡＵＣ）計算は、群間で統計的に異なっていなかった。動物の体重増加及び膝の腫脹は、群間で統計的に異なっていなかった（表７）。全ての動物は、試験終了まで生存した。

【表１４】

表７．データの概要

治療群		von Frey 絶対閾値　ベースライン AUC からの AUC(-1 日目~7 日目)- 右足	膝キャリパー変化(-1 日目 ~7 日目)-右膝
1	AAV-6 スクランブルベクター(1×10^{10}粒子/膝)、IA、1×(d0)	5.92(0.39)	0.02(0.01)
2	AAV-6 ガイド 1+2(5×10^{9}の各ガイド/膝)、IA、1×(d0)	6.01(0.36)	0.01(0.01)
3	PBS、IA(d0)	6.12(0.33)	0.02(0.01)
4	AAV-5 スクランブルベクター(1×10^{10}粒子/膝)、IA、1×(d0)	5.09(0.31)	0.02(0.01)
5	AAV-5 ガイド 1+2(5×10^{9}の各ガイド/膝)、IA、1×(d0)	5.73(0.39)	0.02(0.01)

値は、群平均及び標準誤差（ＳＥ）を表す。

ＰＢＳ＝リン酸緩衝生理食塩水対照、ＡＡＶ＝アデノ随伴ウイルス、ＡＵＣ＝曲線下面積

＊ｐ＜０．０５　ＡＮＯＶＡ（テューキーの事後検定）対ＡＡＶ－６ガイド１

†ｐ＜０．０５　ＡＮＯＶＡ（テューキーの事後検定）対ＰＢＳ

‡ｐ＜０．０５　ＡＮＯＶＡ（テューキーの事後検定）対ＡＡＶ－５スクランブルベクター

§ｐ＜０．０５　ＡＮＯＶＡ（テューキーの事後検定）対ＡＡＶ－５ガイド１

【０４５２】

臨床転帰の概要－経時的に群間で有意差は観察されなかった。ウイルス注射がビヒクル群に見られるものよりも大きい応答を誘発した臨床的証拠はない。ウイルス注射が関節腫脹に対するＭＳＵの効果を改変したという臨床的証拠はない。ＭＳＵ誘発性炎症におけるＩＬ－１の具体的な役割は不明であり、そのため、臨床効果の欠如は、予想外ではない可能性がある。

【０４５３】

ｑＰＣＲの概要－ｑＰＣＲデータは、ＡＡＶ－６又はＡＡＶ－５を用いたＣＲＩＳＰＲ編集が、ＩＬ－１βｍＲＮＡ発現を正常レベルに復元するのに有効であることを裏付ける。統計的有意性は、試料サイズを考慮すると実証することが困難である。この効果の確認は、滑膜組織のＩＨＣ分析を通して得られ得る。

【０４５４】
規制遵守
本試験は、試験施設の標準業務手順書（ＳＯＰ）、世界保健機関の基礎生物医学研究における品質管理ガイドライン、並びにＵＳＤＡ Ａｎｉｍａｌ Ｗｅｌｆａｒｅ Ａｃｔ ９ ＣＦＲ Ｐａｒｔｓ １－３．Ｆｅｄｅｒａｌ Ｒｅｇｉｓｔｅｒ ３９１２９，Ｊｕｌｙ ２２，１９９３を含む全ての州及び連邦規制を遵守して実施された。
【０４５５】
施設内の動物のケア及び使用
本試験は、Ｔｈｅ Ｇｕｉｄｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ＆Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ（８^{ｔｈ} Ｅｄｉｔｉｏｎ）に従って実施された。本試験で使用した動物について、許容可能な代替的な試験システムが識別されなかった。
【０４５６】
物質及び方法
試験物品の識別及び調製
ＡＡＶベクターを、凍結アリコート中のウイルス粒子懸濁液（＞５×１０^{１２}ウイルスゲノム［ｖｇ］コピー／ｍＬ）として予め製剤化した。アリコートを－８０℃で保管し、使用直前に希釈剤（滅菌濾過ＰＢＳ［Ｃｏｒｎｉｎｇ、ロット番号０１４２０００７］）中で再構築した。標準的なバイオセーフティレベル２（ＢＳＬ－２）の取り扱いが、注射前にＡＡＶベクターを取り扱う人員によって使用された。ＡＡＶスクランブル対照を滅菌ＰＢＳ中で調製して、ＩＡ注射用の１×１０^{１２}ｖｇ／ｍＬを１０μＬ／膝で含有するワーキングストックを形成して、１×１０^{１０}ｖｇのスクランブル対照を膝関節に送達した。活性ＡＡＶベクターを、２つの活性ＡＡＶ－５又はＡＡＶ－６構築物の各々を滅菌ＰＢＳと均等に混合して、２つのガイドの各々に対して５×１０^{１１}ｖｇ／ｍＬを含有するワーキングストックを形成することによって調製した。活性ＡＡＶ製剤を、１０μＬ／膝でＩＡ注射し、５×１０^{９}ｖｇの２つのガイドの各々を膝関節に送達した。試験物品の調製、保管、及び取り扱いに関する更なる詳細は、試験プロトコル（付録Ｂ）を参照されたい。
【０４５７】
ＡＡＶベクターを以下のように識別した：
【表１５】

AAVPrimeTM アデノ随伴ウイルス-sgRNA 用血清型 6(AAV-6)粒子(GeneCopoeia(商標)、カタログ番号 AA06-MCP001682-AD01-2-200-a、ロット番号 GC03182K2001)
AAVPrimeTM アデノ随伴ウイルス-sgRNA 用血清型 6(AAV-6)粒子(GeneCopoeia(商標)、カタログ番号 AA06-MCP001682-AD01-2-200-b、ロット番号 GC03202K2001)
AAVPrimeTM アデノ随伴ウイルス-sgRNA 用血清型 6(AAV-6)粒子(GeneCopoeia(商標)、カタログ番号 AA06-CCPCTR01-AD01-200、ロット番号 GC03112K2002)
AAVPrimeTM アデノ随伴ウイルス-sgRNA 用血清型 5(AAV-5)粒子(GeneCopoeia(商標)、カタログ番号 AA05-MCP001682-AD01-2-200A、ロット番号 GC-03182K2002)
AAVPrimeTM アデノ随伴ウイルス-sgRNA 用血清型 5(AAV-5)粒子(GeneCopoeia(商標)、カタログ番号 AA05-MCP001682-AD01-2-200B、ロット番号 GC03182K2003)
AAVPrimeTM アデノ随伴ウイルス-sgRNA 用血清型 5(AAV-5)粒子(GeneCopoeia(商標)、カタログ番号 AA05-CCPCTR01-AD01-200、ロット番号 GC03032K2003)

【０４５８】
尿酸一ナトリウム（ＭＳＵ）結晶を、Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ（カタログ番号Ｔｌｒｌ－２５－ＭＳＵ、ロット番号ＭＳＵ－４２－０１）から取得した。ＭＳＵ結晶を、プラスチック管内でＰＢＳ（Ｃａ又はＭｇなし：Ｃｏｒｎｉｎｇ、カタログ番号２１－０３１－ＣＶ、ロット番号３１７１９００３）中、２５ｍｇ／ｍＬで調製し、約１分間ボルテックスし、約１５～２０分間超音波処理し、その後、ピペット操作及び使用前にボルテックスした

。

【０４５９】

試験システム

【表１６】

動物数:	75(70+5 の余分)
種/株又は育種:	C57BL/6
ベンダー:	Jackson
到着時の年齢/体重:	8~10 週齢(約 20 グラム)
性別:	オス
試験開始時の年齢/体重範囲:	試験開始までに少なくとも 9 週間
馴化:	BBP 到着後少なくとも 3 日間馴化させる
収容:	3~5 匹/ケージ

【０４６０】

８～１０週齢のオスのＣ５７ＢＬ／６マウス（Ｎ＝７０＋４の余分）を、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（Ｂａｒ Ｈａｒｂｏｒ、ＭＥ）から取得した。マウスが計量され、試験－１日目の登録時に約２０～２９グラム（平均およそ２５ｇ）であった。

【０４６１】

動物を、動物番号を記す尾の付け根の色コード付きドットによって識別した。登録後、全てのケージを、プロトコル番号、群番号、及び動物番号で標識化した。

【０４６２】

環境及び管理

到着時に、動物を、トウモロコシの穂軸のベッド及び吊るされた飼料及び水ボトルを有するポリカーボネートケージに１ケージ当たり３～５匹で収容した。マウスを、個別に換気されたパイケージ（受動的気流、約０．０４５～０．０４８ｍ２のフロア空間）に収容した。部屋、ケージ、及び機器の衛生を含む動物ケアは、ｔｈｅ Ｇｕｉｄｅ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ ｏｆ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ａｎｉｍａｌｓ（Ｇｕｉｄｅ，２０１１）及び適用可能なＢＢＰ ＳＯＰに引用されたガイドラインに適合した。

【０４６３】

試験で歩調を追う前に、動物を９日間馴化させた。試験のライブフェーズ中、主治医の獣医師が現場に居たか、又は待機していた。併用薬剤は投与しなかった。

【０４６４】

馴化及び試験期間中、動物を、１９℃～２５℃の範囲の温度及び３０％～７０％の相対湿度の実験室環境に収容した。自動タイマーで、１２時間の明るい状態及び１２時間の暗い状態を提供した。動物が、Ｅｎｖｉｇｏ Ｔｅｋｌａｄ ８６４０の飼料及び新鮮な水道水を自由に摂取することを可能にした。

【０４６５】

試験設計

試験－１日目、動物を体重によって治療群に無作為化し、膝の毛を剃り、ベースラインの膝キャリパー測定を行った。試験０日目、動物に、表８に示されるように治療薬を投与した（右膝へのＩＡ）。試験７日目、動物に、右膝（治療と同じ膝）へのＭＳＵ結晶（合計で１０μＬ、２５０μｇのＭＳＵ）のＩＡ注射を行った。体重測定を、説明されたように行った。関連通を、説明されるように、５つの時点でｖｏｎ Ｆｒｅｙ試験によって測定した。右膝のキャリパー測定を、説明されるように、５つの時点で行った。動物を、説明されるように、７日目の最終挙動試験後に死体解剖のために安楽死させた。

【表１７】

表８．群及び治療情報

群	N	MSU	治療	投与レベル（粒子／膝）	投与体積	投与濃度（粒子／ｍＬ）	投与経路	レジメン
1	14	はい	ＡＡＶ－６スクランブルベクター	$1x10^{10}$	10 μL	$1x10^{12}$	IA （右膝）	１×（０日目）
2	14	はい	ＡＡＶ－６ガイド１＋２	５×１０^{9}（の各ガイド）	10 μL	$1x10^{12}$	IA （右膝）	１×（０日目）
3	14	はい	PBS	--	10 μL	--	IA （右膝）	１×（０日目）
4	14	はい	ＡＡＶ－５スクランブルベクター	$1x10^{10}$	10 μL	$1x10^{12}$	IA （右膝）	１×（０日目）
5	14	はい	ＡＡＶ－５ガイド１＋２	５×１０^{9}（の各ガイド）	10 μL	$1x10^{12}$	IA （右膝）	１×（０日目）

【０４６６】

疾患誘発

ＭＳＵ結晶を、滅菌ＰＢＳ中、２５ｍｇ／ｍＬの濃度で調製した。結晶を可溶化して、使用前に注射調製物を慎重に混合した。１０ｕＬのＭＳＵ結晶溶液を右膝関節に注射した。

【表１８】

製剤化されていないMSU保管条件:室温、光から保護
ビヒクル:PBS
投与経路:右膝へのIA
投与体積:10uL/膝
MSU製剤の説明及び計算:0.01ml/膝×75匹=必要最小限の0.72mlの25mg/mlのMSU
MSUの保管及び安定性:ガラスに保管される。投与直前に調製される。注射前にボルテックスされる。
投与後のMSUの処分:製剤は、投与後に廃棄される。製剤化されていないストックは、保持される。

【０４６７】

体重測定及びライブフェーズサンプリング

マウスを、試験－１日目（注射前）に無作為化のために計量し、体重を試験２及び６日目に再び測定した。動物の体重の測定値は、表９に見出され得る。

【表１９－１】

表9．体重及び用量計算データ（MGA－UCM－2）

治療群		−1日目	0日目	2日目			6日目		−1～6日目の体重変化
群1 AAV－6スクランブルベクター（1×10^13 vg/kg）		体重 (g)	投与体積 10 µl (ml)	体重 (g)	体重 %ベースライン からの%Δ		体重 (g)	体重 %ベースライン からの%Δ	
IA, 1x (D0)	1	25.99	0.01	24.19	-6.9%		24.67	-5.1%	-1
	2	25.00	0.01	24.64	-1.4%		25.32	1.3%	0
	3	23.50	0.01	24.61	4.7%		24.95	6.2%	1
	4	23.92	0.01	23.14	-3.3%		23.81	-0.5%	0
	5	23.30	0.01	23.14	-0.7%		23.78	2.1%	0
	6	23.04	0.01	23.97	4.0%		24.51	6.4%	1
	7	27.44	0.01	28.10	2.4%		27.90	1.7%	0
	8	22.79	0.01	22.83	0.2%		23.59	3.5%	1
	9	24.80	0.01	24.74	-0.2%		25.71	3.7%	1
	10	27.46	0.01	27.97	1.9%		28.66	4.4%	1
	11	26.50	0.01	26.57	0.3%		26.88	1.4%	0
	12	26.51	0.01	26.48	-0.1%		27.78	4.8%	1
	13	22.80	0.01	23.38	2.5%		23.77	4.3%	1
	14	24.77	0.01	24.60	-0.7%		24.90	0.5%	0
	合分	21.95	0.01	22.56	2.8%		23.34	6.3%	1
平均		**24.84**		**24.88**	**0.19%**		**25.4**	**2.47%**	**0.6**
SE		**0.45**		**0.5**	**0.80%**		**0.5**	**0.80%**	**0.2**
ANOVA（テューキーの事後検定）対第2群									**0.684**
ANOVA（テューキーの事後検定）対第3群									**0.243**
ANOVA（テューキーの事後検定）対第4群									**0.212**
ANOVA（テューキーの事後検定）対第5群									**0.543**

群2 AAV－6ガイド1＋2（5×10^13 vg/kgの各ガイド／計）		−1日目	−1日目	2日目			6日目		−1～6日目の体重変化
		体重 (g)	投与体積 10 µl (ml)	体重 (g)	体重 %ベースライン		体重 (g)	体重 %ベースライン	
IA, 1x (D0)	1	22.56	0.01	22.47	-0.4%		22.92	1.6%	0
	2	28.49	0.01	29.00	1.8%		29.08	2.1%	1
	3	24.65	0.01	24.65	0.0%		25.06	1.7%	0
	4	23.63	0.01	23.29	-1.4%		24.05	1.8%	0
	5	22.78	0.01	23.19	1.8%		24.14	6.0%	1
	6	27.32	0.01	27.60	1.0%		28.54	4.5%	1
	7	26.83	0.01	27.49	2.5%		28.00	4.4%	1
	8	26.96	0.01	26.84	-0.4%		28.70	6.5%	2
	9	22.80	0.01	22.88	0.4%		23.66	3.8%	1
	10	22.45	0.01	23.12	3.0%		23.86	6.3%	1
	11	24.83	0.01	24.53	-1.2%		25.42	2.4%	1
	12	25.80	0.01	26.11	1.2%		26.56	2.9%	1
	13	25.30	0.01	25.59	1.1%		26.14	3.3%	1
	14	23.45	0.01	23.88	1.8%		24.14	2.9%	1
	合分	25.84	0.01	26.43	2.3%		26.29	1.7%	0
平均		**24.85**		**25.05**	**0.79%**		**25.7**	**3.57%**	**0.9**
SE		**0.53**		**0.56**	**0.36%**		**0.6**	**0.46%**	**0.1**
ANOVA（テューキーの事後検定）対第3群									**0.940**
ANOVA（テューキーの事後検定）対第4群									**0.919**
ANOVA（テューキーの事後検定）対第5群									**0.999**

【表１９－２】

表９（続き）．体重及び用量計算データ（ＭＧＡ－ＵＣＭ－２

群番号							
群 3 PBS IA, 1x (D0)	−1日目	−1日目	2日目		6日目		−1～6日目の体重変化
	体重 (g)	投与体積 10 µl (nl)	体重 (g)	体重 %ベースライン	体重 (g)	体重 %ベースライン	
1	27.14	0.01	28.19	3.9%	29.19	7.6%	2
2	25.35	0.01	25.11	-0.9%	26.38	4.1%	1
3	24.72	0.01	25.03	1.3%	25.41	2.8%	1
4	28.53	0.01	29.04	1.8%	29.62	3.8%	1
5	25.50	0.01	25.99	1.9%	26.16	2.6%	1
6	25.23	0.01	25.30	0.3%	26.00	3.1%	1
7	25.45	0.01	25.81	1.4%	26.42	3.8%	1
8	25.80	0.01	26.48	2.6%	26.83	4.0%	1
9	24.77	0.01	25.33	2.3%	26.24	5.9%	1
10	19.83	0.01	20.15	1.6%	21.23	7.1%	1
11	25.66	0.01	26.30	2.5%	27.14	5.8%	1
12	24.27	0.01	24.58	1.3%	25.02	3.1%	1
13	20.05	0.01	20.91	4.3%	21.23	5.9%	1
14	24.74	0.01	24.88	0.6%	24.92	0.7%	0
平均 SE ANOVA（テューキーの事後検定）対第4 ANOVA（テューキーの事後検定）対第5	**24.79** **0.62**		**25.22** **0.63**	**1.77%** **0.36%**	**25.8** **0.6**	**4.30%** **0.51%**	**1.1** **0.1** **>0.9999** **0.983**
群 4 AAV−[illegible]（1×10 [illegible]） IA, 1x (D0)	−1日目	−1日目	2日目		6日目		−1～6日目の体重変化
	体重 (g)	投与体積 10 µl (nl)	体重 (g)	体重 %ベースライン	体重 (g)	体重 %ベースライン	
1	25.00	0.01	25.68	2.7%	26.51	6.0%	2
2	28.90	0.01	29.66	2.6%	30.89	6.9%	2
3	25.37	0.01	25.41	0.2%	25.52	0.6%	0
4	23.46	0.01	23.93	2.0%	24.73	5.4%	1
5	24.96	0.01	25.37	1.6%	26.16	4.8%	1
6	26.95	0.01	27.27	1.2%	27.89	3.5%	1
7	24.99	0.01	25.07	0.3%	25.63	2.6%	1
8	24.52	0.01	24.60	0.3%	25.38	3.5%	1
9	24.66	0.01	27.09	9.9%	27.21	10.3%	3
10	24.62	0.01	26.06	5.8%	26.11	6.1%	1
11	23.73	0.01	24.06	1.4%	23.88	0.6%	0
12	23.43	0.01	24.04	2.6%	24.88	6.2%	1
13	22.63	0.01	22.60	-0.1%	23.08	2.0%	0
14	25.50	0.01	25.66	0.6%	25.82	1.3%	0
[illegible]	26.25	0.01	26.58	1.3%	26.28	0.1%	0
平均 SE ANOVA（テューキーの事後検定）対第5	**24.91** **0.42**		**25.46** **0.47**	**2.23%** **0.72%**	**26.0** **0.5**	**4.27%** **0.74%**	**1.1** **0.2** **0.973**
群 5 AAV−[illegible]（5×10 [illegible]）	−1日目	−1日目	2日目		6日目		−1～6日目の体重変化
IA, 1x (D0)	体重 (g)	投与体積 10 µl (nl)	体重 (g)	体重 %ベースライン	体重 (g)	体重 %ベースライン	
1	25.57	0.01	26.47	3.5%	26.21	2.5%	1
2	23.68	0.01	23.37	-1.3%	24.18	2.1%	1
3	24.28	0.01	24.42	0.6%	24.71	1.8%	0
4	23.09	0.01	23.31	1.0%	24.18	4.7%	1
5	24.52	0.01	25.34	3.3%	24.97	1.8%	0
6	25.90	0.01	26.60	2.7%	27.25	5.2%	1
7	25.92	0.01	26.08	0.6%	26.28	1.4%	0
8	25.32	0.01	25.48	0.6%	26.49	4.6%	1
9	25.99	0.01	27.51	5.8%	27.39	5.4%	1
10	27.50	0.01	27.63	0.5%	28.82	4.8%	1
11	24.69	0.01	25.54	3.4%	25.86	4.7%	1
12	24.15	0.01	24.97	3.4%	26.01	7.7%	2
13	22.60	0.01	22.99	1.7%	22.99	1.7%	0
14	23.96	0.01	24.32	1.5%	24.93	4.0%	1
[illegible]	24.78	0.01	25.36	2.3%	26.21	5.8%	1
平均 SE	**24.80** **0.35**		**25.29** **0.40**	**1.96%** **0.49%**	**25.7** **0.4**	**3.75%** **0.50%**	**0.9** **0.1**

【０４６８】

Ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ法

Ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ分析を、５つの時点、ベースライン（－１日目）、投与後６時間（０日目）、投与後２４時間（１日目）、ＭＳＵ注射前（０時間、７日目）、及びＭＳＵ注射後６時間（７日目）で、右後足に対して実施した。群を、ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ試験中に研究者に対して盲検化した。

【０４６９】

ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ法は、足への較正されたフィラメント（Ｂｉｏｓｅｂ、Ｖｉｔｒｏｌｌｅｓ、Ｆｒａｎｃｅ）の適用に対する動物の応答に基づいて、機械的アロディニア（通常は疼痛を誘発しない刺激に起因する疼痛）を評価する。フィラメントは、ミリグラム×１０の力のｌｏｇ１０を表す数によって識別される。動物は、ベースライン評価の前に３回（４５～６０分）、試験ラックに馴化される。試験するとき、ｖｏｎ　Ｆｒｅｙの毛を後足の表面上に置き、毛が顕著に曲がるまで滑らかに押し、毛は、６秒間、後足に押し付けられる。応答は、０（応答なし）又は１（応答）のいずれかとして記録される。応答は、後足を毛から離れるように持ち上げる、脚を離して揺らす、毛から離れて歩くなどとして定義される。開始毛は、３．２２であり、動物が応答した場合、試験器が２．８３に下降し、３．２２の毛に応答がない場合、試験器が３．６１に上昇し、試験器は、応答に基

づいて毛を試験し続け、必要に応じて上下に動く。毛の増分は、以下のとおりである。１．６５、２．３６、２．４４、２．８３、３．２２、３．６１、３．８４、４．０８、４．１７。各足は、５回試験され、最終フィラメントに到達するまで毛の間で上下に動く。データがスプレッドシートに入力され、応答速度を足の引き出し閾値に変換するために使用される。試験の結果は、式１０（ｘ＋ｙｚ）／１００００を使用して、グラム単位で絶対閾値（５０％応答速度）に変換され、式中、ｘは、最終試験されたフィラメントの対数単位値に等しく、ｙは、小さい試料に対するＤｉｘｏｎの昇降法（Ｄｉｘｏｎ，１９６５）からの応答パターンの表形式値に等しく、ｚは、フィラメント値間の平均間隔に等しい。かかとがより高い信頼性、及び感度応答を示す傾向があるため、試験は、後肢の後部分で行われる。試験器は、過剰反応又は凍結に関して動物を監視し、その場合、動物は、穏やかになるまで単独で放置される。Ｖｏｎ　Ｆｒｅｙデータは、表１０に見出され得る。

【表２０－１】

表10. von Freyデータ（MGA-UCM-2）

治療群														
群1	-1日目		0.25日目		1日目		7日目		7.25日目		1～7日目
AAV-ベクタープラスミド（10E10 vg/群）	絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		
1A, 1s (D0)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	AUC
1	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	6.05
2	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	4.12500	1.33	3.41500	0.26	7.09
3	3.72500	0.53	3.02500	0.11	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.68
4	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	2.63500	0.04	7.42
5	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.02500	0.11	3.72500	0.53	3.41500	0.26	2.91
6	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.02500	0.11	7.04
7	4.12500	1.33	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.93
8	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	7.44
9	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.41500	0.26	5.63
10	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	2.63500	0.04	7.42
11	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.02500	0.11	6.14
12	4.12500	1.33	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.41500	0.26	6.04
13	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.96000	0.91	2.63500	0.04	5.75
14	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	6.29
合計	4.12500	1.33	3.41500	0.26	3.41500	0.26	4.12500	1.33	3.02500	0.11	6.15
平均		0.86		0.66		0.64		0.81		0.23	5.92
SE		0.07		0.07		0.08		0.06		0.04	0.39
ANOVA（データ一つ一つの事後検定）対照2群		0.979		0.917		1.000		0.974		0.051	1.000
ANOVA（データ一つ一つの事後検定）対照3群		0.998		>0.9999		>0.9999		0.907		>0.9999	0.994
ANOVA（データ一つ一つの事後検定）対照4群		0.999		0.943		0.493		0.956		0.987	0.478
ANOVA（データ一つ一つの事後検定）対照5群		0.984		0.873		0.995		0.998		0.599	0.996

【表２０－２】

表10（続き）．von Freyデータ（MGA-UCM-2）

治療群															
群2	−1日		0.25日		1日		7日		7.25日		−1~7日	
AAV-5ガイド1+2（5×10^11 vg/ガイド）/IA, 1x (DN)	絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		AUC
	対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	
1	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.72500	0.53	4.12500	1.33	3.41500	0.26	6.82
2	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.41500	0.26	5.45
3	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.72500	0.53	4.66
4	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	7.20
5	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	6.29
6	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	4.12500	1.33	3.72500	0.53	8.79
7	4.12500	1.33	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	6.12
8	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.91
9	4.12500	1.33	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	5.90
10	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.41500	0.26	4.72
11	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	4.62
12	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.41500	0.26	5.24
13	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.02500	0.11	7.04
14	4.12500	1.33	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	7.36
合計	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.41500	0.26	4.73
平均		0.92		0.58		0.62		0.86		0.46	6.01
SE		0.07		0.08		0.09		0.07		0.06	0.36
ANOVA（テューキーの多重検定）対照3群		0.886		0.941		>0.9999		0.998		0.075	1.000
ANOVA（テューキーの多重検定）対照1群		0.924		>0.9999		0.639		0.690		0.025	0.369
ANOVA（テューキーの多重検定）対照5群		0.828		1.000		0.999		0.999		0.855	0.981

【表２０－３】

表10（続き）．von Freyデータ（MGA-UCM-2）

治療群														
		-1日目		0～2.5日目		1日目		7日目		7～25日目		-1～7日目
	群3 PBS IA, 1x (D0)	絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		AUC
		対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	
	1	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.96000	0.91	4.12500	1.33	3.72500	0.53	8.14
	2	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	2.63500	0.04	7.42
	3	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	7.06
	4	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	2.63500	0.04	5.99
	5	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	2.63500	0.04	5.89
	6	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.41500	0.26	6.25
	7	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	5.81
	8	4.12500	1.33	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.93
	9	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.41500	0.26	5.27
	10	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.72500	0.53	6.19
	11	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	2.63500	0.04	4.32
	12	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	4.12500	1.33	3.02500	0.11	7.45
	13	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.72500	0.53	4.12500	1.33	3.02500	0.11	7.07
	14	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.41500	0.26	4.86
	平均		0.83		0.66		0.63		0.89		0.23	6.12
	SE		0.06		0.07		0.06		0.08		0.05	0.33
ANOVA（グループ1～4の事後検定）			>0.9999		0.962		0.400		0.548		0.985	0.259
ANOVA（グループ1～5の事後検定）			0.999		0.901		0.998		0.983		0.660	0.937

【表２０－４】

表１０（続き）．ｖｏｎ Ｆｒｅｙデータ（MGA－UCM－2）

治療群																					
群４		－１日			０．２５日			１日			７日			７．２５日			－１～７日				
AAV－ＢＡＣウンブルイター（１×１０ １０ベクター/kg）		絶対関値			絶対関値			絶対関値			絶対関値			絶対関値							
IA, 1x (D0)		対数単位		(g)	対数単位		(g)	対数単位		(g)	対数単位		(g)	対数単位		(g)	AUC				
	1	3.72500		0.53	3.96000		0.91	3.72500		0.53	3.96000		0.91	3.41500		0.26	5.92				
	2	3.96000		0.91	3.72500		0.53	3.41500		0.26	3.72500		0.53	2.63500		0.04	3.64				
	3	3.72500		0.53	3.02500		0.11	3.72500		0.53	3.96000		0.91	3.41500		0.26	5.11				
	4	3.72500		0.53	3.72500		0.53	3.72500		0.53	3.72500		0.53	2.63500		0.04	4.32				
	5	4.12500		1.33	3.96000		0.91	3.72500		0.53	3.96000		0.91	3.41500		0.26	6.42				
	6	3.96000		0.91	3.96000		0.91	3.72500		0.53	3.72500		0.53	3.41500		0.26	4.97				
	7	3.96000		0.91	3.96000		0.91	3.72500		0.53	3.96000		0.91	2.63500		0.04	6.13				
	8	3.96000		0.91	3.96000		0.91	3.02500		0.11	3.72500		0.53	3.02500		0.11	3.51				
	9	3.96000		0.91	3.72500		0.53	3.96000		0.91	3.96000		0.91	2.63500		0.04	7.03				
	10	3.96000		0.91	3.72500		0.53	3.02500		0.11	3.72500		0.53	3.41500		0.26	3.15				
	11	4.12500		1.33	3.02500		0.11	3.72500		0.53	3.96000		0.91	3.72500		0.53	5.65				
	12	3.72500		0.53	3.41500		0.26	3.72500		0.53	3.96000		0.91	3.02500		0.11	5.25				
	13	3.72500		0.53	3.72500		0.53	3.72500		0.53	3.72500		0.53	3.72500		0.53	4.38				
	14	3.96000		0.91	3.72500		0.53	3.72500		0.53	3.96000		0.91	2.63500		0.04	5.75				
	平均	3.96000		0.91	3.96000		0.91	3.72500		0.53	3.72500		0.53	3.41500		0.26	4.97				
	平均			0.84			0.59			0.48			0.75			0.20	5.09				
	SE			0.07			0.08			0.05			0.05			0.05	0.31				
ANOVA（データセットの事前規定）対照との				0.999			0.999			0.776			0.869			0.411	0.713				

【表２０－５】

表１０（続き）．ｖｏｎ　Ｆｒｅｙデータ（ＭＧＡ－ＵＣＭ－２）

治療群											
群５ ＡＡＶ－５ガイド１＋２（５×10^{9}の各ガイド／膝）	－１日目		０．２５日目		１日目		７日目		７．２５日目		－１～７日目
	絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		絶対閾値		
IA, 1x (D0)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	対数単位	(g)	AUC
1	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	7.20
2	3.72500	0.53	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.72500	0.53	6.59
3	4.12500	1.33	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	6.50
4	3.72500	0.53	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.41500	0.26	5.21
5	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	4.12500	1.33	3.96000	0.91	8.60
6	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.72500	0.53	2.63500	0.04	3.50
7	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.72500	0.53	4.12500	1.33	3.02500	0.11	6.83
8	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.72500	0.53	4.62
9	3.96000	0.91	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.96000	0.91	3.41500	0.26	7.06
10	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.41500	0.26	4.16
11	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.96000	0.91	3.41500	0.26	4.48
12	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.72500	0.53	2.63500	0.04	5.57
13	4.12500	1.33	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.96000	0.91	3.72500	0.53	5.54
14	3.96000	0.91	3.41500	0.26	3.72500	0.53	3.72500	0.53	3.02500	0.11	4.29
余分	3.96000	0.91	3.02500	0.11	3.72500	0.53	3.96000	0.91	3.02500	0.11	5.33
平均		0.81		0.56		0.59		0.84		0.36	5.73
SE		0.08		0.09		0.09		0.07		0.08	0.39

【０４７０】

キャリパー法

右膝のキャリパー測定を、５つの時点、ベースライン（－１日目）、投与後６時間（０日目）、投与後２４時間（１日目）、ＭＳＵ注射前（０時間、７日目）、及びＭＳＵ注射後６時間（７日目）で、右後足に対して実施した。膝キャリパー測定を、ばね式マイクロメーターキャリパー（Ｍｉｔｕｔｕｙｏ）を使用して行った。膝キャリパー測定値は、表１１に見出され得る。

【表２１－１】

表１１．膝キャリパーデータ（ＭＧＡ－ＵＣＭ－２）

治療群															
群1 AAV-ガストロシンプレックス（1×10^10 vg/動物） 10, 1x (D0)	－10日			0、25日			1日目			7日目			7、25日			1～7日目
	キャリパー測定値（mm）			キャリパー測定値（mm）			キャリパー測定値（mm）			キャリパー測定値（mm）			キャリパー測定値（mm）			AUC
	右			右			右			右			右			
1	3.63	0.00		3.65	0.02		3.63	0.00		3.63	0.00		3.68	0.05		0.03
2	3.88	0.00		3.92	0.04		3.88	0.00		3.85	-0.03		3.90	0.02		-0.05
3	3.67	0.00		3.72	0.05		3.67	0.00		3.67	0.00		3.70	0.03		0.05
4	3.65	0.00		3.70	0.05		3.65	0.00		3.64	-0.01		3.68	0.03		0.02
5	3.58	0.00		3.62	0.04		3.58	0.00		3.58	0.00		3.62	0.04		0.05
6	3.60	0.00		3.61	0.01		3.60	0.00		3.60	0.00		3.62	0.02		0.01
7	3.89	0.00		3.94	0.05		3.89	0.00		3.87	-0.02		3.91	0.02		-0.01
8	3.73	0.00		3.74	0.01		3.73	0.00		3.73	0.00		3.78	0.05		0.02
9	3.70	0.00		3.73	0.03		3.70	0.00		3.69	-0.01		3.74	0.04		0.00
10	3.66	0.00		3.69	0.03		3.66	0.00		3.67	0.01		3.75	0.09		0.07
11	3.65	0.00		3.69	0.04		3.65	0.00		3.65	0.00		3.70	0.05		0.05
12	3.63	0.00		3.68	0.05		3.63	0.00		3.63	0.00		3.67	0.04		0.06
13	3.72	0.00		3.72	0.00		3.72	0.00		3.72	0.00		3.75	0.03		0.00
14	3.78	0.00		3.80	0.02		3.78	0.00		3.76	-0.02		3.81	0.03		-0.04
意味	3.54	0.00		3.57	0.03		3.54	0.00		3.54	0.00		3.56	0.02		0.01
平均	3.70	0.00		3.73	0.03		3.70	0.00		3.69	-0.01		3.74	0.04		0.02
SE	0.03	0.00		0.03	0.00		0.03	0.00		0.02	0.00		0.02	0.00		0.01
ANOVA（グループ平均値検定）対照2群					0.129						0.719			0.927		0.998
ANOVA（グループ平均値検定）対照3群					0.832						0.959			0.543		1.000
ANOVA（グループ平均値検定）対照4群					0.854						0.836			0.971		0.999
ANOVA（グループ平均値検定）対照5群					0.370						0.618			0.832		1.000

【表２１－２】

表１１（続き），膝キャリパーデータ（MGA－UCM－2）

治療群		−1日目		0（ベースライン）日目		1日目		7日目		7（ベースライン）日目		−1～7日目
AAV－ガイドRNA（5×10^13 vg/kg）	B 2	キャリパー測定値（mm）		キャリパー測定値（mm）		キャリパー測定値（mm）		キャリパー測定値（mm）		キャリパー測定値（mm）		ベースラインからの変化
	IA, 1x (D0)	右		右		右		右		右		AUC
	1	3.48	0.00	3.48	0.00	3.48	0.00	3.48	0.00	3.51	0.03	0.00
	2	4.04	0.00	4.04	0.00	4.04	0.00	4.02	-0.02	4.04	0.00	-0.06
	3	3.67	0.00	3.67	0.00	3.67	0.00	3.67	0.00	3.71	0.04	0.01
	4	3.62	0.00	3.62	0.00	3.62	0.00	3.62	0.00	3.67	0.05	0.01
	5	3.58	0.00	3.58	0.00	3.58	0.00	3.58	0.00	3.62	0.04	0.01
	6	3.80	0.00	3.85	0.05	3.80	0.00	3.81	0.01	3.84	0.04	0.09
	7	3.88	0.00	3.89	0.01	3.88	0.00	3.88	0.00	3.90	0.02	0.01
	8	3.75	0.00	3.75	0.00	3.75	0.00	3.75	0.00	3.79	0.04	0.01
	9	3.56	0.00	3.60	0.04	3.56	0.00	3.56	0.00	3.65	0.09	0.05
	10	3.64	0.00	3.64	0.00	3.64	0.00	3.64	0.00	3.67	0.03	0.00
	11	3.65	0.00	3.70	0.05	3.65	0.00	3.65	0.00	3.69	0.04	0.06
	12	3.75	0.00	3.75	0.00	3.75	0.00	3.74	-0.01	3.78	0.03	-0.03
	13	3.68	0.00	3.68	0.00	3.68	0.00	3.68	0.00	3.68	0.00	0.00
	14	3.65	0.00	3.69	0.04	3.65	0.00	3.65	0.00	3.65	0.00	0.04
	合計	3.62	0.00	3.64	0.02	3.62	0.00	3.62	0.00	3.65	0.03	0.02
	平均	3.70	0.00	3.71	0.01	3.70	0.00	3.70	0.00	3.73	0.03	0.01
	SE	0.04	0.00	0.04	0.01	0.04	0.00	0.04	0.00	0.04	0.01	0.01
ANOVA（グループ1の各対比）					0.741				0.994		0.252	0.989
ANOVA（グループ2の各対比）					0.966				>0.9999		0.994	0.982
ANOVA（グループ3の各対比）					0.935				0.999		1.000	0.999

【表２１－３】

表１１（続き）．膝キャリパーデータ（MGA-UCM-2）

治療群															
AAV-5-ガイドRNA+2（5×10^13 vg/kg）		−1日目		0、2日目		1日目		7日目		7、25日目		−1～7日目	
		キャリパー測定値（mm）		キャリパー測定値（mm）		キャリパー測定値（mm）		キャリパー測定値（mm）		キャリパー測定値（mm）		ベースラインからのAUC	
	群 5	右	ベースラインからの変化	右	ベースラインからの変化	右	ベースラインからの変化	右	ベースラインからの変化	右	ベースラインからの変化		
	IA, IIx (D0)												
	1	3.68	0.00	3.72	0.04	3.68	0.00	3.68	0.00	3.70	0.02		0.04
	2	3.68	0.00	3.68	0.00	3.68	0.00	3.67	-0.01	3.70	0.02		-0.03
	3	3.71	0.00	3.71	0.00	3.71	0.00	3.70	-0.01	3.72	0.01		-0.03
	4	3.66	0.00	3.69	0.03	3.66	0.00	3.65	-0.01	3.73	0.07		0.01
	5	3.65	0.00	3.66	0.01	3.65	0.00	3.65	0.00	3.68	0.03		0.01
	6	3.68	0.00	3.70	0.02	3.68	0.00	3.69	0.01	3.70	0.02		0.05
	7	3.74	0.00	3.77	0.03	3.74	0.00	3.74	0.00	3.75	0.01		0.03
	8	3.69	0.00	3.69	0.00	3.69	0.00	3.69	0.00	3.71	0.02		0.00
	9	3.72	0.00	3.75	0.03	3.72	0.00	3.73	0.01	3.75	0.03		0.06
	10	3.74	0.00	3.74	0.00	3.74	0.00	3.73	-0.01	3.76	0.02		-0.03
	11	3.62	0.00	3.67	0.05	3.62	0.00	3.62	0.00	3.67	0.05		0.06
	12	3.79	0.00	3.79	0.00	3.79	0.00	3.79	0.00	3.87	0.08		0.01
	13	3.67	0.00	3.71	0.04	3.67	0.00	3.67	0.00	3.70	0.03		0.04
	14	3.68	0.00	3.70	0.02	3.68	0.00	3.69	0.01	3.70	0.02		0.05
	合計	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00		0.00
	平均	3.69	0.00	3.71	0.02	3.69	0.00	3.69	0.00	3.72	0.03		0.02
	SE	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01		0.01

【表２１－４】

表１１（続き）．膝キャリパーデータ（MGA－UCM－2）

治療群															
		−1日目		0，25日目		1日目		2日目		7，25日目		−1～7日目	
		キャリパー測定値 (mm)		キャリパー測定値 (mm)		キャリパー測定値 (mm)		キャリパー測定値 (mm)		キャリパー測定値 (mm)		ベースライン	
群3		t_1	ベースライン補正データ	t_1	ベースライン補正データ	t_1	ベースライン補正データ	t_1	ベースライン補正データ	t_1	ベースライン補正データ	AUC	
PBS IA, 1x (D0)	1	3.85	0.00	3.89	0.04	3.85	0.00	3.85	0.00	3.90	0.05	0.05	
	2	3.78	0.00	3.78	0.00	3.78	0.00	3.76	-0.02	3.79	0.01	-0.06	
	3	3.68	0.00	3.72	0.04	3.68	0.00	3.68	0.00	3.75	0.07	0.05	
	4	3.72	0.00	3.77	0.05	3.72	0.00	3.74	0.02	3.79	0.07	0.12	
	5	3.62	0.00	3.62	0.00	3.62	0.00	3.62	0.00	3.70	0.08	0.01	
	6	3.68	0.00	3.68	0.00	3.68	0.00	3.66	-0.02	3.74	0.06	-0.06	
	7	3.78	0.00	3.78	0.00	3.78	0.00	3.78	0.00	3.86	0.08	0.01	
	8	3.72	0.00	3.76	0.04	3.72	0.00	3.73	0.01	3.80	0.08	0.08	
	9	3.65	0.00	3.69	0.04	3.65	0.00	3.65	0.00	3.71	0.06	0.05	
	10	3.58	0.00	3.58	0.00	3.58	0.00	3.58	0.00	3.59	0.01	0.00	
	11	3.63	0.00	3.68	0.05	3.63	0.00	3.63	0.00	3.68	0.05	0.06	
	12	3.79	0.00	3.79	0.00	3.79	0.00	3.77	-0.02	3.82	0.03	-0.06	
	13	3.56	0.00	3.58	0.02	3.56	0.00	3.56	0.00	3.61	0.05	0.03	
	14	3.73	0.00	3.78	0.05	3.73	0.00	3.72	-0.01	3.75	0.02	0.02	
	平均	3.70	0.00	3.72	0.02	3.70	0.00	3.70	0.00	3.75	0.05	0.02	
	SE	0.02	0.00	0.02	0.01	0.02	0.00	0.02	0.00	0.02	0.01	0.01	
ANOVA（テューキーの事後検定）対第4群					>0.9999				0.997		0.214	>0.9999	
ANOVA（テューキーの事後検定）対第5群					0.980				0.975		0.160	>0.9999	

【表２１－５】

表１１（続き）．膝キャリパーデータ（ＭＧＡ－ＵＣＭ－２）

治験群	−１日目		０．２５日目		１日目		７日目		７．２５日目		−１〜７日目
群４ ＡＡＶ－５スクランブルベクター（１×１０^１０粒子／膝）	キャリパー測定値(mm)		キャリパー測定値(mm)		キャリパー測定値(mm)		キャリパー測定値(mm)		キャリパー測定値(mm)		ベースラインからのΔ
IA, 1x (D0)	右	ベースライン（D−1）からのΔ	右	ベースライン（D−1）からのΔ	右	ベースライン（D−1）からのΔ	右	ベースライン（D−1）からのΔ	右	ベースライン（D−1）からのΔ	AUC
1	3.67	0.00	3.70	0.03	3.67	0.00	3.68	0.01	3.70	0.03	0.07
2	3.77	0.00	3.80	0.03	3.77	0.00	3.75	-0.02	3.81	0.04	-0.03
3	3.72	0.00	3.74	0.02	3.72	0.00	3.73	0.01	3.75	0.03	0.05
4	3.61	0.00	3.63	0.02	3.61	0.00	3.61	0.00	3.66	0.05	0.03
5	3.68	0.00	3.71	0.03	3.68	0.00	3.68	0.00	3.71	0.03	0.03
6	3.84	0.00	3.84	0.00	3.84	0.00	3.82	-0.02	3.87	0.03	-0.06
7	3.72	0.00	3.74	0.02	3.72	0.00	3.72	0.00	3.77	0.05	0.03
8	3.70	0.00	3.82	0.12	3.70	0.00	3.71	0.01	3.72	0.02	0.15
9	3.80	0.00	3.81	0.01	3.80	0.00	3.81	0.01	3.83	0.03	0.05
10	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00	3.72	0.00	3.76	0.04	0.00
11	3.60	0.00	3.60	0.00	3.60	0.00	3.60	0.00	3.62	0.02	0.00
12	3.63	0.00	3.64	0.01	3.63	0.00	3.63	0.00	3.69	0.06	0.02
13	3.59	0.00	3.59	0.00	3.59	0.00	3.57	-0.02	3.62	0.03	-0.06
14	3.68	0.00	3.70	0.02	3.68	0.00	3.68	0.00	3.71	0.03	0.02
余分	3.74	0.00	3.75	0.01	3.74	0.00	3.72	-0.02	3.73	-0.01	-0.05
平均	3.70	0.00	3.72	0.02	3.70	0.00	3.69	0.00	3.73	0.04	0.02
SE	0.02	0.00	0.02	0.01	0.02	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00	0.01
ANOVA（テューキーの事後検定）対第５群				0.998				1.000		0.962	>0.9999

【０４７１】

瀕死又は死んだ動物

動物が死んだ場合、試料は採取されなかった。安楽死させる必要のある動物については、理由にかかわらず、試料を、それらが死体解剖される際に採取した（死体解剖情報セクション参照）。健康評価中の動物は、ＳＣ流体、並びにケージの底部にハイドロゲル及び飼料を与えられ得る。

【０４７２】

試験群の指定

【表２２】

群	N	MSU	治療	投与レベル(粒子/膝)	投与体積	投与濃度(粒子/ml)	投与経路	レジメン
1	14	はい	AAV-6スクランブルベクター	$1x10^{10}$	10μl	$1x10^{12}$	IA(右膝)	1×(0日目)
2	14	はい	AAV-6ガイド1+2	$5x10^{9}$(の各ガイド)	10μl	$1x10^{12}$	IA(右膝)	1×(0日目)
3	14	はい	PBS	--	10μl	--	IA(右膝)	1×(0日目)
4	14	はい	AAV-5スクランブルベクター	$1x10^{10}$	10μl	$1x10^{12}$	IA(右膝)	1×(0日目)
5	14	はい	AAV-5ガイド1+2	$5x10^{9}$(の各ガイド)	10μl	$1x10^{12}$	IA(右膝)	1×(0日目)

【０４７３】
試験カレンダー
【表２３】

月曜日	火曜日	水曜日	木曜日	金曜日	土曜日	日曜日
5/4/2020 －１０日目	5/5/2020 －９日目	5/6/2020 －８日目	5/7/2020 －７日目	5/8/2020 －６日目	5/9/2020 －５日目	5/10/2020 －４日目
到着時に動物を馴化のために群に分ける				ＶＦに馴化する		
5/11/2020 －３日目	5/12/2020 －２日目	5/13/2020 －１日目	5/14/2020 ０日目	5/15/2020 １日目	5/16/2020 ２日目	5/17/2020 ３日目
ＶＦに馴化する	ＶＦに馴化する	計量及び無作為化、ベースラインキャリパー、ベースライン挙動。膝の毛を剃る	定時投与、定時キャリパー、定時挙動	定時キャリパー、定時挙動	計量	
5/18/2020 ４日目	5/19/2020 ５日目	5/20/2020 ６日目	5/21/2020 ７日目	5/22/2020 ８日目	5/23/2020 ９日目	5/24/2020 １０日目
		計量、膝の毛を剃る？	定時ＭＳＵ、定時キャリパー、定時挙動、定時死体解剖			

【０４７４】
物質

【表２４】

名称	供給者	カタログ番号*
MSU結晶	Invivogen	Tlrl-msu-25
ビヒクル(PBS)	Corning	21-031-CV
遺伝子	SgRNA	AA06-CCPCTRO1-AD01-200
遺伝子	SgRNA	AA06-MCP001682-AD01-2-200A
遺伝子	SgRNA	AA06-MCP001682-AD01-2-200B
遺伝子	SgRNA	AA05-CCPCTROI-AD01-200
遺伝子	SgRNA	AA05-MCP001682-AD01-2-200-9
遺伝子	SgRNA	AA05-MCP001682-AD01-2-200-6
イソフルラン	VetOne	502017
シリンジ及び針	BD	適宜
血清分離管(必要な場合)	Greiner Bio-One	#450472(Fisher経由)
Li Hep Mini-Collect(必要な場合)	Greiner Bio-One	#450480(Fisher経由)
EDTA Mini-Collect(必要な場合)	Greiner Bio-One	#450477(Fisher経由)
K3EDTA (適宜)	Covidien	#8881311149(Fisher経由)

【０４７５】

試験物品及びビヒクル情報

【表２５】

群	Ｃｐｍ	N	ｍｌ／匹	投与日数	１日当たりの用量	必要な化合物（ｍｌ）	２５％の過多量	必要な合計（ｍｌ）
1	ＡＡＶ－６スクランブルベクター	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18
2	ＡＡＶ－６ガイド１＋２	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18
3	**PBS**	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18
4	ＡＡＶ－５スクランブルベクター	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18
5	ＡＡＶ－５ガイド１＋２	14	0.01	1	1	0.14	0.04	0.18

【０４７６】

製剤化されていない試験物品保管条件：

【表２６】

AAV-6 スクランブルベクター(第 1 群):-80C
AAV-6 ガイド 1+2(第 2 群):-80C
PBS(第 3 群):4C
AAV-5 スクランブルベクター(第 4 群):-80C
AAV-5 ガイド 1+2(第 5 群):-80C

【０４７７】

ビヒクル情報：

【表２７】

AAV-6 スクランブルベクター(第 1 群):滅菌 PBS(w/o Ca 及び Mg)
AAV-6 ガイド 1+2(第 2 群):滅菌 PBS(w/o Ca 及び Mg)
PBS(第 3 群):滅菌 PBS(w/o Ca 及び Mg)
AAV-5 スクランブルベクター(第 4 群):滅菌 PBS(w/o Ca 及び Mg)
AAV-5 ガイド 1+2(第 5 群):滅菌 PBS(w/o Ca 及び Mg)

【０４７８】
試験物品製剤の説明及び計算：
【表２８】

AAV-6 スクランブルベクター(第 1 群):滅菌 PBS を使用してストックを適切な濃度に希釈する(AAV 調製セクション参照)
AAV-6 ガイド 1+2(第 2 群):滅菌 PBS を使用してストックを適切な濃度に希釈する(AAV 調製セクション参照)
PBS(第 3 群):滅菌 PBS を使用する(AAV 調製セクション参照)
AAV-5 スクランブルベクター(第 4 群):滅菌 PBS を使用してストックを適切な濃度に希釈する(AAV 調製セクション参照)
AAV-5 ガイド 1+2(第 5 群):滅菌 PBS を使用してストックを適切な濃度に希釈する(AAV 調製セクション参照)

【０４７９】
投与製剤及びビヒクルの保管及び安定性：
【表２９】

AAV-6 スクランブルベクター(第 1 群):注射直前に希釈する
AAV-6 ガイド 1+2(第 2 群):注射直前に希釈する
AAV-5 スクランブルベクター(第 4 群):注射直前に希釈する
AAV-5 ガイド 1+2(第 5 群):注射直前に希釈する

【０４８０】
投与後の試験物品の処分
【表３０】

AAV-6 スクランブルベクター(第 1 群):製剤を廃棄し、将来の試験のためにストック溶液を-80C で保持する。
AAV-6 ガイド 1+2(第 2 群):製剤を廃棄し、将来の試験のためにストック溶液を-80C で保持する。
AAV-5 スクランブルベクター(第 4 群):製剤を廃棄し、将来の試験のためにストック溶液を-80C で保持する。
AAV-5 ガイド 1+2(第 5 群):製剤を廃棄し、将来の試験のためにストック溶液を-80C で保持する。

【０４８１】
ライブフェーズ
【表３１】

ライブフェーズデータ収集			
タイプ	試験日	群(An)	詳細
体重	-1、2、6日目	全て	
膝キャリパー	-1日目(ベースライン) 0日目(6時間) 1日目(24時間) 7日目(0時間、6時間)	全て	右膝 ベースラインからの変化
Von Frey	-1日目(ベースライン) 0日目(6時間) 1日目(24時間) 7日目(0時間、6時間)	全て	右足のみ

【０４８２】
死体解剖情報
動物を、試験７日目（ＭＳＵ後およそ６時間）の最終挙動試験後に死体解剖した。死体解剖では、動物を、心臓穿刺により放血させ、組織採取のために頸椎脱臼によって安楽死させた。全血を血清（≧２００μＬ／マウス）用に処理し、これを、試験スポンサーへの発送のために－８０℃で凍結保管した。全ての動物から右（注射された）及び左（正常）の膝を採取した（膝関節を無傷に保ちながら、皮膚、筋肉、及び足を除去した）。関節を、スポンサーへの発送のために１５ｍＬの円錐管内で直線状に急速冷凍した。
【表３２】

殺傷スケジュール:	試験 7 日目(MSU の 6 時間後):全ての動物
安楽死の方法:	心臓穿刺による出血で放血させ、その後、頸椎脱臼させる。
時点:	最終挙動時点後(MSU の 6 時間後)

【表３３】

死体解剖試料の採取:						
タイプ	プロセスの目的	抗凝血剤	Gr/An	最終体積	保管条件	処分
心臓穿刺全血	血清	該当なし	全て	≧200μl	-80C、Epps	スポンサーに発送する

【表３４】

死体解剖組織試料の採取:				
タイプ	Gr/An	詳細	保管条件	処分
右(注射された)膝	全て	膝関節を無傷に保って皮膚及び筋肉を除去し、足を除去する	直線状で急速冷凍、15mlの円錐に置く	スポンサーに発送する
左(正常)膝	全て	膝関節を無傷に保って皮膚及び筋肉を除去し、足を除去する	直線状で急速冷凍、15mlの円錐に置く	スポンサーに発送する

【０４８３】
統計分析
データをＭｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌに入力し、各群の平均値及び標準誤差（ＳＥ）を決定した。群を、一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）又は反復測定（ＲＭ）ＡＮＯＶＡを使用して、テューキーの事後検定と比較した。ＡＮＯＶＡを、Ｐｒｉｓｍ　ｖ８．０．２ソフトウェア（ＧｒａｐｈＰａｄ）を使用して実施した。示唆されない限り、ＢＢＰは、未加工（非変換）のデータのみに対して統計分析を実施する。統計検定は、データの正常性及び分散の均質性に関して特定の仮定を行い、検定がこれらの仮定の違反を結果的にもたらした場合、更なる分析が必要とされ得る。全ての検定の有意性を、ｐ＜０．０５０に設定し、ｐ値を小数点第３位まで四捨五入した。
【０４８４】
ＡＡＶ調製
注射用ウイルスを調製するための標準業務手順書
各構築物に対して、５×１０＾１１ｖｇ／ｍｌを含有するワーキングストックを作成する（ガイド１、ガイド２）。等価性について、スクランブル対照群は、合計１×１０＾１０コピーのスクランブルベクターを注射されることを必要とすることに留意されたい。希

釈剤（ＰＢＳ）は、ビヒクル対照群で使用されることになる。

【０４８５】

物質

【表３５】

AA06-CCPCTR01-AD01-200:スクランブル制御 AAV-6 粒子、5×10^12vg/ml を含有する 100 マイクロリットル溶液。
AA06-MCP001682-AD01-2-200-Guide 1:AAVPrime(商標)粒子、ガイド 1 を含有する AAV-6、5×10^12vg/ml を含有する 100 マイクロリットル溶液。
AA06-MCP001682-AD01-2-200-Guide 2:AAVPrime(商標)粒子、ガイド 2 を含有する AAV-6、5×10^12vg/ml を含有する 100 マイクロリットル溶液。
AA05-CCPCTR01-AD01-200:スクランブル制御 AAV-5 粒子、>5×10^12vg/ml を含有する 100 マイクロリットル溶液。
AA05-MCP001682-AD01-2-200-Guide 1:AAVPrime(商標)粒子、ガイド 1 を含有する AAV-5、>5×10^12vg/ml を含有する 100 マイクロリットル溶液。
AA05-MCP001682-AD01-2-200-Guide 2:AAVPrime(商標)粒子、ガイド 2 を含有する AAV-5、>5×10^12vg/ml を含有する 100 マイクロリットル溶液。

【０４８６】

手順

第１群：ＡＡＶ－６スクランブル対照－４００マイクロリットルの滅菌濾過されたＣａ及びＭｇ非含有ＰＢＳを滅菌Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ管に等分する。１００マイクロリットル（５×１０＾１１ｖｇに相当）のストックＡＡ０６－ＣＣＰＣＴＲ０１－ＡＤ０１－２００を加える。これは、結果として、１×１０＾１２ｖｇ／ｍｌのＡＡＶ－５スクランブル対照を含有する０．５ｍｌの体積のワーキングストックをもたらす。膝関節への１０マイクロリットルのこの溶液の注射は、１×１０＾１０ｖｇのＡＡＶ－６スクランブル対照を送達する。

第２群：活性ＡＡＶ－６ガイド１＋２－８００マイクロリットルの滅菌濾過されたＣａ及びＭｇ非含有ＰＢＳを滅菌Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ管に等分する。１００マイクロリットル（５×１０＾１１ｖｇに相当）の２つの活性ＡＡＶ－６構築物の各々を追加する－これは、１００マイクロリットル（５×１０＾１１ｖｇに相当）のＡＡ０６－ＭＣＰ００１６８２－ＡＤ０１－２－２００－ａ、及び１００マイクロリットル（５×１０＾１１ｖｇに相当）のストックＡＡ０６－ＭＣＰ００１６８２－ＡＤ０１－２－２００－ｂを意味する。これは、結果として、５×１０＾１１ｖｇ／ｍｌの２つのガイドの各々を含有する１ｍｌの体積のワーキングストックをもたらす。膝関節への１０マイクロリットルのこの溶液の注射は、２つのＡＡＶ－６ガイドの各々について５×１０＾９ｖｇを送達する。

第３群：ＰＢＳ－ウイルスストックを希釈するために使用される、滅菌濾過されたＣａ及びＭｇ非含有ＰＢＳは、本試験のビヒクル対照として提供された。これを、膝関節当たり１０マイクロリットルで投与した。

第４群：ＡＡＶ－５スクランブル対照－４００マイクロリットルの滅菌濾過されたＣａ及びＭｇ非含有ＰＢＳを滅菌Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ管に等分する。１００マイクロリットル（５×１０＾１１ｖｇに相当）のストックＡＡ０５－ＣＣＰＣＴＲ０１－ＡＤ０１－２００を加える。これは、結果として、１×１０＾１２ｖｇ／ｍｌのＡＡＶ－５スクランブル対照を含有する０．５ｍｌの体積のワーキングストックをもたらす。膝関節への１０マイクロリットルのこの溶液の注射は、１×１０＾１０ｖｇのＡＡＶ－５スクランブル対照を送達した。

第５群：活性ＡＡＶ－６ガイド１＋２－８００マイクロリットルの滅菌濾過されたＣａ及びＭｇ非含有ＰＢＳを滅菌Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ管に等分する。１００マイクロリットル（５×１０＾１１ｖｇに相当）の２つの活性ＡＡＶ－６構築物の各々を追加する－これは、１００マイクロリットル（５×１０＾１１ｖｇに相当）のＡＡ０５－ＭＣＰ００１６８

２－ＡＤ０１－２－２００－ａ、及び１００マイクロリットル（５×１０＾１１ｖｇに相当）のストックＡＡ０５－ＭＣＰ００１６８２－ＡＤ０１－２－２００－ｂを意味する。これは、結果として、５×１０＾１１ｖｇ／ｍｌの２つのガイドの各々を含有する１ｍｌの体積のワーキングストックをもたらす。膝関節への１０マイクロリットルのこの溶液の注射は、２つのＡＡＶ－６ガイドの各々について５×１０＾９ｖｇを送達した。

【０４８７】

ｑＰＣＲ

瞬間凍結された滑膜組織を、塊状（遠位大腿骨及び近位脛骨を含む）に切除し、ＲＬＴ緩衝液中に配置した。Ｃｙｒｏｌｙｓ　Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ組織ホモジナイザー（「ＨＡＲＤ」プログラムサイクル）を使用してホモジナイズされた。ＲＮＡは、ＲＮｅａｓｙ又はＲＮｅａｓｙ　Ｐｌｕｓキット、その後、ＱＩＡｓｈｒｅｄｄｅｒ（ＱＩＡＧＥＮ製）を使用して抽出された。ＲＮＡは、Ｎａｎｏｎｓｔｒｉｎｇを使用して定量化された。ｃＤＮＡが逆転写され、ｑＰＣＲが、ＩＬ－１ベータ、ベーターアクチン、及びＲＰＬ１３に対するマウス特異的プライマーを使用して実施された。

【０４８８】

結果

図６に示されるように、ＰＢＳ対照マウスは、試験の過程で４．３％（１．１ｇ）の平均体重増加を有した。体重増加は、群間で統計的に異なっていなかった（表７、表９）。

【０４８９】

図７Ａに示されるように、全群における膝キャリパー測定値は、試験０日目の投与後６時間でピークに達し、投与後２４時間でベースラインに戻り、次いで、試験７日目のＭＳＵ後６時間で再びピークに達した。ベースラインからの膝キャリパーの変化は、経時的に群間で統計的に異なっていなかった（表１１）。図７Ｂに示されるように、－１～７日目の膝キャリパーの変化のＡＵＣは、群間で統計的に異なっていなかった（表７、表１１）。

【０４９０】

図８Ａに示されるように、ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ絶対閾値は、試験０日目のＩＡ投与後、全ての群でわずかに減少し、次いで、ＭＳＵのＩＡ注射後に急激に減少する前に、試験７日目のベースラインに向かう傾向を示した。ＡＡＶスクランブルベクター対照群とＰＢＳ対照群との間に経時的な統計的差異は存在しなかった。ＡＡＶ－６で処理されたマウス（ガイド１＋２）は、対照群と比較して、７日目のＭＳＵ後６時間増加したｖｏｎ　Ｆｒｅｙ絶対閾値を有し、この時点におけるｖｏｎ　Ｆｒｅｙ絶対閾値の増加は、ＡＡＶ－６スクランブルベクター及びＰＢＳ対照群と比較して統計的有意性にほぼ達し（それぞれ、ｐ＝０．０５１及びｐ＝０．０７５）、ＡＡＶ－５スクランブルベクター対照群と比較して統計的に有意であった（ｐ＝０．０２５）。ＡＡＶ－５で処理されたマウス（ガイド１＋２）は、経時的に対照群と統計的に異ならなかったｖｏｎ　Ｆｒｅｙ絶対閾値を有した（表１０）。図８Ｂに示されるように、－１～７日目のｖｏｎ　Ｆｒｅｙ絶対閾値のＡＵＣは、群間で統計的に異なっていなかった（表７、表１０）。

【０４９１】

図１０に示されるように、滑膜組織中のマウスＩＬ－１βの免疫組織化学データは、ＣＲＩＳＰＲ処理動物における低減されたＩＬ－１β発現を示した。（Ａ）ＰＢＳで前処理されたＭＳＵ注射された動物では、ＩＬ－１βの強固な発現（褐色染色）が存在する。この効果は、ＣＲＩＳＰＲ処理動物（パネルＣ）には見られない。ＣＲＩＳＰＲ処理された動物におけるＩＬ－１β（褐色染色）の不在は、陰性抗体対照（パネルＢ及びＤ）に類似している。全ての画像は、１０×オリジナル倍率である。

【０４９２】

考察及び結論

ＡＡＶ－６（ガイド１＋２：５×１０^{9}ｖｇ／ガイド／膝）でＩＡ処理されたマウス（０日目に１回）は、ＡＡＶ－５スクランブルベクターをＩＡ投与されたマウスと比較して、７日目にＭＳＵ注射後６時間で、ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ試験によって測定された関連痛の統

計的に有意な低減（ｐ＝０．０２５）を示し、ＡＡＶ－６スクランブルベクター及びＰＢＳ対照群（それぞれ、ｐ＝０．０５１及びｐ＝０．０７５）と比較してほぼ有意である結果を示した。ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ評価に対するＡＵＣ計算は、群間で統計的に異なっていなかった。動物の体重増加及び膝の腫脹は、群間で統計的に異なっていなかった。全ての動物は、試験終了まで生存した。

【０４９３】

実施例６．ガイドＲＮＡ設計

ヒトＩＬ－１α及びＩＬ－１βを標的とするガイドＲＮＡ（表１４）を、以下の手順に従って設計した：

１．適切なゲノムアセンブリ及び遺伝子モデルを識別する（ツール：Ｅｎｓｅｍｂｌｅ、ＵＣＳＣ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｒｏｗｓｅｒ）、

２．標的化ウィンドウ外にマッピングする主要な機能ドメインを識別する（ツール：Ｅｎｓｅｍｂｌｅ、Ｌｉｔｅｒａｔｕｒｅ）、

３．主要なエクソンにわたる全ての可能性のあるガイドＲＮＡのリストを生成する（ツール：Ｅｎｓｅｍｂｌｅ、ＵＣＳＣ、ＩｎＤｅｌｐｈｉ）、

４．ＭＬ予測されたフレームシフトスコアに基づいてガイドをランク付けし、下位のガイドを排除する、

５．＜５ｂｐのガイドを、イントロン：エクソン境界から、６×Ｔ以上のホモポリヌクレオチド経路とともに除外する、

６．各ガイドのオンターゲット（Ｄｏｅｎｃｈ　２０１６）及びオフターゲット（Ｈｓｕ　２０１３）の指標を決定する（ツール：ＵＣＳＣ、Ｄｅｓｋｇｅｎ）、

７．下位のオン及びオフターゲットスコアを有するガイドをフィルタ除外して、最終リストを生成する、

８．フレームシフトインデックスに基づいてランク付けする。

【０４９４】

ネコ、イヌ、又はウマＩＬ－１α及びＩＬ－１βを標的とするガイドＲＮＡ（表１５）を、以下の手順に従って設計した：

１．適切なゲノムアセンブリ及び遺伝子モデルを識別する（ツール：Ｅｎｓｅｍｂｌｅ、ＵＣＳＣ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｒｏｗｓｅｒ）

２．標的化ウィンドウ外にマッピングする主要な機能ドメインを識別する（ツール：Ｅｎｓｅｍｂｌｅ、Ｌｉｔｅｒａｔｕｒｅ）

３．適切なエクソン及び関連する隣接イントロン配列からコーディング配列を取得する（ツール：Ｅｎｓｅｍｂｌｅ．ＡＰＥ）

４．主要なエクソンにわたる全ての可能性のあるガイドＲＮＡのリストを生成する（ツール：Ｅｎｓｅｍｂｌｅ、ＩｎＤｅｌｐｈｉ）

５．ＭＬ予測されたフレームシフトスコアに基づいてガイドをランク付けし、下位のガイドを排除する

６．＜５ｂｐのガイドを、イントロン：エクソン境界から、６×Ｔ以上のホモポリヌクレオチド経路とともに除外する

７．各ガイドに対するオフターゲット指標を決定する（ツール：Ｃａｓ　Ｏｆｆ－Ｆｉｎｄｅｒ、Ｅｘｃｅｌ）

８．下位のオフターゲットスコアを有するガイドをフィルタ除外して、最終リストを生成する

９．フレームシフトインデックスに基づいてランク付けする。

考慮される全ての種の遺伝子転写情報が、表１６に含まれる。

【表３６】

表１４．

遺伝子記号	配列番号	種	染色体	ゲノム	フレームシフト(%)	Doench 2016	Hsu 2013	gRNA	PAM
IL1B	627	ヒト	chr2	hg38	80.1	55	76	AGCTGGATGCCGCCATCCAG	AGG
IL1B	628	ヒト	chr2	hg38	78.5	44	71	ACCACTACAGCAAGGGCTTC	AGG
IL1B	629	ヒト	chr2	hg38	75.4	63	92	CATGGCCACAACAACTGACG	CGG
IL1B	630	ヒト	chr2	hg38	74	60	97	GGTGGTCGGAGATTCGTAGC	TGG
IL1B	631	ヒト	chr2	hg38	87.6	55	61	CTACAGCAAGGGCTTCAGGC	AGG
IL1B	632	ヒト	chr2	hg38	85.6	61	58	GACCTCTGCCCCTCTGGATGG	CGG
IL1B	633	ヒト	chr2	hg38	85.2	35	62	CTCTCCGCAGTGCTCCTTCC	AGG
IL1B	634	ヒト	chr2	hg38	78.5	50	62	CATTCTCCTGGAAGGTCTGT	GGG
IL1A	635	ヒト	chr2	hg38	92.1	70	87	ATGGTGGTAGTAGCAACCAA	CGG
IL1A	636	ヒト	chr2	hg38	88.3	51	88	GCCATAGCTTACATGATAGA	AGG
IL1A	637	ヒト	chr2	hg38	87	68	88	CAGAGACAGATGATCAATGG	AGG
IL1A	638	ヒト	chr2	hg38	87	50	74	ATTCAGAGACAGATGATCAA	TGG
IL1A	639	ヒト	chr2	hg38	83.1	53	91	TGGTGGTAGTAGCAACCAAC	GGG
IL1A	640	ヒト	chr2	hg38	85.7	60	67	CTCCAGGTCATCATCAGTGA	TGG

【表３７－１】

表１５

遺伝子記号	配列番号	種	染色体	エクソン	ゲノム	フレームシフト(%)	CasOffFinder 合計	gRNA	PAM
IL1A	641	ウマ	chr15	4	EquCab3.0	80.9	21	TGGTGCTGGTGGCAGCCAAC	GGG
IL1A	642	ウマ	chr15	4	EquCab3.0	79.2	14	CTTCTTCAGAGTCTTCCCGT	TGG
IL1A	643	ウマ	chr15	3	EquCab3.0	74.9	37	TTACCTGAGTCAGAGAGAGA	TGG
IL1A	644	ウマ	chr15	4	EquCab3.0	74.6	11	AAGCTATGACCCACTTCCTG	AGG
IL1A	645	ウマ	chr15	4	EquCab3.0	71.5	14	CCATGCAGTCCTCAGGAAGT	GGG
IL1A	646	イヌ	chr17	3	canFam4	75.7	7	ACATGCAGTCCTCATGAAGT	GGG
IL1A	647	イヌ	chr17	3	canFam4	73.8	10	GACATCCCAGCTTACCTTCA	AGG
IL1A	648	イヌ	chr17	3	canFam4	72.6	10	GAGCTGTGACCCACTTCATG	AGG
IL1A	649	イヌ	chr17	3	canFam4	79.2	14	CATTTTCCTTGAAGGTAAGC	TGG
IL1A	650	イヌ	chr17	3	canFam4	87	16	TGGTAGTGGTGGCAGCCAAT	GGG
IL1A	651	イヌ	chr17	3	canFam4	76.8	18	ATTTTCCTTGAAGGTAAGCT	GGG
IL1A	652	イヌ	chr17	3	canFam4	79.1	23	CTTCTTTAGAATCTTCCCAT	TGG
IL1A	653	イヌ	chr17	3	canFam4	71.4	23	GGATGTCTTTGAGATTTCAG	AGG
IL1A	654	イヌ	chr17	3	canFam4	88.5	28	GTGGTAGTGGTGGCAGCCAA	TGG
IL1A	655	イヌ	chr17	3	canFam4	78.7	31	CACTACCACATTTTCCTTGA	AGG
IL1A	656	ネコ	chrA3	3	Fc9.0	73.3	12	GGTAAGCTGGGGTGTCTTAG	AGG
IL1A	657	ネコ	chrA3	3	Fc9.0	74.3	13	ATTCCTCACTGCTGATGACC	TGG
IL1A	658	ネコ	chrA3	3	Fc9.0	86.7	15	TGGTGATGGTGGCAGCCAAT	GGG
IL1A	659	ネコ	chrA3	3	Fc9.0	79.3	20	CTTCCAGGTCATCAGCAGTG	AGG
IL1B	660	ウマ	chr15	4	EquCab3.0	87.6	27	TGAAAGTCTTGTTGTAAAGT	TGG
IL1B	661	ウマ	chr15	4	EquCab3.0	79.6	15	GACCTCAGCTCCATGGGCGA	TGG
IL1B	662	ウマ	chr15	4	EquCab3.0	78.5	13	CTGGATGCCCCCCATCGCCCA	TGG
IL1B	663	ウマ	chr15	4	EquCab3.0	75.4	17	CCCCATCGCCCATGGAGCTG	AGG

【表３７－２】

遺伝子記号	配列番号	種	染色体	エクソン	ゲノム	フレームシフト(%)	CasOffFinder 合計	gRNA	PAM
IL1B	664	ウマ	chr15	4	EquCab3.0	75.2	12	AAGTCTTGTTGTAAAGTTGG	TGG
IL1B	665	イヌ	chr17	3	canFam4	82.1	2	CGTGTCAGTCATTGTAGCTT	TGG
IL1B	666	イヌ	chr17	3	canFam4	74.2	11	CCACAGTTCTCTGGTAGATG	AGG
IL1B	667	イヌ	chr17	3	canFam4	80	13	AGACCTGAACCACAGTTCTC	TGG
IL1B	668	イヌ	chr17	3	canFam4	80	14	CCTCATCTACCAGAGAACTG	TGG
IL1B	669	イヌ	chr17	3	canFam4	80	15	TCAGACTCTTGTTACAGAGC	TGG
IL1B	670	ネコ	chrA3	2	Fe9.0	82.4	8	GTAGTAAGCCATCATTTCAC	TGG
IL1B	671	ネコ	chrA3	4	Fe9.0	82	4	GAGTCTTAGGCATGCCGTGT	CGG
IL1B	672	ネコ	chrA3	4	Fe9.0	81.8	14	AAACCTGAGCCACAGTTTTC	TGG
IL1B	673	ネコ	chrA3	2	Fe9.0	80.7	17	ATCATTTCACTGGTGAGTTC	AGG
IL1B	674	ネコ	chrA3	4	Fe9.0	80.4	18	ACTCTTGTTGTCGGGCTGGT	GGG
IL1B	675	ネコ	chrA3	4	Fe9.0	80.1	14	GACTCTTGTTGTCGGGCTGG	TGG
IL1B	676	ネコ	chrA3	4	Fe9.0	76.7	24	CCTCATCTCCCAGAAAACTG	TGG
IL1B	677	ネコ	chrA3	3	Fe9.0	76	23	TGAGAATGACCTGTTCTTTG	AGG
IL1B	678	ネコ	chrA3	4	Fe9.0	75.7	5	TAAGACTCTTGTTGTCGGGC	TGG
IL1B	679	ネコ	chrA3	4	Fe9.0	74.3	18	AACCTGAGCCACAGTTTTCT	GGG

【表３８】

表１６

遺伝子	種	Ensemble	転写	Transcript_ID	場所
IL1A	ヒト	ENSG00000115008	IL1A-201	ENST00000263339.4	染色体 2:112,773,925-112,784,493
IL1A	マウス	ENSMUSG00000027399	Il1a-201	ENSMUST00000028882.1	染色体 2:129,299,610-129,309,972
IL1A	ネコ	ENSFCAG00000008095	IL1A-201	ENSFCAT00000008097.5	染色体 A3:105,113,193-105,121,209
IL1A	イヌ	ENSCAFG00000007245	IL1A-201	ENSCAFT00000045928.3	染色体 17:36,970,573-36,978,736
IL1A	ウマ	ENSECAG00000023727	IL1A-202	ENSECAT00000025409.2	Primary_assembly 15:16,360,700-16,369,812
IL1B	ヒト	ENSG00000125538	IL1B-201	ENST00000263341.7	染色体 2:112,829,751-112,836,779
IL1B	マウス	ENSMUSG00000027398	Il1b-201	ENSMUST00000028881.13	染色体 2:129,364,570-129,371,139
IL1B	ネコ	ENSFCAG00000005899	IL1B-201	ENSFCAT00000005904.5	染色体 A3:105,049,334-105,056,407
IL1B	イヌ	ENSCAFG00000007249	IL1B-201	ENSCAFT00000011613.4	染色体 17:37,019,329-37,024,176
IL1B	ウマ	ENSECAG00000000051	IL1B-202	ENSECAT00000061518.2	Primary_assembly 15:16,418,738-16,444,697

【０４９５】

実施例７．マウスＩＬ－１βの免疫組織化学

免疫組織化学をマウス滑膜組織に対して実施して、以下のプロトコルに従ってＩＬ－１βを検出した：

【０４９６】

試薬及び調製物

１．０．５％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ－２０を有する１０×ＰＢＳ

２．滅菌ＰＢＳ

３．ＩＨＣ緩衝液

４．一次抗体（ヤギ抗マウスＩＬ－１、ＡＦ－４０１－ＮＡ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．）を、滅菌ＰＢＳ中で０．２ｍｇ／ｍｌの最終濃度に再構築した。
ａ．＋４Ｃにおける短期保管
ｂ．－２０～－７０Ｃにおける長期保管
５．対照抗体（正常なヤギＩｇＧ、ＡＢ－１０８－Ｃ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．）を、滅菌ＰＢＳ中で１ｍｇ／ｍｌの最終濃度に再構築する。
ａ．＋４Ｃにおける短期保管
ｂ．－２０～－７０Ｃにおける長期保管
６．二次抗体（ＨＲＰコンジュゲートロバ抗ヤギＩｇＧ、ａｂ６８８５、Ａｂｃａｍ）が再構築産物としてもたらされる
ａ．＋４Ｃにおける短期保管
ｂ．－２０～－７０Ｃにおける長期保管
７．ペルオキシダーゼブロック（ＢＬＯＸＡＬＬ試薬、Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）
８．２．５％（ｖ／ｖ）に希釈された正常ウマ血清（Ｉｍｐｒｅｓｓ　Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｋｉｔ、Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）
９．ＤＡＢ色素原

【０４９７】

方法

抗原の回収を１時間（手動又は自動、ユーザ選好）実施し、次いで、試料を短期保管のためにＰＢＳに移した。ペルオキシダーゼブロックを室温で１０分間実施し、その後、試料をＩＨＣ緩衝液中で５分間洗浄した。試料を、対照ウマ血清を用いて室温で６０分間ブロックし、一次抗体（１×ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ中で１：１００又は１：２００に希釈された）に室温で２時間曝露した。試料をＩＨＣ緩衝液中で２回、５分間洗浄した（各洗浄）。次いで、試料を二次抗体（１×ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ中で１：５００に希釈された）に１時間曝露し、ＩＨＣ緩衝液中で２回、５分間洗浄した（各洗浄）。検出は、ＤＡＢ色素原を用いて３０秒間実施された。対比染色をＭａｙｅｒのヘマトキシリン（６分）で実施し、試料を等級分けされたアルコールシリーズを通してキシレンに戻した。ＤＰＸ封入剤を適用し、カバースリップを取り付けた。

【０４９８】

図１０に示されるように、滑膜組織中のマウスＩＬ－１βの免疫組織化学データは、ＣＲＩＳＰＲ処理動物における低減されたＩＬ－１β発現を示した。（Ａ）ＰＢＳで前処理されたＭＳＵ注射された動物では、ＩＬ－１βの強固な発現（褐色染色）が存在する。この効果は、ＣＲＩＳＰＲ処理動物（パネルＣ）には見られない。ＣＲＩＳＰＲ処理された動物におけるＩＬ－１β（褐色染色）の不在は、陰性抗体対照（パネルＢ及びＤ）に類似している。全ての画像は、１０×オリジナル倍率である。（Ａ）及び（Ｂ）は、同じ動物の同じ関節から採取された隣接断片であり、（Ａ）は、ＩＬ－１ベータに特異的に標識された組織を示し、（Ｂ）は、陰性（同位体）対照抗体で標識された組織を示す。染色の差異は、この動物においてＰＢＳで前処理されたＭＳＵ注射された動物（例えば、ＰＢＳで前処理され、次いで、ＭＳＵ結晶でチャレンジされた陽性対照動物）における、実証可能なＩＬ－１ベータ発現を反映する。（Ｃ）及び（Ｄ）は、同様に隣接断片であるが、ＭＳＵ注射前にＣＲＩＳＰＲ編集ウイルスで前処理された動物由来のものである。（Ｃ）ＩＬ－１抗体で処理された切片にはＩＬ－１ベータに対する明らかな染色は存在せず、（Ｄ）陰性（同位体）対照抗体で処理された切片に同じ陰性パターンが見られる。いかなる特定の理論によっても拘束されることを望むものではないが、これは、ＣＲＩＳＰＲ処理された動物の滑膜に検出可能なＩＬ－１ベータ発現が存在しないことを確認する。

【０４９９】

実施例８．イヌ及びヒトインターロイキン－１アルファ（ＩＬ－１α）及びインターロイキン－１ベータ（ＩＬ－１β）に対するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９　ＲＮＡガイドの設計及び検証。

可能性のあるｃｒＲＮＡ配列を、ヒト及びイヌのインターロイキン－１アルファ（ＩＬ－１α）及びインターロイキン－１ベータ（ＩＬ－１β）遺伝子の様々なエクソンに対して識別した。図１３Ａ～図１３Ｄは、ヒトＩＬ－１α遺伝子のエクソン２～７から識別されたｃｒＲＮＡ配列のランク付けされたリストを示す。図１４Ａ～図１４Ｅは、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン２～７から識別されたｃｒＲＮＡ配列のランク付けされたリストを示す。図１５Ａ～図１５Ｃは、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン３～５から識別されたｃｒＲＮＡ配列を示す。図１６Ａ及び図１６Ｂは、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン３～５から識別されたｃｒＲＮＡ配列を示す。

【０５００】

次いで、公的にアクセス可能なゲノム（ヒト、ｈｇ３８、イヌ、ＣａｎＦａｍ３．１）、折り畳み遺伝子モデル（併合Ｅｎｓｅｍｂｌ／Ｈａｖａｎａ）、組織特異的エクソン発現（ｇｔｅｘｐｏｒｔａｌ．ｏｒｇ）、及び様々なｇＲＮＡモデルを使用して、イヌ及びヒトインターロイキン－１アルファ（ＩＬ－１α）及びインターロイキン－１ベータ（ＩＬ－１β）を標的とする、遺伝子当たり２～５個の個別のｃｒＲＮＡ配列を選択した。以下のｇＲＮＡ設計規則を適用した：

１．ｇＲＮＡ標的領域は、コード配列（ＣＤＳ）の最初の５～５０％に限定された。

２．シングルｇＲＮＡを、Ａｚｉｍｕｔｈ　２．０モデル（１０．１０３８／ｎｂｔ．３４３７）を使用する最大オンターゲット編集、及びＣｕｔｔｉｎｇ　Ｆｒｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ（ＣＦＤ）（１０．１０３８／ｎｂｔ．３４３７）を使用する最小オフターゲット編集、及びＨｓｕ　ｅｔ　ａｌ．からの特異性スコア（１０．１０３８／ｎｂｔ．２６４７）に従ってランク付けした。

３．ｉｎＤｅｌｐｈｉ（１０．１０３８／ｓ４１５８６－０１８－０６８６－ｘ）によって予測されるように、高フレームシフト頻度（＞７５％）及び均一なＤＮＡ修復結果（＞０．４８）を有する高ランクのｓｇＲＮＡを、インビトロ合成のために選択した。

【０５０１】

この選択基準を使用して、それぞれの標的遺伝子の異なるエクソンを標的とするｃｒＲＮＡガイド配列を、更なる調査のために選択した。具体的に、図１７Ａに示されるように、ヒトＩＬ－１α遺伝子のｓｇ２３５（配列番号３０１）及びｓｇ２３６（配列番号３０９）標的エクソン３及び４を選択した。同様に、図１７Ｂに示されるように、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、４、及び５を標的とする、ｓｇ２３７（配列番号４６２）、ｓｇ２３８（配列番号３９１）、ｓｇ２４８（配列番号３９３）、ｓｇ２４９（配列番号３８８）、及びｓｇ２５０（配列番号３８９）を選択した。図１７Ｃに示されるように、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、４、及び５を標的とするｓｇ２３９（配列番号５５２）、ｓｇ２４０（配列番号５５４）、ｓｇ２５１（配列番号５７８）、及びｓｇ２５２（配列番号５７９）を選択した。同様に、図１７Ｄに示されるように、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン３及び４を標的とするｓｇ２４１（配列番号４９８）及びｓｇ２４２（配列番号５０６）を選択した。

【０５０２】

次いで、選択されたｃｒＲＮＡガイド配列を足場配列に融合するシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を、それらの安定性を増加させ、それらの細胞免疫原性を減少させるように設計された足場修飾を用いて合成した（Ｓｙｎｔｈｅｇｏ）。遺伝子型決定のためのプライマーは、標的部位から少なくとも２００ｂｐとなり、＜１．５ｋｂのＰＣＲアンプリコンを生成するように設計され、合成された（Ｍｅｒｃｋ）。

【０５０３】

以下の数量を４Ｄ－ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ、カタログＡＡＦ－１００２Ｂ及びＡＡＦ－１００２Ｘ）並びにヌクレオキュベットストリップを使用した単一の電気穿孔ベースのトランスフェクションに使用した。８０ｐｍｏｌの合成されたｓｇＲＮＡを、室温で少なくとも１０分間、４μｇのＣａｓ９ヌクレアーゼで事前複合体化した。３００～４００Ｋの解離細胞を、２０μｌの補充されたＰ３ヌクレオフェクション溶液に再懸濁し、Ｃａｓ９　ＲＮＰ複合体を添加する前にＰＢＳで洗浄した。次いで、これらの細

胞をヌクレオキュベットウェルに移し、パルスコードＥＲ－１００を使用して電気穿孔した。電気穿孔の直後に、ヌクレオキュベットを、細胞が電圧から回復するために、３７℃／５％のＣＯ２インキュベーターに１０分間置いた。その後、８０μｌの成長培地をヌクレオキュベットウェルに追加し、細胞を、予め温められた成長培地を有する６つのウェルディッシュに移した。

【０５０４】

電気穿孔の２日後～１１日後の間、ＤＮｅａｓｙ Ｂｌｏｏｄ＆Ｔｉｓｓｕｅキット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ６９５０６）を使用して５０～２００Ｋ細胞からゲノムＤＮＡを抽出した。シングルｇＲＮＡ標的（及びオフターゲット）領域を、ＰＣＲによって増幅した。

【０５０５】

ＰＣＲ産物を、ゲル電気泳動によってサイズ検証し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ ＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ２８１０６）を使用して精製し、Ｓｏｕｒｃｅ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅにおけるＳａｎｇｅｒシーケンシングのために提出した。Ｓａｎｇｅｒトレース（ａｂ１）を、ＩＣＥバージョン１．２（ＵＲＬ ｇｉｔｈｕｂ．ｃｏｍ／ｓｙｎｔｈｅｇｏ－ｏｐｅｎ／ｉｃｅにおいてオンラインで見つかる）を使用して逆畳み込みし、ＣＲＩＳＰＲ編集を推測した。加えて、選択されたプローブを使用した遺伝子編集の機械学習予測を、ｉｎＤｅｌｐｈｉを使用して生成した。加えて、予測されたオフターゲット部位を、直接シーケンシングを通じて分析して、ｇＲＮＡがオフターゲット編集を容易にするか否かを検証した。

【０５０６】

選択されたガイド配列を使用する遺伝子編集の経験的実験及び機械学習予測の結果が、図１７に示される。

【０５０７】

実施例９．－イヌ及びヒトインターロイキン－１アルファ（ＩＬ－１α）及びインターロイキン－１ベータ（ＩＬ－１β）放出に対する選択されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ ＲＮＡガイドの効果。

実施例８からの最高のノックアウト（ＫＯ）スコア（すなわち、最高のフレームシフト頻度）を有するｇＲＮＡを使用して、二重ＩＬ－１α／ＩＬ－１βノックアウト（ＫＯ）細胞を生成した。具体的には、ヒト軟骨細胞を編集して、ｃｒＲＮＡ配列ＣＡＧＡＧＡＣＡＧＡＵＧＡＵＣＡＡＵＧＧ（配列番号３０１）を使用して＞９９％のＩＬ－１α ＫＯ、及びｃｒＲＮＡ配列ＧＵＧＣＡＧＵＵＣＡＧＵＧＡＵＣＧＵＡＣ（配列番号３８９）を使用して６７％のＩＬ－１β ＫＯを達成した。イヌ軟骨細胞を編集して、ｃｒＲＮＡ配列ＧＡＣＡＵＣＣＣＡＧＣＵＵＡＣＣＵＵＣＡ（配列番号５５４）を使用して９７％のＩＬ－１α ＫＯ、及びｃｒＲＮＡ配列ＡＣＵＣＵＵＧＵＵＡＣＡＧＡＧＣＵＧＧＵ（配列番号５０６）を使用して９９％のＩＬ－１β ＫＯを達成した。

【０５０８】

イヌ軟骨細胞（カタログＣｎ４０２Ｋ－０５）、ヒト軟骨細胞（カタログ４０２－０５ａ）、及びヒト線維芽細胞様滑膜細胞（カタログ４０８－０５ａ）を、Ｃｅｌｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｉｎｃ．、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡから凍結ストック（５×１０＾５細胞）として購入した。軟骨細胞を、２０％（ｖ／ｖ）の未処理ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ１０２７０－１０６）及び１×ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ３５０５０－０３８）で補充されたＤＭＥＭ／ＨａｍのＦ１２（Ｇｉｂｃｏ、カタログ２１３３１－０２０）からなる成長培地中で培養した。滑膜細胞を、ＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ１１９６０－０４４）、１０％の未処理ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ１０２７０－１０６）、及び１×ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ３５０５０－０３８）からなる成長培地中で培養した。細胞を、使用前に、Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｐｐ．に対して陰性であることを確認し、ＳＴＲプロファイリングに供した。電気穿孔及び継代培養について、細胞を、０．２５％トリプシン（Ｇｉｂｃｏ、カタログ２５２０００５６）を使用して解離させた。トリプシンを９体積の成長培地でクエンチし、細胞を１，０００ｇ

で遠心分離して上清を除去した。

【０５０９】

ＬＰＳによるＩＬ－１の誘導。インターロイキン－１の放出を、細胞のサブコンフルエントな単層（編集された又は野生型非編集）をリポ多糖（ＬＰＳ）に曝露することによって誘発した。簡潔に述べると、非編集（対照）及び二重ＩＬ－１α／ＩＬ－１β　ＫＯ（編集された）ヒト又はイヌ軟骨細胞を、２４個のウェルプレート中で約５×１０^{4}細胞／ウェルの密度で播種した。２４～４８時間後、培地を、ＬＰＳ（５０ｕｇ／ｍｌ）又はＰＢＳビヒクルのいずれかを含有する新鮮な無血清培地で置換し、プレートをインキュベーターに戻した。ＩＬ－１の放出の決定のために、プレートを６及び２４時間後に採取した。培地を液体窒素中で瞬間凍結し、それらがアッセイされるまで－２０℃で保管した。

【０５１０】

ＩＬ－１アルファ及びＩＬ－１ベータの放出の測定。培養培地中のＩＬ－１アルファ及びＩＬ－１ベータの濃度を、製造業者の説明書に従って、種特異的市販アッセイで測定した。測定前に、凍結培地を解凍し、次いで、細胞残骸を除去するために遠心分離した（１，５００ｇ、２分間）。培地のアリコートを２回測定し、必要に応じて、組換えヒト又はイヌＩＬ－１アルファ又はベータの標準曲線からＩＬ－１の濃度を決定した。イヌ細胞におけるＩＬ－１アルファの放出の結果が、図１８Ａ（６時間）及び図１８Ｂ（２４時間）に示される。イヌ細胞におけるＩＬ－１ベータの放出の結果が、図１８Ｃ（６時間）及び図１８Ｄ（２４時間）に示される。ヒト細胞におけるＩＬ－１アルファの放出の結果が、図１９Ａ（６時間）及び図１９Ｂ（２４時間）に示される。ヒト細胞におけるＩＬ－１ベータの放出の結果が、図１９Ｃ（６時間）及び図１９Ｄ（２４時間）に示される。

【０５１１】

Ｐ３一次細胞ヌクレオフェクション試薬及びヌクレオキュベットストリップ（カタログＶ４ＸＰ－３０３２）を、Ｌｏｎｚａ（Ｓｌｏｕｇｈ、ＵＫ）から購入した。Ｃａｓ９ヌクレアーゼ（カタログＡ３６４９９）をＴｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから購入した。Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｏ５５：Ｂ５（カタログＬ６５２９）からのリポ多糖（ＬＰＳ）をＭｅｒｃｋから購入した。ヒトＩＬ－１アルファ（カタログａｂ２１４０２５）及びヒトＩＬ－１ベータ（カタログａｂ１００５６０）、イヌＩＬ－１アルファ（カタログＡ４２７０）、及びイヌＩＬ－１ベータ（カタログａｂ２７３１７０）のためのＥＬＩＳＡキットを、Ａｂｃａｍ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）から購入した。

【０５１２】

実施例１０．ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９媒介遺伝子編集の増加した特異性。

実施例８で報告された遺伝子編集特異性の分析を、強化された特異性ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質９を使用して繰り返した。ｅＳｐＣａｓ９は、以下の３つの特異性増強変異、Ｋ８４８Ａ、Ｋ１００３Ａ、及びＲ１０６０Ａを含み、Ｓｌａｙｍａｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，３５１：８４－８８（２０１６）に説明される。ｅＳｐＣａｓ９をＥ．ｃｏｌｉで発現させ、均質に精製した。構築物は、１６１ｋＤａの分子量を有し、Ｎ末端フラグタグ及びＣ末端ヘキサＨｉｓタグを含有する。ｅＳｐＣａｓ９の配列は：

ＭＤＹＫＤＨＤＧＤＹＫＤＨＤＩＤＹＫＤＤＤＤＫＭＡＰＫＫＫＲＫＶＧＩＨＧＶＰＡＡ
ＤＫＫＹＳＩＧＬＤＩＧＴＮＳＶＧＷＡＶＩＴＤＥＹＫＶＰＳＫＫＦＫＶＬＧＮＴＤＲＨ
ＳＩＫＫＮＬＩＧＡＬＬＦＤＳＧＥＴＡＥＡＴＲＬＫＲＴＡＲＲＲＹＴＲＲＫＮＲＩＣＹ
ＬＱＥＩＦＳＮＥＭＡＫＶＤＤＳＦＦＨＲＬＥＥＳＦＬＶＥＥＤＫＫＨＥＲＨＰＩＦＧＮ
ＩＶＤＥＶＡＹＨＥＫＹＰＴＩＹＨＬＲＫＫＬＶＤＳＴＤＫＡＤＬＲＬＩＹＬＡＬＡＨＭ
ＩＫＦＲＧＨＦＬＩＥＧＤＬＮＰＤＮＳＤＶＤＫＬＦＩＱＬＶＱＴＹＮＱＬＦＥＥＮＰＩ
ＮＡＳＧＶＤＡＫＡＩＬＳＡＲＬＳＫＳＲＲＬＥＮＬＩＡＱＬＰＧＥＫＫＮＧＬＦＧＮＬ
ＩＡＬＳＬＧＬＴＰＮＦＫＳＮＦＤＬＡＥＤＡＫＬＱＬＳＫＤＴＹＤＤＤＬＤＮＬＬＡＱ
ＩＧＤＱＹＡＤＬＦＬＡＡＫＮＬＳＤＡＩＬＬＳＤＩＬＲＶＮＴＥＩＴＫＡＰＬＳＡＳＭ
ＩＫＲＹＤＥＨＨＱＤＬＴＬＬＫＡＬＶＲＱＱＬＰＥＫＹＫＥＩＦＦＤＱＳＫＮＧＹＡＧ
ＹＩＤＧＧＡＳＱＥＥＦＹＫＦＩＫＰＩＬＥＫＭＤＧＴＥＥＬＬＶＫＬＮＲＥＤＬＬＲＫ
ＱＲＴＦＤＮＧＳＩＰＨＱＩＨＬＧＥＬＨＡＩＬＲＲＱＥＤＦＹＰＦＬＫＤＮＲＥＫＩＥ

ＫＩＬＴＦＲＩＰＹＹＶＧＰＬＡＲＧＮＳＲＦＡＷＭＴＲＫＳＥＥＴＩＴＰＷＮＦＥＥＶ
ＶＤＫＧＡＳＡＱＳＦＩＥＲＭＴＮＦＤＫＮＬＰＮＥＫＶＬＰＫＨＳＬＬＹＥＹＦＴＶＹ
ＮＥＬＴＫＶＫＹＶＴＥＧＭＲＫＰＡＦＬＳＧＥＱＫＫＡＩＶＤＬＬＦＫＴＮＲＫＶＴＶ
ＫＱＬＫＥＤＹＦＫＫＩＥＣＦＤＳＶＥＩＳＧＶＥＤＲＦＮＡＳＬＧＴＹＨＤＬＬＫＩＩ
ＫＤＫＤＦＬＤＮＥＥＮＥＤＩＬＥＤＩＶＬＴＬＴＬＦＥＤＲＥＭＩＥＥＲＬＫＴＹＡＨ
ＬＦＤＤＫＶＭＫＱＬＫＲＲＲＹＴＧＷＧＲＬＳＲＫＬＩＮＧＩＲＤＫＱＳＧＫＴＩＬＤ
ＦＬＫＳＤＧＦＡＮＲＮＦＭＱＬＩＨＤＤＳＬＴＦＫＥＤＩＱＫＡＱＶＳＧＱＱＧＤＳＬＨ
ＥＨＩＡＮＬＡＧＳＰＡＩＫＫＧＩＬＱＴＶＫＶＶＤＥＬＶＫＶＭＧＲＨＫＰＥＮＩＶＩ
ＥＭＡＲＥＮＱＴＴＱＫＧＱＫＮＳＲＥＲＭＫＲＩＥＥＧＩＫＥＬＧＳＱＩＬＫＥＨＰＶ
ＥＮＴＱＬＱＮＥＫＬＹＬＹＹＬＱＮＧＲＤＭＹＶＤＱＥＬＤＩＮＲＬＳＤＹＤＶＤＨＩ
ＶＰＱＳＦＬＡＤＤＳＩＤＮＫＶＬＴＲＳＤＫＮＲＧＫＳＤＮＶＰＳＥＥＶＶＫＫＭＫＮ
ＹＷＲＱＬＬＮＡＫＬＩＴＱＲＫＦＤＮＬＴＫＡＥＲＧＧＬＳＥＬＤＫＡＧＦＩＫＲＱＬ
ＶＥＴＲＱＩＴＫＨＶＡＱＩＬＤＳＲＭＮＴＫＹＤＥＮＤＫＬＩＲＥＶＫＶＩＴＬＫＳＫ
ＬＶＳＤＦＲＫＤＦＱＦＹＫＶＲＥＩＮＮＹＨＨＡＨＤＡＹＬＮＡＶＶＧＴＡＬＩＫＫＹ
ＰＡＬＥＳＥＦＶＹＧＤＹＫＶＹＤＶＲＫＭＩＡＫＳＥＱＥＩＧＫＡＴＡＫＹＦＦＹＳＮ
ＩＭＮＦＦＫＴＥＩＴＬＡＮＧＥＩＲＫＡＰＬＩＥＴＮＧＥＴＧＥＩＶＷＤＫＧＲＤＦＡ
ＴＶＲＫＶＬＳＭＰＱＶＮＩＶＫＫＴＥＶＱＴＧＧＦＳＫＥＳＩＬＰＫＲＮＳＤＫＬＩＡ
ＲＫＫＤＷＤＰＫＫＹＧＧＦＤＳＰＴＶＡＹＳＶＬＶＶＡＫＶＥＫＧＫＳＫＫＬＫＳＶＫ
ＥＬＬＧＩＴＩＭＥＲＳＳＦＥＫＮＰＩＤＦＬＥＡＫＧＹＫＥＶＫＫＤＬＩＩＫＬＰＫＹ
ＳＬＦＥＬＥＮＧＲＫＲＭＬＡＳＡＧＥＬＱＫＧＮＥＬＡＬＰＳＫＹＶＮＦＬＹＬＡＳＨ
ＹＥＫＬＫＧＳＰＥＤＮＥＱＫＱＬＦＶＥＱＨＫＨＹＬＤＥＩＩＥＱＩＳＥＦＳＫＲＶＩ
ＬＡＤＡＮＬＤＫＶＬＳＡＹＮＫＨＲＤＫＰＩＲＥＱＡＥＮＩＩＨＬＦＴＬＴＮＬＧＡＰ
ＡＡＦＫＹＦＤＴＴＩＤＲＫＲＹＴＳＴＫＥＶＬＤＡＴＬＩＨＱＳＩＴＧＬＹＥＴＲＩＤ
ＬＳＱＬＧＧＤＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫＡＡＡＬＥＨＨＨＨＨＨ（配列番号６
８０）。

【０５１３】

簡潔に述べると、実施例８で使用され、かつ図１７に示される同じｓｇＲＮＡを、ｅＳｐＣａｓ９と複合体化した。図１７Ａに示されるように、ヒトＩＬ－１α遺伝子のｓｇ２３５（配列番号３０１）及びｓｇ２３６（配列番号３０９）標的エクソン３及び４を使用した。同様に、図１７Ｂに示されるように、ヒトＩＬ－１β遺伝子のエクソン３、４、及び５を標的とする、ｓｇ２３７（配列番号４６２）、ｓｇ２３８（配列番号３９１）、ｓｇ２４８（配列番号３９３）、ｓｇ２４９（配列番号３８８）、及びｓｇ２５０（配列番号３８９）を使用した。図１７Ｃに示されるように、イヌＩＬ－１α遺伝子のエクソン３、４、及び５を標的とするｓｇ２３９（配列番号５５２）、ｓｇ２４０（配列番号５５４）、ｓｇ２５１（配列番号５７８）、及びｓｇ２５２（配列番号５７９）を使用した。同様に、図１７Ｄに示されるように、イヌＩＬ－１β遺伝子のエクソン３及び４を標的とするｓｇ２４１（配列番号４９８）及びｓｇ２４２（配列番号５０６）を使用した。

【０５１４】

次いで、選択されたｃｒＲＮＡガイド配列を足場配列に融合するシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を、それらの安定性を増加させ、それらの細胞免疫原性を減少させるように設計された足場修飾を用いて合成した（Ｓｙｎｔｈｅｇｏ）。遺伝子型決定のためのプライマーは、標的部位から少なくとも２００ｂｐとなり、＜１．５ｋｂのＰＣＲアンプリコンを生成するように設計され、合成された（Ｍｅｒｃｋ）。

【０５１５】

以下の数量を４Ｄ－ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ、カタログＡＡＦ－１００２Ｂ及びＡＡＦ－１００２Ｘ）並びにヌクレオキュベットストリップを使用した単一の電気穿孔ベースのトランスフェクションに使用した。８０ｐｍｏｌの合成されたｓｇＲＮＡを、室温で少なくとも１０分間、ｅＳｐＣａｓ９ヌクレアーゼで事前複合体化した。３００～４００Ｋの解離細胞を、２０μｌの補充されたＰ３ヌクレオフェクション溶液に再懸濁し、Ｃａｓ９　ＲＮＰ複合体を添加する前にＰＢＳで洗浄した。次いで、これらの細胞

をヌクレオキュベットウェルに移し、パルスコードＥＲ－１００を使用して電気穿孔した。電気穿孔の直後に、ヌクレオキュベットを、細胞が電圧から回復するために、３７℃／５％のＣＯ２インキュベーターに１０分間置いた。その後、８０μｌの成長培地をヌクレオキュベットウェルに追加し、細胞を、予め温められた成長培地を有する６つのウェルディッシュに移した。

【０５１６】

電気穿孔の２日後～１１日後の間、ＤＮｅａｓｙ Ｂｌｏｏｄ＆Ｔｉｓｓｕｅキット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ６９５０６）を使用して５０～２００Ｋ細胞からゲノムＤＮＡを抽出した。シングルｇＲＮＡ標的（及びオフターゲット）領域を、ＰＣＲによって増幅した。

【０５１７】

ＰＣＲ産物を、ゲル電気泳動によってサイズ検証し、ＱＩＡｑｕｉｃｋ ＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ２８１０６）を使用して精製し、Ｓｏｕｒｃｅ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅにおけるＳａｎｇｅｒシーケンシングのために提出した。Ｓａｎｇｅｒトレース（ａｂ１）を、ＩＣＥバージョン１．２（ＵＲＬ ｇｉｔｈｕｂ．ｃｏｍ／ｓｙｎｔｈｅｇｏ－ｏｐｅｎ／ｉｃｅにおいてオンラインで見つかる）を使用して逆畳み込みし、ＣＲＩＳＰＲ編集を推測した。加えて、選択されたプローブを使用した遺伝子編集の機械学習予測を、ｉｎＤｅｌｐｈｉを使用して生成した。加えて、予測されたオフターゲット部位を、直接シーケンシングを通じて分析して、ｇＲＮＡがオフターゲット編集を容易にするか否かを検証した。

【０５１８】

実施例８で報告されたＣａｓ９編集と比較して、ｅＳｐＣａｓ９の使用は、オンターゲット活性を失わずに、オフターゲット編集を低減する。例えば、それぞれ、２、３、及び３のミスマッチを有する３つの遺伝子座のｓｇＲＮＡ＃２４２（標的化イヌＩＬ－１Ｂ）によるオフターゲット編集を、表１８に報告される遺伝子座を増幅し、次いで、シーケンシングすることによって評価した。表１８に示されるように、第１のオフターゲット遺伝子座は、実施例８に説明される実験において編集を経験せず、ここでは試験されなかった。第２のオフターゲット遺伝子座は、実施例８に説明された実験においてほぼ完全なオフターゲット編集（９８～９９％）を経験したが、ｅＳｐＣａｓ９が使用されたときに編集を経験しなかった。第３のオフターゲット遺伝子座は、実施例８に説明された実験において一部の編集（０～２５％）を経験したが、ｅＳｐＣａｓ９が使用されたときに同様に編集を経験しなかった。更に、表１７に示されるように、この実施例に説明されるｅＳｐＣａｓ９を使用した編集に対応する「増強されたオンターゲットスコア」は、試験された各ｓｇＲＮＡについて、実施例８に説明される編集に対応する「オンターゲットスコア」と同等かそれ以上の高さであった。

【表３９－１】

表１６

遺伝子	種	Ensemble	転写	Transcript_ID	場所
IL1A	ヒト	ENSG00000115008	IL1A-201	ENST00000263339.4	染色体2:112,773,925-112,784,493
IL1A	マウス	ENSMUSG00000027399	Il1a-201	ENSMUST00000028882.1	染色体2:129,299,610-129,309,972
IL1A	ネコ	ENSFCAG00000008095	IL1A-201	ENSFCAT00000008097.5	染色体A3:105,113,193-105,121,209
IL1A	イヌ	ENSCAFG00000007245	IL1A-201	ENSCAFT00000045928.3	染色体17:36,970,573-36,978,736
IL1A	ウマ	ENSECAG00000023727	IL1A-202	ENSECAT00000025409.2	Primary_assembly 15:16,360,700-16,369,812
IL1B	ヒト	ENSG00000125538	IL1B-201	ENST00000263341.7	染色体2:112,829,751-112,836,779
IL1B	マウス	ENSMUSG00000027398	Il1b-201	ENSMUST00000028881.13	染色体2:129,364,570-129,371,139
IL1B	ネコ	ENSFCAG00000005899	IL1B-201	ENSFCAT00000005904.5	染色体A3:105,049,334-105,056,407
IL1B	イヌ	ENSCAFG00000007249	IL1B-201	ENSCAFT00000011613.4	染色体17:37,019,329-37,024,176
IL1B	ウマ	ENSECAG00000000051	IL1B-202	ENSECAT00000061518.2	Primary_assembly 15:16,418,738-16,444,697

【表３９－２】

イヌIL1B(IL1B-201、CanFam3.1)						
	標的		オンターゲット指標			オフターゲット指標
#	エクソン番号	鎖	オンターゲットスコア*	精度スコア**	フレームシフト%***	増強されたオンターゲットスコア****	オフターゲットスコア^
sg241	3	+	66.1	0.53	91.2	69.1	51.5
sg242	4	-	68.9	0.64	84	71.5	62

【表４０】

表１８

配列	PAM	スコア	遺伝子	染色体	鎖	位置	ミスマッチ	Cas9によるCRISPR編集	増強された特異性Cas9によるCRISPR編集
ACTCTTGTTACAGAGCTGGT	GGG	100	ENSCAFG00000007249	chr17	1	37022194	0		
ACTTTTGTTTCAGAGCTGGT	CAG	6.16161972		chr33	-1	20234937	2	0%	
CCTCATGCTACAGAGCTGGT	GGG	2.76564774		chr1	-1	47541563	3	98-99%	0%
GTGCTTGTTACAGAGCTGGT	GGG	2.32143742		chr26	-1	32323843	3	0-25%	0%

【０５１９】

実施例１１．－ヒト及びイヌ患者におけるＩＬ１ａ及びＩＬ１ｂを標的とするｇＲＮＡの選択

ＣＲＩＳＰＲ標的設計の最終目的が、ゲノムＤＮＡ配列にハイブリダイズして、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムの一部として標的化遺伝子の最も堅牢なノックアウトをもたらすヌクレオチド配列の製造であることを考慮すると、プロセスは、標的遺伝子座でのスプライシングの評価から始まる。ヒトＩＬ－１ａ（ｈＩＬ－１ａ）は、エクソン２～７を含む成熟ｍＲＮＡを有する様々な組織型にわたってほぼ排他的な正準スプライシング（すなわち、主要なバリアントなし）を示し、これらの各々を潜在的なＣＲＩＳＰＲ　ｇＲＮＡ標

的とする（図２０）。ｈＩＬ－１ａ遺伝子の追加の機能分析（Ｍｉｃｈｌｉｔｓ，ｅｔａｌ．（２０２０）．Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ，１７（７），７０８－７１６を参照されたい）は、全ての機能ドメインがエクソン５～７内にクラスター形成することを示した。残りの編集後機能性を保持する切断を回避するために、ｈＩＬ－１ａ　ＣＲＩＳＰＲ標的を、機能ドメインクラスターの上流（エクソン２～４）に限定した。そうすることで、編集部位で結果として生じるフレームシフト又は未成熟終止コドン（すなわち、ミスセンス変異）は、全ての機能ドメインに影響を与えることになる。

【０５２０】

ヒトＩＬ－１ｂ（ｈＩＬ－１ｂ）の類似の分析は、ｈＩＬ－１ａと比較して、より強い全体的な発現パターン及びスプライシングのより多くの変動を発見した（図２１）。しかしながら、エクソン２～７を省略するバリアントを示す組織がなかったため、これらの各々は、実行可能なＣＲＩＳＰＲ標的のままであった。ｈＩＬ－１ｂに対する同じ機能分析ツールの適用は、機能ドメインがエクソン５～７にクラスター形成し、エクソン２～４を実行可能なＣＲＩＳＰＲ標的として残すことを見出した。

【０５２１】

ヒト遺伝子標的を確立した後、強調してｇＲＮＡ標的化ドメイン設計に移した。生成されたＣＲＩＳＰＲ標的化ドメインを、少なくとも４つの別個のアルゴリズムを通してインシリコで最初に試験し、切断活性（オンターゲットスコア、Ｄｏｅｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）．Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３４（２），１８４－１９１を参照されたい）、二本鎖切断修復機構を介した特定の変異の再現性（精密スコア、ｉｎＤｅｌｐｈｉ）、フレームシフト変異を作成する可能性（フレームシフトスコア、ｉｎＤｅｌｐｈｉ）、及びｇＲＮＡ結合の特異性（オフターゲットスコア、ＣＲＩＳＰＯＲ）（図２２）を評価するスコアを得た。カットオフは、＞０．３０のオンターゲットスコア、及び０又は１のミスマッチ（最初の２列）の０のオフターゲットスコアに対して設定された。

【０５２２】

次いで、オルソロガスなイヌ遺伝子標的に対して同じ設計プロセスを繰り返した。イヌＩＬ－１ａ（ｃＩＬ－１α）のスプライシング及び機能的分析は、成熟ｍＲＮＡに組み込まれた６つのエクソン（エクソン２～７）を示し、そのエクソン６及び７は機能的ドメインを含む（図２３Ａ）。これにより、エクソン２～５が実行可能なＣＲＩＳＰＲ標的として残る。イヌＩＬ－１ｂ（ｃＩＬ－１ｂ）の成熟ｍＲＮＡは、エクソン２～７を含み、コア機能ドメインはエクソン５～７にクラスター化されている（図２３Ｂ）。したがって、エクソン２～４は、潜在的に実行可能なＣＲＩＳＰＲ標的である。次いで、生成された候補ＣＲＩＳＰＲ標的化ドメインをインシリコで分析し、最小カットオフスコアを超えるものを図２４に示す。

【０５２３】

実施例１２．初代ヒト細胞及びイヌ細胞におけるＩＬ１ａ及びＩＬ１ｂの除去の特徴付け

次いで、アルゴリズムで検証されたｇＲＮＡ標的化ドメインを初代細胞で試験した。簡潔に述べると、選択された標的化ドメインを有するｓｇＲＮＡをコードするプラスミドＤＮＡを、電気穿孔を介してコードされたＣａｓ９プラスミドを有する初代細胞に導入した。次いで、プールされた細胞集団にＤＮＡ抽出及び配列決定を行い、編集効率を評価した。

【０５２４】

図２５に示される結果は、ヒト細胞及びイヌ細胞の両方で広範な編集効率を示す。実際に、各遺伝子標的について、少なくとも１つの標的化ドメインは、（イヌにおいて）異なる細胞型間の再現性を有する効果的な編集（８９％～９９％）を示す。

【０５２５】

しかしながら、遺伝子標的のこの堅牢な編集に加えて、ｃＩＬ－１ｂを標的とするｓｇＲＮＡ２４２も、インシリコ分析によって予想されるように、高レベルのオフターゲット編集を示した（図２６）。これらのオフターゲット効果を補正するために、実験を、操作

された、増強された特異性Ｃａｓ９（ｅＳｐＣａｓ９）で繰り返した。この操作されたＣａｓ９は、以前に観察されたオフターゲット効果を完全に排除したが、一方で標的部位で最大編集効率を依然として維持する（図２７）。これらのデータは、各遺伝子標的のリード候補ｓｇＲＮＡ標的化ドメインが、ヒト（図２８Ａ）及びイヌ（図２８Ｂ）の軟骨細胞における標的化遺伝子座内に一次ミスセンス変異を作成することによって、安全に（すなわち、オフターゲット効果なしに）、かつ確実に遺伝子ノックアウトを生成することができることを示す。

【０５２６】

実施例１３．初代ヒト細胞及びイヌ細胞におけるＩＬ１ａ及びＩＬ１ｂ標的化ｇＲＮＡの同時投与

次に、各個々のｇＲＮＡ標的化ドメインに堅牢で再現性のある有効性が観察されたため、二重ノックアウトを生成するために、リード候補を同時投与の状況で評価した。これを行うために、各ｓｇＲＮＡを、実施例２に記載されるように、イヌの滑膜細胞に同時又は逐次的のいずれかで（いずれかの順序で）投与した。結果は、ｓｇＲＮＡ　２４２が、全ての条件下でｃＩＬ－１ｂをノックアウトするのに非常に効果的であることを示す（図２９）。逆に、ｃＩＬ－１αを標的とするｓｇＲＮＡ　２４０は、同時投与及び二次投与の両方で最初に編集したときに最適な有効性を示し、有効性を約３０％低減した。しかしながら、こうした有意な低減は、生物レベルでの機能性に影響を与えるために必要とされる閾値を超えたままとなる可能性が高い。

【０５２７】

実施例１４．追加の種への拡大

インターロイキン１は、哺乳類間の配列及び機能の両方に関して高度に保存された遺伝子である（Ｄｉｎａｒｅｌｌｏ，Ｃ．Ａ．（１９９１）．Ｂｌｏｏｄ　７７（８）：１６２７－１６５２を参照されたい）。結果として、特定の種について生成され特徴付けられたｇＲＮＡ標的化ドメインは、追加の種のＩＬ－１遺伝子座の効率的な編集をもたらし得る。ヒト、ウマ、イヌ、及びマウスの間の保存されたＩＬ１Ａ（図３０Ａ）及びＩＬ１Ｂ（図３０Ｂ）遺伝子標的位置を発見するためのアライメントは、特定の標的位置で全ての種にわたって比較的少ないミスマッチ塩基対を見出す。例えば、ｃＩＬ－１αを標的とするｓｇＲＮＡ　２３９は、マウスＩＬ－１ａも編集すると予測される。ある特定の条件下での不完全な配列アライメントに耐えるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム内の報告された柔軟性を考慮すると（概して、Ｚｉｓｃｈｅｗｓｋｉ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．（２０１７）．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ａｄｖａｎｃｅｓ，３５（１），９５－１０４を参照されたい）、特定の標的化ドメインに対する種間反応性は、完全に予想される。

【０５２８】

実施例１５．ノックアウトがｃＩＬ－１α遺伝子に及ぼす影響の評価

ガイドｓｇ２３９、ｓｇ２４０、ｓｇ２５１、及びｓｇ２５２を使用して、イヌ軟骨細胞におけるＩＬ－１ａ遺伝子のＣＲＩＳＰＲ媒介性ノックアウトを観察して（実施例１２及び図２８Ｂ）、これらのガイドが、関節の疾患、すなわち、軟骨細胞、単球、及び滑膜細胞における炎症効果を媒介すると考えられるイヌ細胞の範囲において、効果的かつ一貫したＩＬ－１Ａ編集を媒介することができたかどうかを試験した。簡潔に述べると、ｓｇＲＮＡを野生型ＳｐＣａｓ９と予め複合体化し、電気穿孔を介してコードされたＣａｓ９プラスミドを用いて、初代イヌ軟骨細胞（実験ｎ＝３）、単球（実験ｎ＝２）、及び滑膜細胞（実験ｎ＝３）に電気穿孔した。次いで、プールされた細胞集団にＤＮＡ抽出及び配列決定を行い、編集効率を評価した。

【０５２９】

図３１Ａに示されるように、ｓｇ２５２（平均効率＝８１％）、ｓｇ２４０（平均効率＝９０％）、及びｓｇ２３９（平均効率＝７９％）を使用した場合、３つの細胞型全てにわたって効率的な編集が達成された。対照的に、ｓｇ２５１の使用は、ｓｇ２３９、ｓｇ２４０、及びｓｇ２５２の各々よりも高い予測されたオンターゲット編集スコアを有するにもかかわらず、３つの細胞タイプ全てにわたって平均編集効率わずか２５％をもたらし

た（表１７に示される）。次に、観察された編集の均質性を評価した。図３１Ａに示されるように、ｓｇ２５２を用いた編集は、単一のグアニンヌクレオチドのほぼ均質な組み込みをもたらした（編集の９６％）。対照的に、ｓｇ２３９及びｓｇ２４０を用いた編集は、均質性がより低かった。具体的には、ｓｇ２４０を使用した全ての編集の５４％がチミジンヌクレオチドの組み込みをもたらし、ｓｇ２３９を使用した全ての編集の５８％がアデニンヌクレオチドの組み込みをもたらした。

【０５３０】

ｓｇ２３９、ｓｇ２４０、ｓｇ２５１、及びｓｇ２５２によって引き起こされる最も一般的な編集の各々は、単一の塩基付加である。図３１Ｂに示されるように、これらの単一の塩基付加は、アミノ酸位置９１に未成熟終止コドンを導入するアミノ酸位置６１にフレームシフトを引き起こす。ＡｌｐｈａＦｏｌｄ２を使用したタンパク質フォールディングモデリングを実施して、編集によって引き起こされた切断タンパク質が任意のＩＬ－１Ａ構造を保持するかどうかを評価した。図３１Ｃは、野生型ＩＬ－１Ａ（上）及び切断ポリペプチド（下）の予測された構造を示す。見て分かるように、切断タンパク質は非構造化であり、野生型ＩＬ－１Ａのいかなる生物学的機能も保持しないことを示唆する。まとめると、これらの結果は、ＩＬ－１α遺伝子の編集が全てのＩＬ－１α活性を破壊することを示唆する。

【０５３１】

最後に、最も効率的なガイド（ｓｇＲＮＡ２４０）を使用して、イヌ単球ＤＨ８２の２つの二重ＩＬ１Ａ／Ｂ　ＫＯ株を生成し、少なくとも９６％のＩＬ１Ａ及び９９％のＩＬ１Ｂノックアウトスコアを達成した。

【０５３２】

実施例１６．ｃＩＬ－１α遺伝子を標的とするガイドＲＮＡの比較分析

低いオフターゲット編集効果を有するＩＬ－１Ａを標的とする追加のｓｇＲＮＡを特定するために、オフターゲットスコアのインシリコ予測に基づいて、４つの追加の推定標的配列を特定した。図３２は、以前に生成された４つの抗ＩＬ－１Ａ　ｓｇＲＮＡ：ｓｇ２３９（ＯＣＡ０１と改名）、ｓｇ２４０（ＯＣＡ０３と改名）、ｓｇ２５１（ＯＣＡ０７と改名）、及びｓｇ２５２（ＯＣＡ０８と改名）の標的配列、並びに低い予測されたオフターゲット効果を有する新たに生成された４つのｓｇＲＮＡ：ｓｇ３５８（ＯＣＡ０５と改名）、ｓｇ３５９（ＯＣＡ０４と改名）、ｓｇ３６０（ＯＣＡ０２と改名）、及びｓｇ３６１（ＯＣＡ０６と改名）の標的配列を示す。簡潔に述べると、推定標的配列を、オンターゲット編集効率、オフターゲット編集効果、及びフレームシフト編集の各々について、複数のモデルによって評価した。各推定標的配列のスコアを図３２Ｂに示す。

【０５３３】

オフターゲット編集効果は、ＭＩＴモデル及びＣＦＤモデルによって生成されたスコアを平均化することによって予測された。ＭＩＴアルゴリズムは、Ｈｓｕ－Ｚｈａｎｇスコアとしても知られる。Ｈｓｕ，Ｐ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．ＤＮＡ　ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ　ｏｆ　ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ　Ｃａｓ９　ｎｕｃｌｅａｓｅｓ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３１，８２７－８３２（２０１３）。このモデルは、各位置で標的に対してミスマッチを有する１５個のＥＭＸ１　ｓｇＲＮＡライブラリーから生成される位置ペナルティマトリックス（１×２０）に基づく。ＣＦＤアルゴリズム（切断頻度決定）は、位置及びミスマッチタイプの両方並びにＰＡＭの完全性（２７，８９７’ＣＤ３３’ｓｇＲＮＡ＋１０，６１８陰性対照ｓｇＲＮＡ）を考慮した脅威マトリックス（１２×２０）に基づく。Ｄｏｅｎｃｈ，Ｊ．Ｇ．ｅｔ　ａｌ．Ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ　ｓｇＲＮＡ　ｄｅｓｉｇｎ　ｔｏ　ｍａｘｉｍｉｚｅ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　ａｎｄ　ｍｉｎｉｍｉｚｅ　ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｅｆｆｅｃｔｓ　ｏｆ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９．Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３４，１８４－１９１（２０１６）。

【０５３４】

Ａｚｉｍｕｔｈモデル、ＤｅｅｐＳｐＣａｓ９モデル、及びＣｒｉｓｐｒＳｃａｎモデルによって生成されたスコアを平均化することによって、オンターゲット編集効率を予測

した。Ａｚｉｍｕｔｈモデルは、レンチウイルスによって送達される８８１個のｓｇＲＮＡ（ＭＯＬＭ１３／ＮＢ４／ＴＦ１細胞＋未公開の追加データ）で訓練された、ブースト回帰ツリーモデルである。Ｄｏｅｎｃｈ，Ｊ．Ｇ．ｅｔ ａｌ．Ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ ｓｇＲＮＡ ｄｅｓｉｇｎ ｔｏ ｍａｘｉｍｉｚｅ ａｃｔｉｖｉｔｙ ａｎｄ ｍｉｎｉｍｉｚｅ ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３４，１８４－１９１（２０１６）。ＤｅｅｐＳｐＣａｓ９は、１２，８３２個のｓｇＲＮＡからの編集データを使用して訓練された深層学習モデルである。Ｋｉｍ，Ｈ．Ｋ．ｅｔ ａｌ．ＳｐＣａｓ９ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ ｂｙ ＤｅｅｐＳｐＣａｓ９，ａ ｄｅｅｐ ｌｅａｒｎｉｎｇ－ｂａｓｅｄ ｍｏｄｅｌ ｗｉｔｈ ｈｉｇｈ ｇｅｎｅｒａｌｉｚａｔｉｏｎ ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ．Ｓｃｉｅｎｃｅ Ａｄｖａｎｃｅｓ ５，（２０１９）。ＣｒｉｓｐｒＳｃａｎは線形回帰モデルであり、＞１００個の遺伝子を標的とするゼブラフィッシュ胚に注射された１０００個のｓｇＲＮＡからの編集データを使用して訓練される。Ｍｏｒｅｎｏ－Ｍａｔｅｏｓ，Ｍ．Ａ．ｅｔ ａｌ．ＣＲＩＳＰＲｓｃａｎ：ｄｅｓｉｇｎｉｎｇ ｈｉｇｈｌｙ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｓｇＲＮＡｓ ｆｏｒ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｉｎ ｖｉｖｏ．Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ １２，９８２－９８８（２０１５）。

【０５３５】

推定ガイド’がフレームシフト変異を生成する可能性は、Ｌｉｎｄｅｌモデル及びＩｎＤｅｌｐｈｉモデルによって生成されたスコアを平均化することによって予測された。Ｌｉｎｄｅｌは、レンチウイルス感染を介してヒト細胞株に導入された６８７２個の合成標的配列のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９媒介性切断及び非相同末端結合媒介性二本鎖切断修復によって誘発された１１６万個の独立した変異事象のプロファイルデータを使用して訓練された機械学習モデルである。Ｃｈｅｎ，Ｗ．ｅｔ ａｌ．Ｍａｓｓｉｖｅｌｙ ｐａｒａｌｌｅｌ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ａｎｄ ｐｒｅｄｉｃｔｉｖｅ ｍｏｄｅｌｉｎｇ ｏｆ ｔｈｅ ｏｕｔｃｏｍｅｓ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄ ｂｒｅａｋ ｒｅｐａｉｒ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４７，７９８９－８００３（２０１９）。ＩｎＤｅｌｐｈｉは、１８７２個のｓｇＲＮＡによって生成されたインデルで訓練された機械学習モデルである。Ｓｈｅｎ，Ｍ．Ｗ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｅｄｉｃｔａｂｌｅ ａｎｄ ｐｒｅｃｉｓｅ ｔｅｍｐｌａｔｅ－ｆｒｅｅ ＣＲＩＳＰＲ ｅｄｉｔｉｎｇ ｏｆ ｐａｔｈｏｇｅｎｉｃ ｖａｒｉａｎｔｓ．Ｎａｔｕｒｅ ５６３，６４６－６５１（２０１８）。

【０５３６】

次いで、これらのガイドの編集効率を、イヌ単球ＤＨ８２で試験した。簡潔に述べると、ｓｇＲＮＡを野生型ＳｐＣａｓ９と予め複合体化し、初代イヌ単球ＤＨ８２に電気穿孔した。次いで、プールされた細胞集団にＤＮＡ抽出及び配列決定を行い、編集効率を評価した。図３２Ｃに示されるように、ＯＣＡ０１－ＯＣＡ０５及びＯＣＡ０８は、効率的なノックアウト編集を媒介した。更に、ＯＣＡ０５及びＯＣＡ０８は、一貫した単一のヌクレオチド付加編集によりそれを行った。

【０５３７】

実施例１７．ｃＩＬ－１β遺伝子を標的とするガイドＲＮＡの比較分析

低いオフターゲット編集効果を有するＩＬ－１Ｂを標的とする追加のｓｇＲＮＡを特定するために、オフターゲットスコアのインシリコ予測に基づいて、４つの追加の推定標的配列を特定した。図３３Ａは、以前に生成された２つの抗ＩＬ－１Ｂ ｓｇＲＮＡ：ｓｇ２４１（ＯＣＢ０１と改名）及びｓｇ２４２（ＯＣＢ０２と改名）の標的配列、並びに低い予測されたオフターゲット効果を有する新たに生成された６つのｓｇＲＮＡ：ｓｇ３５２（ＯＣＢ０６と改名）、ｓｇ３５３（ＯＣＢ０４と改名）、ｓｇ３５４（ＯＣＢ０８と改名）、ｓｇ３５５（ＯＣＢ０５と改名）、ｓｇ３５６（ＯＣＢ０７と改名）、及びｓｇ３５７（ＯＣＢ０３と改名）の標的配列を示す。簡潔に述べると、推定標的配列を、実施例１６に記載されるように、オンターゲット編集効率、オフターゲット編集効果、及びフ

レームシフト編集の各々について、複数のモデルによって評価した。各推定標的配列のスコアを図３３Ｂに示す。

【０５３８】

次いで、これらのガイドの編集効率を、イヌ単球ＤＨ８２で試験した。簡潔に述べると、ｓｇＲＮＡを野生型ＳｐＣａｓ９と予め複合体化し、初代イヌ単球ＤＨ８２に電気穿孔した。次いで、プールされた細胞集団にＤＮＡ抽出及び配列決定を行い、編集効率を評価した。図３３Ｃに示されるように、ＯＣＢ０１－０２及びＯＣＢ０４－０６は、効率的なノックアウト編集を媒介した。更に、ＯＣＢ０１、ＯＣＢ０２、及びＯＣＢ０４は、一貫した編集でそれを行った。ｓｇＲＮＡ　ＯＣＢ３（６１％）及びＯＣＢ０７（０％）の低い編集効率は、低いオンターゲットスコアによってインシリコで予測された（図３３Ｂ、それぞれ３９及び３２点）。しかしながら、ＯＣＢ０８の乏しい性能は、インシリコ指標では説明できなかった。

【０５３９】

最後に、これらの遺伝的効果は、編集された細胞の上清に対して抗ＩＬ－１Ｂ　ＥＬＩＳＡアッセイを行うことによって更に確認された。図３３Ｄに示されるように、配列分析による効率的な編集を示したｓｇＲＮＡの各々はまた、ガイドによって標的化された細胞によるＩＬ－１Ｂ分泌の著しい低減をもたらした。まとめると、これらの結果は、設計されたガイドによるイヌ単球における編集を確認する。

【０５４０】

実施例１８．ｃＩＬ－１β遺伝子を標的とするガイドＲＮＡの調査

上位ｓｇＲＮＡ候補を、ｃＩＬ－１β遺伝子及びタンパク質に対するそれらの影響について更に評価した。最初に、インビトロシーケンシングアッセイの繰り返しにおいて、極めて一貫した結果が観察される（図３４Ａ）。実際に、編集された細胞では、細胞の９０％超で単一の編集が生じ、以前の結果と組み合わせた場合の強い再現性を示唆する。次に、両方のｃＩＬ－１β標的化候補を、ｃＩＬ－１αを標的とするｓｇＲＮＡを用いた二重ノックアウトの状況で評価した。全てのｓｇＲＮＡが強力なノックアウト効率を保持するだけでなく（図３４Ｂ、左パネル）、これらの編集はタンパク質機能の破壊をもたらす。上清ＥＬＩＳＡ結果は、ｃＩＬ－１βタンパク質の分泌が有意に消失し、対照と比較して９５％超の低減を示す。まとめると、これらの結果は、組み合わされた場合でも、リードｓｇＲＮＡ候補が効力を保持することを示唆する。

【０５４１】

実施例１９．初代単球におけるｃＩＬ－１β標的化ｓｇＲＮＡの評価

単球は、多数の異なる細胞運命に分化する能力を考慮すると、細胞免疫（及び自己免疫）において最も重要な細胞の１つである。したがって、これらの細胞は、関節の疾患を対象とした療法の主要な標的の１つである。したがって、これらの特定の細胞に対する遺伝子編集の影響を理解することは、重要となる。

【０５４２】

ｃＩＬ－１βを標的とするいくつかのｓｇＲＮＡ候補を、電気穿孔を介してイヌ単球に導入した。次いで、編集された細胞を、ＬＰＳで６時間又は２４時間のいずれかの間チャレンジし、その時点で上清をＥＬＩＳＡを介して分析した。結果は、ＯＣＢ０１又はＯＣＢ０２のいずれかで編集されたＬＰＳチャレンジ単球において、無視できる量のＩＬ－１βが検出されることを示す（図３５Ａ、Ｂ）。逆に、対照細胞は両方の時点で堅牢に応答する。

【０５４３】

次いで、ｓｇＲＮＡのより広範なパネルに対して同じアッセイを繰り返した。再び、２４時間でのＩＬ－１β分泌の強力な阻害が、ボード全体にわたって観察される（図３６）。いかなる場合も、未編集対照の８０％未満の平均阻害はなかった。

【０５４４】

実施例２０．特異性が増強された変異Ｃａｓ９タンパク質の影響

次いで、ＯＣＢ０２が、標的遺伝子座（オフターゲット＃２及びオフターゲット＃３）

と高い配列同一性を有する、実施例１７に記載されるように編集されたイヌ単球の２つのゲノム遺伝子座を配列決定することによって、オフターゲット編集を引き起こしたかどうかを調査した。図３８に示されるように、野生型Ｃａｓ９で複合体化されたとき、ＯＣＢ０２は、両方の遺伝子座で高レベルのオフターゲット編集を引き起こした。

【０５４５】

増強された特異性を有することが知られているＣａｓ９バリアントを使用することによってこのオフターゲット編集を回避することができるかどうかを決定するために、イヌ単球を、野生型Ｃａｓ９、ＥＳ－Ｃａｓ９（Ｓｌａｙｍａｋｅｒ，Ｉ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｒａｔｉｏｎａｌｌｙ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｃａｓ９ ｎｕｃｌｅａｓｅｓ ｗｉｔｈ ｉｍｐｒｏｖｅｄ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ．Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９７９）３５１，（２０１６）に記載される、増強された特異性Ｃａｓ９）、ＰＥ－Ｃａｓ９（ＰＵＲｅｄｉｔ（登録商標）Ｃａｓ９；Ｍｅｒｃｋ）、ＨＦ－Ｃａｓ９（ＴｒｕｅＣｕｔ（登録商標）ＨｉＦｉ Ｃａｓ９；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）又はＡＲ－Ｃａｓ９（Ａｌｔ－Ｒ（登録商標）ＨｉＦｉ Ｃａｓ９；ＩＤＴ）で予め複合体化されたＯＣＢ０１又はＯＣＢ０２のいずれかで編集した。これらの複合体のオンターゲット編集効率を、編集された細胞におけるＩＬ１Ｂ遺伝子を配列決定することによって評価した。図３８に示されるように、高効率のＣａｓ９バリアントの全てが、ＯＣＢ０２ ｓｇＲＮＡと対になったときに、効率的なオンターゲット編集（ＩＬ１Ｂノックアウト）を媒介した。しかしながら、高い忠実性のＣａｓ９バリアントのいくつかのみが、ＯＣＢ０１ ｓｇＲＮＡと対になったときに、効率的なオンターゲット編集（ＩＬ１Ｂノックアウト）を媒介した。次いで、ＯＣＢ０２ ｓｇＲＮＡを用いたオフターゲット編集に対する高い忠実性のＣａｓ９タンパク質の効果を、編集された細胞におけるオフターゲット部位＃２及び＃３を配列決定することによって評価した。図３８に示されるように、高い忠実性のＣａｓ９タンパク質の各々は、これらの遺伝子座でオフターゲット編集を除去した。

【０５４６】

次いで、ＩＬ－１Ｂ発現／分泌に対する高忠実性Ｃａｓ９バリアントの効果を、上述のように試験した。配列決定結果から予想されるように、増強された特異性Ｃａｓ９タンパク質の各々を使用した編集は、ＬＰＳチャレンジの２４時間後にＩＬ１Ｂ分泌の効率的な阻害をもたらした（図３７Ａ）。配列決定データから予想されるように、ＡＲ－Ｃａｓ９を使用したＯＣＢ０１媒介性編集について類似の結果が示された（図３７Ｂ）。

【０５４７】

上記の実施例は、当業者に、本開示の組成物、システム、及び方法の実施形態を作製及び使用するやり方の完全な開示及び説明を与えるために提供され、発明者らがその発明とみなすものの範囲を限定することを意図するものではない。当業者にとって明らかである本開示の実施形態を実施するための上記の方式の修正は、以下の特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。本明細書に説明されている全ての特許及び刊行物は、本開示が関連する当業者の技能レベルを示すものである。

【０５４８】

実施例２１．ヒト、イヌ、ウマ、又はネコのＩＬ－１Ａ又はＩＬ－１β遺伝子を標的とするｓｇＲＮＡの例の特定。

オンターゲット編集効率のインシリコ予測におけるＩＬ－１Ａ又はＩＬ－１Ｂを標的とする追加のｓｇＲＮＡを特定するために、オフターゲット編集効果、及びフレームシフト編集確率を、ヒトガイド配列について平均化されたオンターゲットスコアが、上昇モデルを使用して生成されたスコアも含むことを除いて、実施例１６に記載される推定標的ヒト配列、イヌ配列、ウマ配列、及びネコ配列について生成した。上昇は、ＧＵＩＤＥ－Ｓｅｑ及び他の集約データによって訓練されたエンドツーエンド機械学習モデルである。Ｌｉｓｔｇａｒｔｅｎ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ ｏｆ ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ａｃｔｉｖｉｔｉｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｅｎｄ－ｔｏ－ｅｎｄ ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ ｇｕｉｄｅ ＲＮＡｓを参照されたい。Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ２，３８－４７（２０１８）、及びＴｓａｉ，Ｓ．Ｑ．

ｅｔ ａｌ．ＧＵＩＤＥ－ｓｅｑ ｅｎａｂｌｅｓ ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ｏｆ ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ｃｌｅａｖａｇｅ ｂｙ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｎｕｃｌｅａｓｅｓ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３３，１８７－１９７（２０１５）。次いで、各推定ｃｒＲＮＡ配列の全体的なスコアを、オンターゲット、オフターゲット、及びフレームシフトスコアの平均として計算した。各遺伝子及び種について最も高いスコアのｃｒＲＮＡ配列を選択した。各推定標的配列のスコアを図３９Ａ～４６Ｂに示す。

【０５４９】

図３９Ａ～４６Ｂに報告されるエクソンのゲノム位置を、以下の表１７～２４に提供する。

【表４１】

表17-ヒトIL1A

エクソン番号	コーディング	Ensembl ID	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	開始	終了
1	いいえ	ENSE00001325622	hg38	chr2	リバース	112,784,493	112,784,443
2	はい	ENSE00001128612	hg38	chr2	リバース	112,783,778	112,783,724
3	はい	ENSE00001145252	hg38	chr2	リバース	112,782,764	112,782,716
4	はい	ENSE00000856832	hg38	chr2	リバース	112,781,826	112,781,604
5	はい	ENSE00000773893	hg38	chr2	リバース	112,779,666	112,779,496
6	はい	ENSE00000773892	hg38	chr2	リバース	112,778,111	112,777,987
7	はい	ENSE00001128606	hg38	chr2	リバース	112,775,267	112,773,925

【表４２】

表18-ヒトIL1B

エクソン番号	コーディング	Ensembl ID	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	開始	終了
1	いいえ	ENSE00001000625	hg38	chr2	リバース	112,836,779	112,836,708
2	はい	ENSE00003508205	hg38	chr2	リバース	112,836,244	112,836,183
3	はい	ENSE00003647827	hg38	chr2	リバース	112,835,617	112,835,566
4	はい	ENSE00003506405	hg38	chr2	リバース	112,833,575	112,833,374
5	はい	ENSE00003582426	hg38	chr2	リバース	112,832,826	112,832,662
6	はい	ENSE00003615183	hg38	chr2	リバース	112,831,422	112,831,292
7	はい	ENSE00000856835	hg38	chr2	リバース	112,830,573	112,829,751

【表４３】

表19-イヌIL1A

エクソン番号	コーディング	Ensembl ID	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	開始	終了
1	いいえ	ENSCAFE00000309751	canFam3	chr17	リバース	36,979,435	36,979,356
2	はい	ENSCAFE00000078619	canFam3	chr17	リバース	36,978,720	36,978,666
3	はい	ENSCAFE00000078621	canFam3	chr17	リバース	36,977,683	36,977,635
4	はい	ENSCAFE00000078623	canFam3	chr17	リバース	36,977,242	36,977,032
5	はい	ENSCAFE00000078624	canFam3	chr17	リバース	36,975,266	36,975,093
6	はい	ENSCAFE00000078626	canFam3	chr17	リバース	36,973,248	36,973,130
7	はい	ENSCAFE00000078627	canFam3	chr17	リバース	36,970,929	36,970,573

【表４４】

表20-イヌIL1B

エクソン番号	コーディング	Ensembl ID	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	開始	終了
1	いいえ	NA	canFam3	chr17	リバース	NA	NA
2	はい	ENSCAFE00000409713	canFam3	chr17	リバース	37,024,176	37,023,944
3	はい	ENSCAFE00000241094	canFam3	chr17	リバース	37,023,405	37,023,354
4	はい	ENSCAFE00000078700	canFam3	chr17	リバース	37,022,260	37,022,065
5	はい	ENSCAFE00000078702	canFam3	chr17	リバース	37,021,958	37,021,797
6	はい	ENSCAFE00000241077	canFam3	chr17	リバース	37,020,557	37,020,427
7	はい	ENSCAFE00000309007	canFam3	chr17	リバース	37,019,681	37,019,329

【表４５】

表21-
ウマIL1A

エクソン番号	コーディング	Ensembl ID	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	開始	終了
1	いいえ	ENSECAE00000193601	equCab3	chr15	リバース	16,369,812	16,369,762
2	はい	ENSECAE00000193613	equCab3	chr15	リバース	16,369,119	16,369,065
3	はい	ENSECAE00000193626	equCab3	chr15	リバース	16,368,070	16,368,022
4	はい	ENSECAE00000193646	equCab3	chr15	リバース	16,367,110	16,366,888
5	はい	ENSECAE00000193669	equCab3	chr15	リバース	16,365,310	16,365,137
6	はい	ENSECAE00000193696	equCab3	chr15	リバース	16,364,119	16,363,998
7	はい	ENSECAE00000193723	equCab3	chr15	リバース	16,361,752	16,360,700

【表４６】

表22-
ウマIL1B

エクソン番号	コーディング	Ensembl ID	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	開始	終了
1	いいえ	ENSECAE00000001011	equCab3	chr15	リバース	16,444,697	16,444,653
2	はい	ENSECAE00000000363	equCab3	chr15	リバース	16,423,448	16,423,390
3	はい	ENSECAE00000269159	equCab3	chr15	リバース	16,422,859	16,422,808
4	はい	ENSECAE00000000420	equCab3	chr15	リバース	16,422,550	16,422,346
5	はい	ENSECAE00000000449	equCab3	chr15	リバース	16,421,794	16,421,633
6	はい	ENSECAE00000000487	equCab3	chr15	リバース	16,420,363	16,420,233
7	はい	ENSECAE00000308144	equCab3	chr15	リバース	16,419,536	16,418,738

【表４７】

表23-
ネコIL1A

エクソン番号	コーディング	Ensembl ID	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	開始	終了
1	いいえ	NA	felCat9	chrA3	フォワード	NA	NA
2	はい	ENSFCAE00000082073	felCat9	chrA3	フォワード	105,113,193	105,113,247
3	はい	ENSFCAE00000473731	felCat9	chrA3	フォワード	105,114,215	105,114,263
4	はい	ENSFCAE00000345284	felCat9	chrA3	フォワード	105,115,053	105,115,275
5	はい	ENSFCAE00000082076	felCat9	chrA3	フォワード	105,117,059	105,117,232
6	はい	ENSFCAE00000082077	felCat9	chrA3	フォワード	105,118,594	105,118,715
7	はい	ENSFCAE00000293842	felCat9	chrA3	フォワード	105,120,921	105,121,209

【表４８】

表24-
ネコIL1B

エクソン番号	コーディング	Ensembl ID	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	開始	終了
1	はい?	ENSFCAE00000421394	felCat9	chrA3	フォワード	105,049,334	105,050,213
2	はい	ENSFCAE00000060114	felCat9	chrA3	フォワード	105,050,633	105,050,694
3	はい	ENSFCAE00000060119	felCat9	chrA3	フォワード	105,051,232	105,051,280
4	はい	ENSFCAE00000060121	felCat9	chrA3	フォワード	105,052,908	105,053,112
5	はい	ENSFCAE00000060125	felCat9	chrA3	フォワード	105,053,655	105,053,816
6	はい	ENSFCAE00000060131	felCat9	chrA3	フォワード	105,055,063	105,055,193
7	はい	ENSFCAE00000398371	felCat9	chrA3	フォワード	105,056,165	105,056,407

【０５５０】
全ての見出し及びセクションの名称は、明確性及び参照のみを目的として使用され、いかなる方式でも制限とみなされるものではない。例えば、当業者であれば、本明細書に説明される開示の趣旨及び範囲に従って、適宜、異なる見出し及びセクションからの様々な態様を組み合わせる有用性を認識するであろう。
【０５５１】
本明細書に説明される方法は、本明細書に説明される特定の方法論、プロトコル、対象、及びシーケンシング技術に限定されず、したがって、変更され得ることが理解されることになる。また、本明細書で使用される用語は、単に特定の実施形態を説明する目的のためのものであり、本明細書に説明される方法及び組成物の範囲を限定することを意図するものではなく、それらは、添付の特許請求の範囲のみによって限定されることになる。本開示のいくつかの実施形態が本明細書に示され、説明されているが、そのような実施形態が単に例として提供されることが、当業者には明らかであろう。今後、本開示から逸脱することなく、当業者が多数の変形、変化、及び置換を行うであろう。本明細書に説明された本開示の実施形態に対する様々な代替例は、本開示の実施に用いられ得ることが理解されるべきである。以下の特許請求の範囲は、本開示の範囲、及びこれらの特許請求の範囲内の方法及び構造、並びにそれらの均等物が、それによって包含されることが意図される。
【０５５２】
いくつかの態様が、例示のための例示的な用途を参照して説明される。別段の示唆がない限り、任意の実施形態は、任意の他の実施形態と組み合わせられ得る。本明細書に説明される特徴の完全な理解を提供するために、多数の具体的な詳細、関係、及び方法が明記されていることが理解されるべきである。しかしながら、当業者であれば、本明細書に説明される特徴が、特定の詳細のうちの１つ以上を伴わずに、又は他の方法を伴って実施され得ることを容易に認識するであろう。本明細書に説明される特徴は、いくつかの作用が、異なる順序で、及び／又は他の作用若しくは事象と同時に起こり得るため、作用又は事象の例示された順序によって限定されない。更に、本明細書に説明される特徴に従って方法論を実装するために、例示される全ての作用又は事象が必要とされるわけではない。
【０５５３】
いくつかの実施形態が本明細書に示され、説明されているが、そのような実施形態が単に例として提供されることが、当業者には明らかであろう。本開示が、本明細書に提供される特定の実施例によって限定されることは意図されていない。本開示が上述の明細書を参照して説明されてきたが、本明細書の実施形態の説明及び例示は、限定された意味で解釈されることを意図していない。今後、本開示から逸脱することなく、当業者が多数の変形、変化、及び置換を行うであろう。
【０５５４】
更に、本開示の全ての態様は、様々な条件及び変数に依存する、本明細書に記載される特定の描写、構成、又は相対的割合に限定されないことが理解されるべきである。本明細

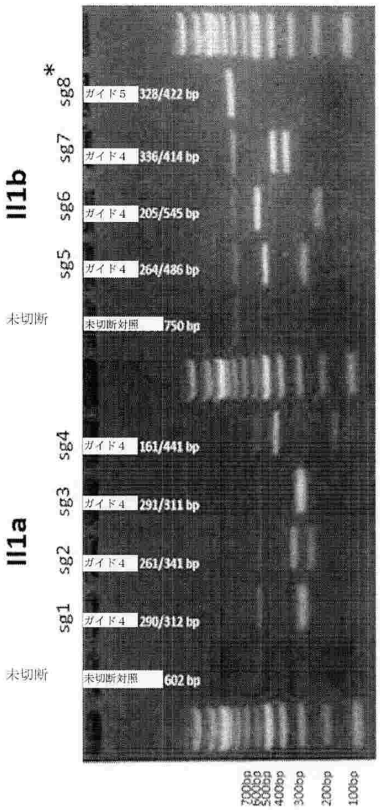
書に説明された本開示の実施形態に対する様々な代替例は、本開示の実施に用いられ得ることが理解されるべきである。したがって、本開示は、任意のそのような代替例、修正例、変形例、又は均等物も包含するべきであることが企図される。以下の特許請求の範囲は、本開示の範囲、及びこれらの特許請求の範囲内の方法及び構造、並びにそれらの均等物が、それによって包含されることが意図される。

【０５５５】

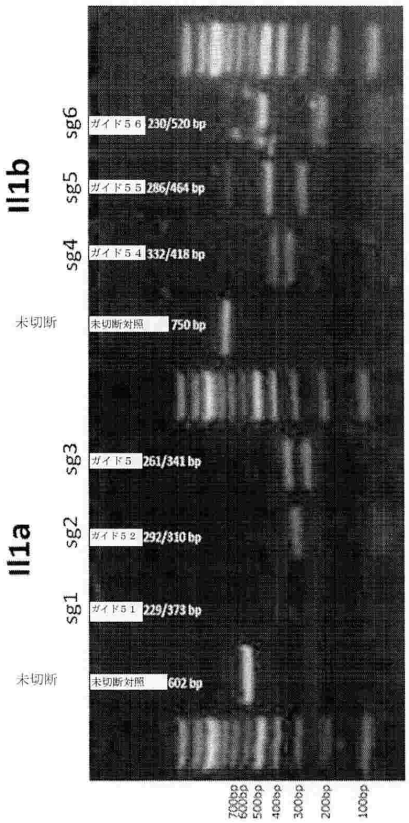
本明細書の全ての刊行物、特許、及び特許出願は、個々の刊行物、特許、又は特許出願が、参照により組み込まれることを具体的かつ個別に示した場合と同じ程度に、参照により組み込まれる。本明細書の用語と組み込まれた参考文献の用語との間に矛盾がある場合、本明細書の用語が優先される

【図面】

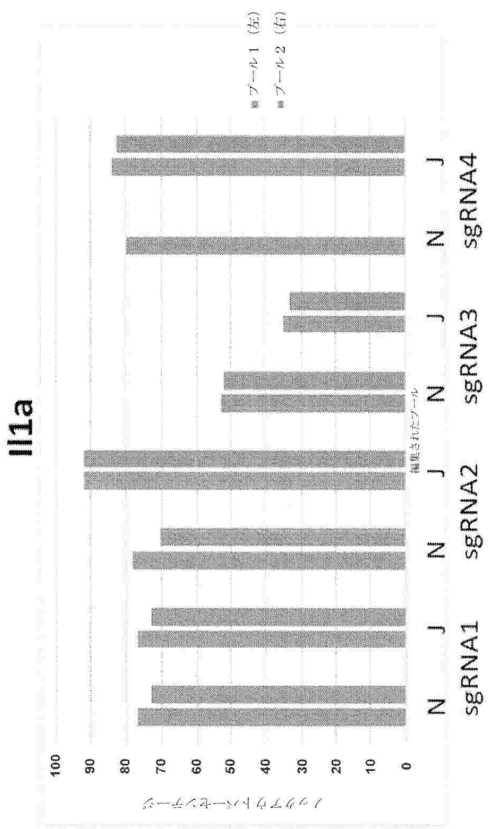
【図１Ａ】



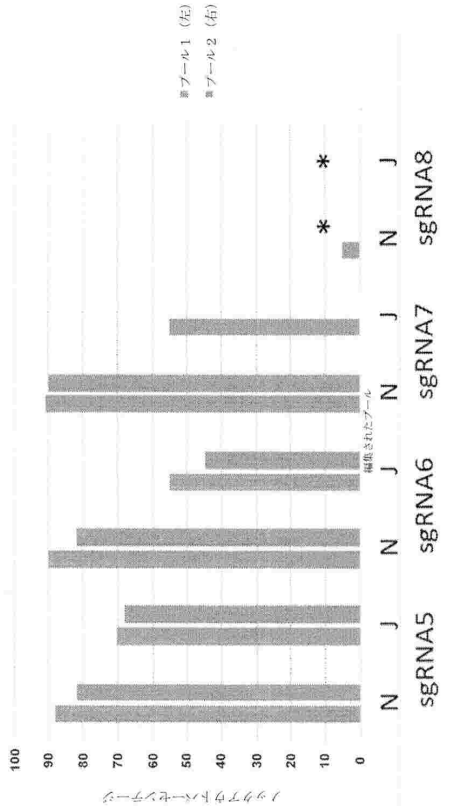
【図１Ｂ】



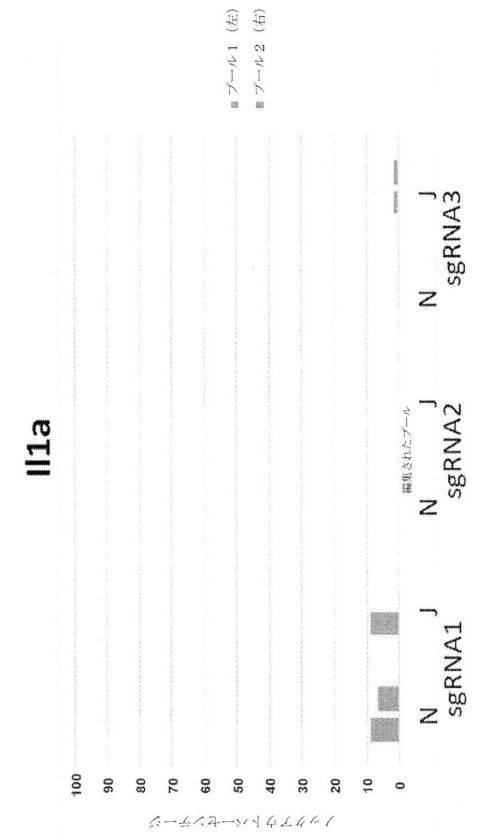
【図２Ａ】



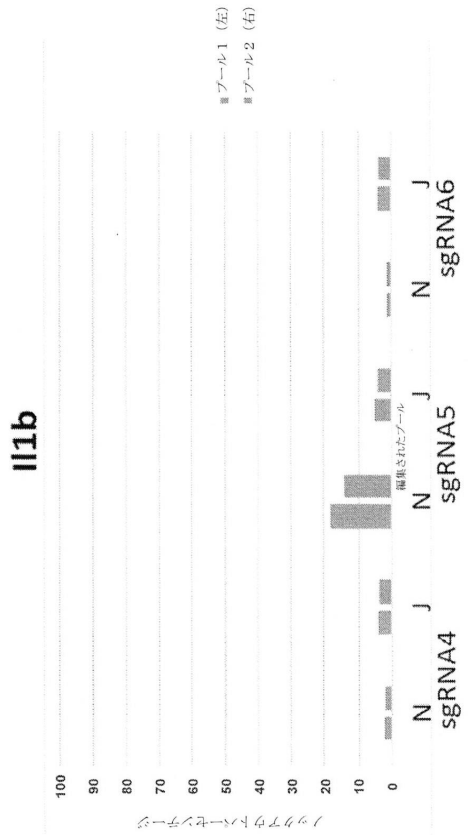
【図２Ｂ】



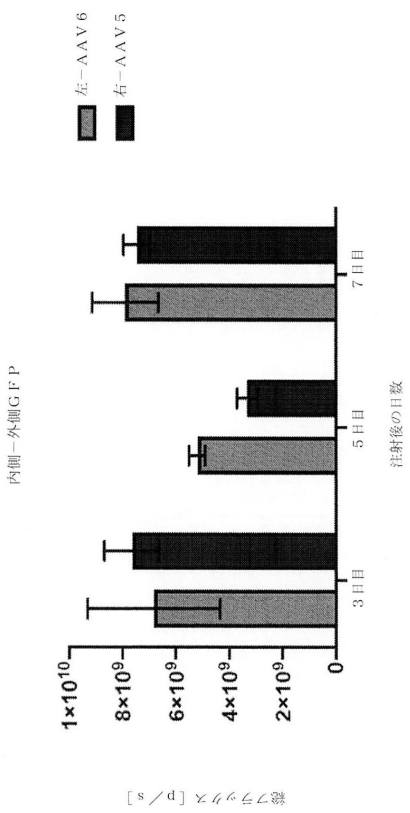
【図２Ｃ】



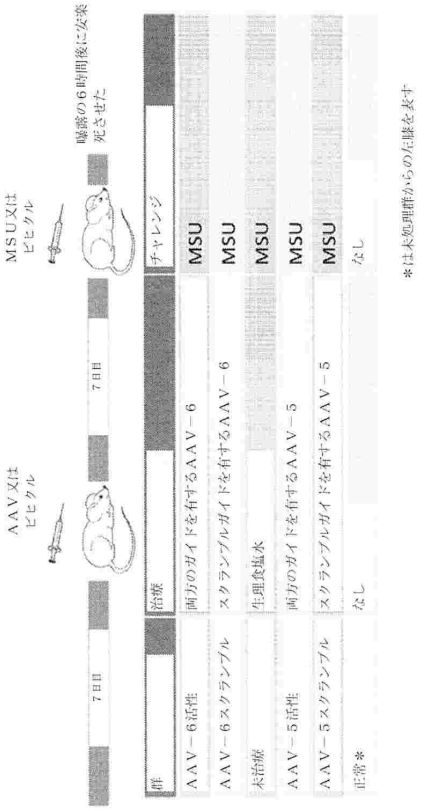
【図２Ｄ】



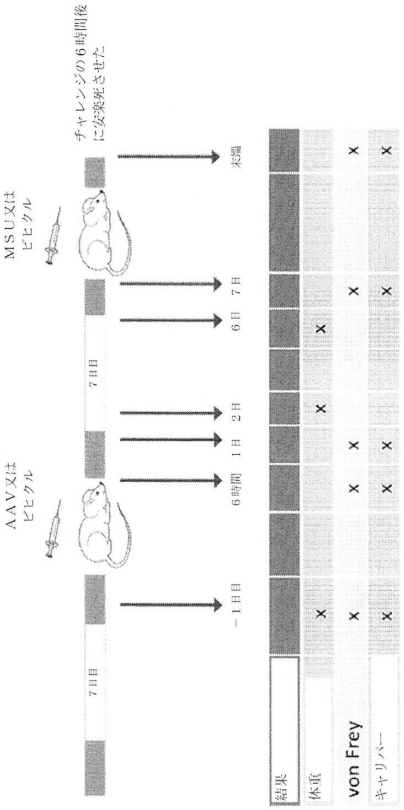
【図３】


左－AAV6
右－AAV5
内側－外側ＧＦＰ
1×10^10
8×10^9
6×10^9
4×10^9
2×10^9
0
3日目
5日目
7日目
注射後の日数
総フラックス［p／s］

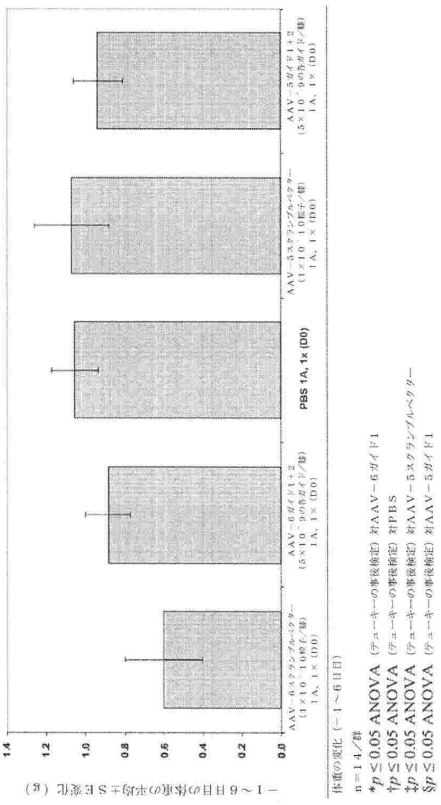
【図４】


AAV又は
ビヒクル
7日目
MSU又は
ビヒクル
嘔盛の6時間後に安楽
死させた
群
治療
チャレンジ
AAV－6活性
両方のガイドを有するAAV－6
MSU
AAV－6スクランブル
スクランブルガイドを有するAAV－6
MSU
未治療
生理食塩水
MSU
AAV－5活性
両方のガイドを有するAAV－5
MSU
AAV－5スクランブル
スクランブルガイドを有するAAV－5
MSU
正常＊
なし
なし
＊は未処理群からの有意を表す

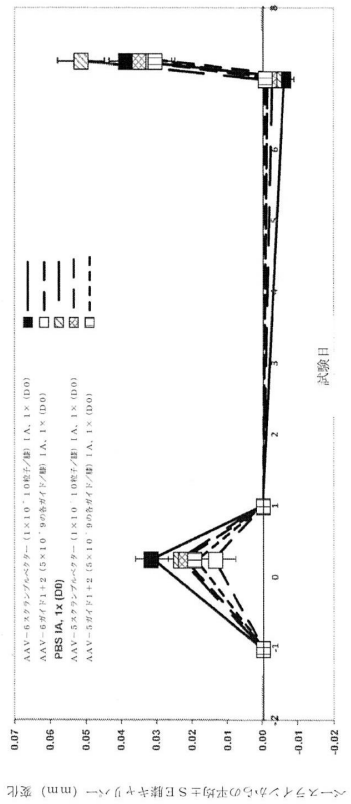
【図５】


AAV又は
ビヒクル
7日目
MSU又は
ビヒクル
チャレンジの6時間後
に安楽死させた
－1日目
6時間
1日
2日
6日
7日
7日目
末端
結果
体重
von Frey
キャリパー

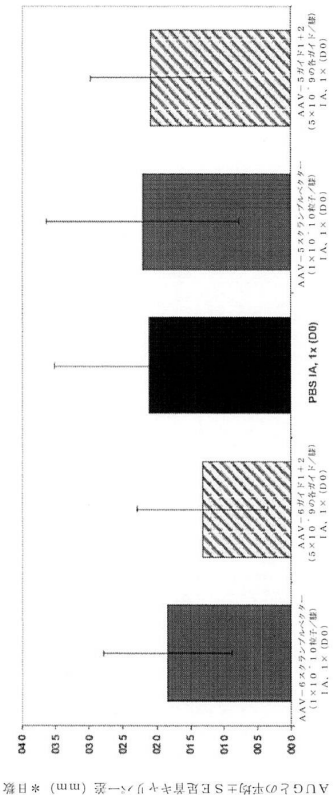
【図６】


－1～6日目の体重の平均±SE変化（g）
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PBS 1A, 1x (DD)
体重の変化（－1～6日目）
n＝14／群
*p ≤ 0.05 ANOVA（テューキーの事後検定）対AAV－6ガイド1
†p ≤ 0.05 ANOVA（テューキーの事後検定）対PBS
‡p ≤ 0.05 ANOVA（テューキーの事後検定）対AAV－5スクランブルベクター
§p ≤ 0.05 ANOVA（テューキーの事後検定）対AAV－5ガイド1

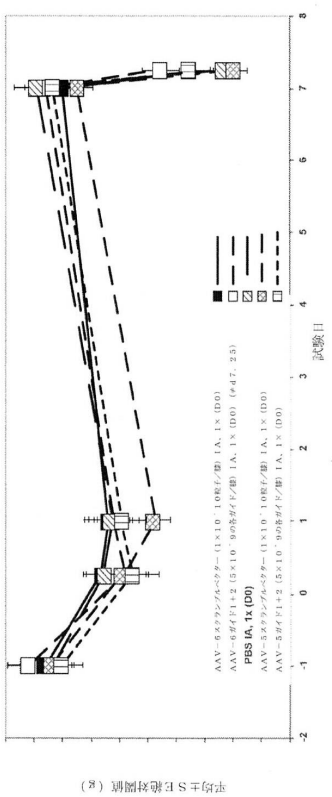
【図７Ａ】



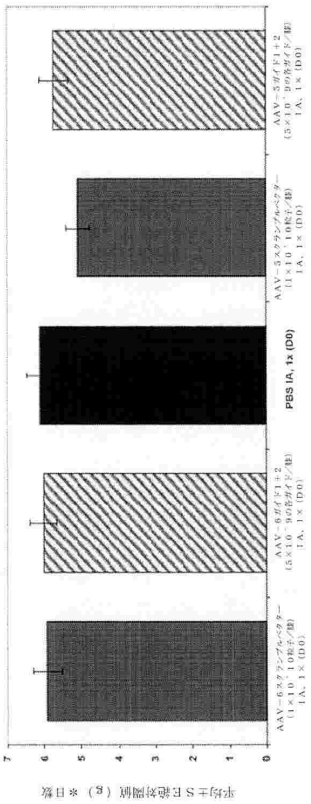
【図７Ｂ】



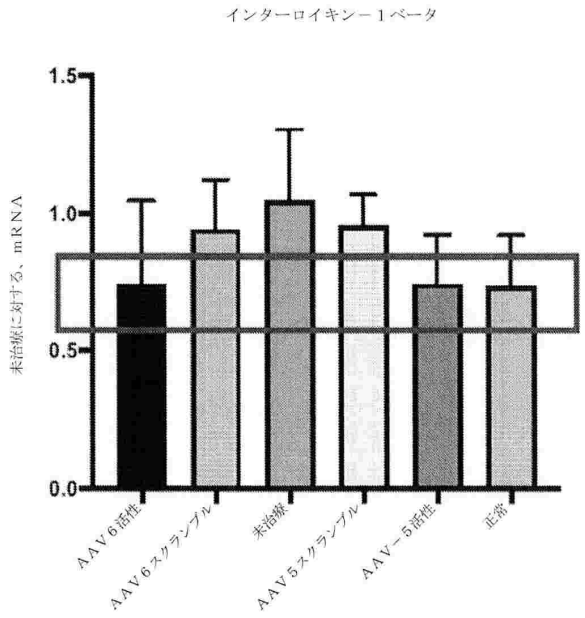
【図８Ａ】



【図８Ｂ】



【図９】



【図１０Ａ】



FIG. 10A

【図】

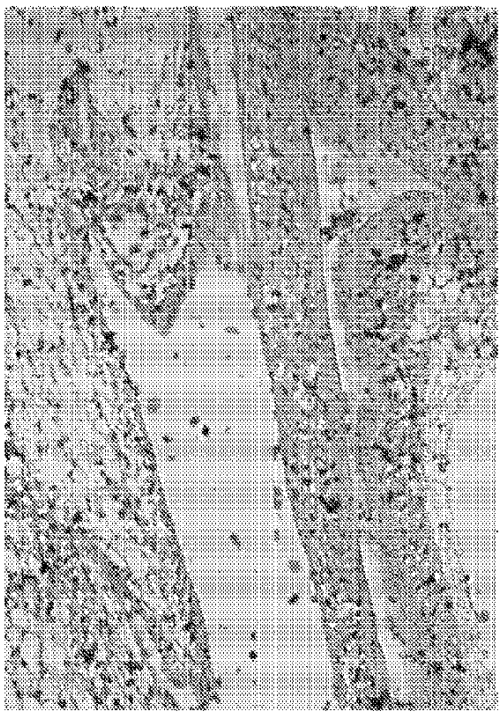


FIG. 10A

【図１０Ｃ】

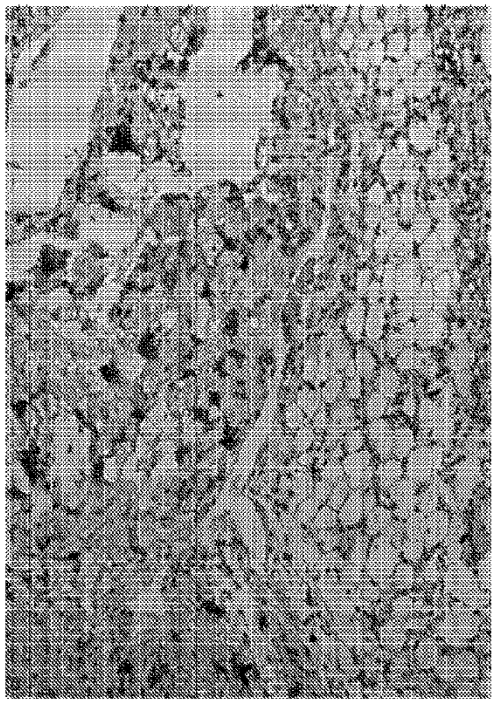


FIG. 10C

【図１０Ｄ】

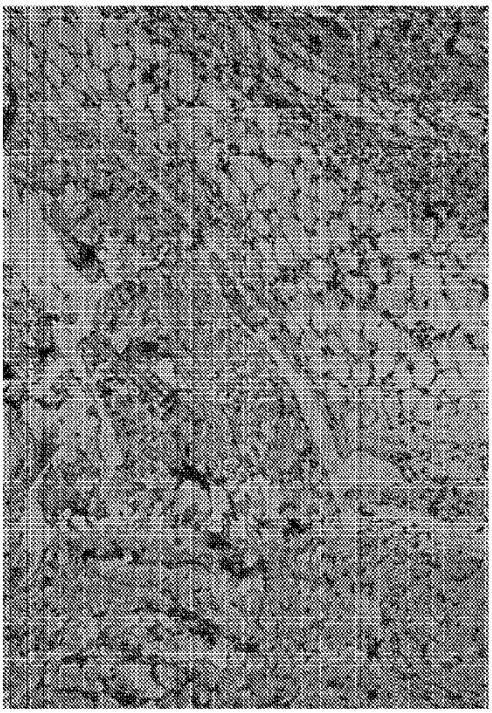
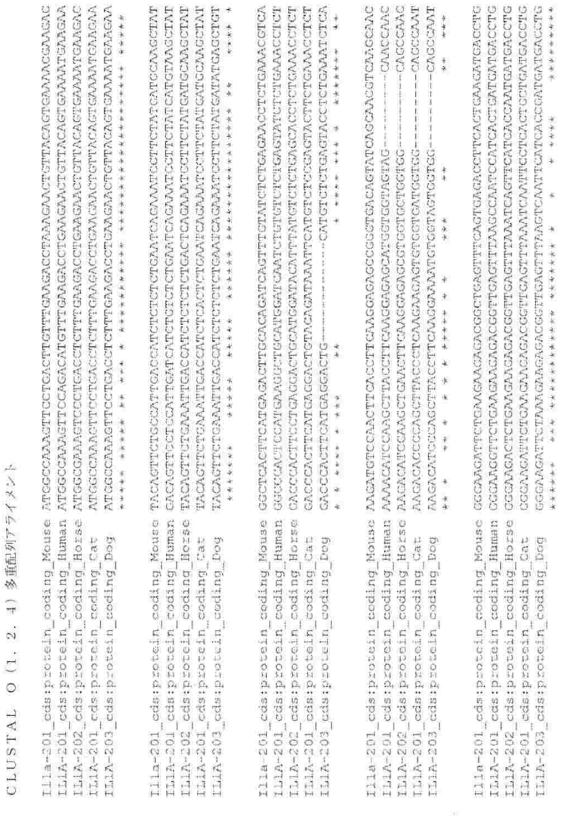
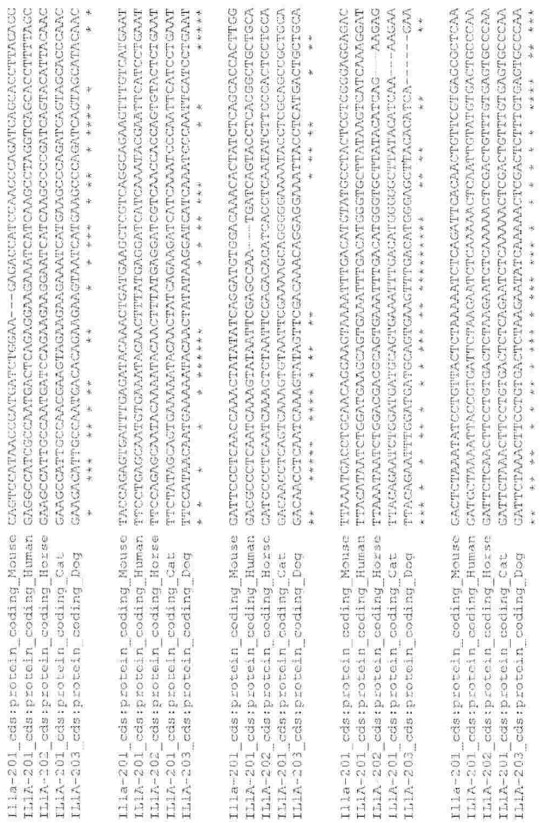


FIG. 10D

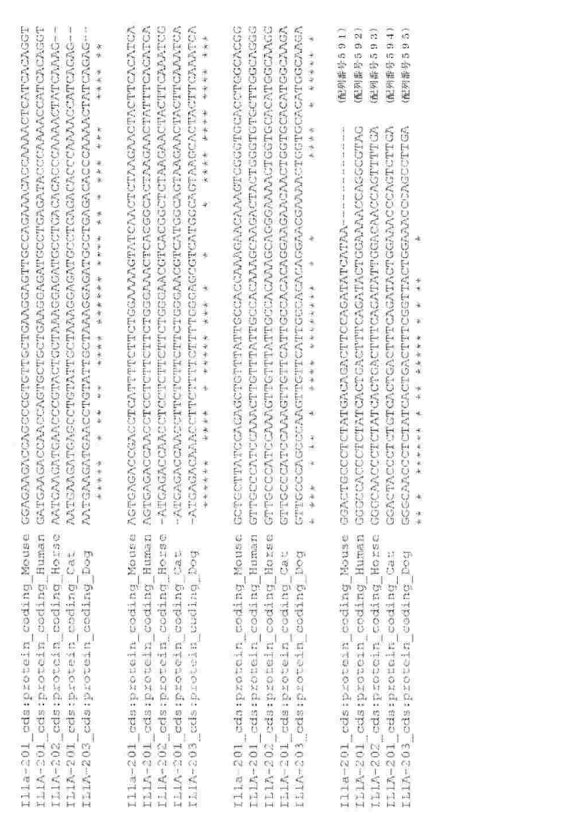
【図１１Ａ】



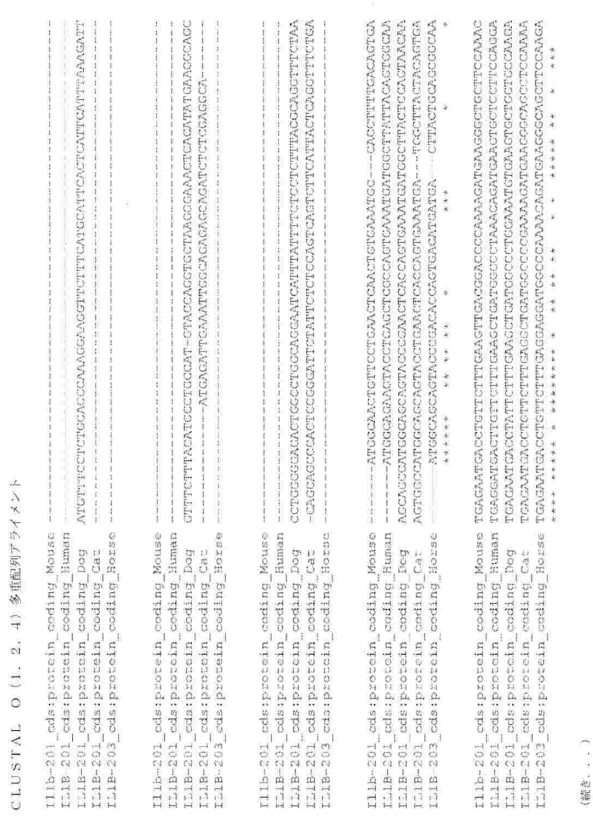
【図１１Ｂ】



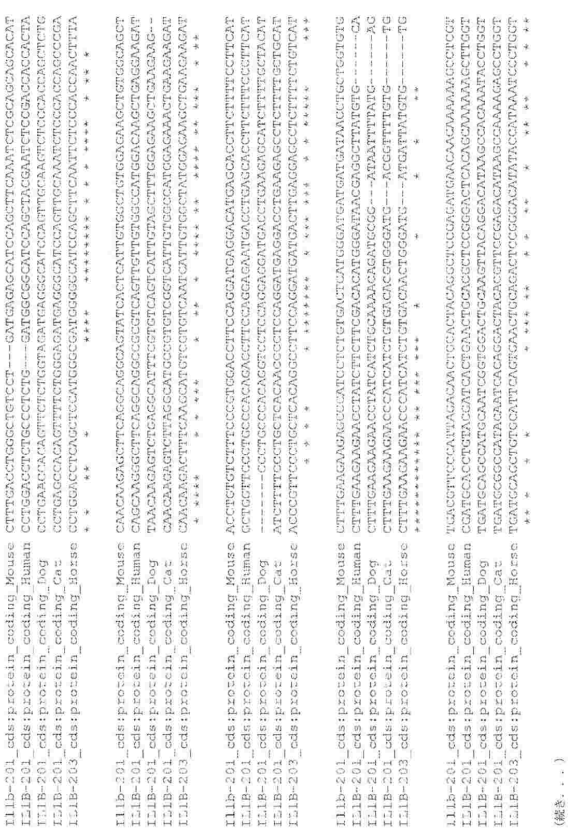
【図１１Ｃ】



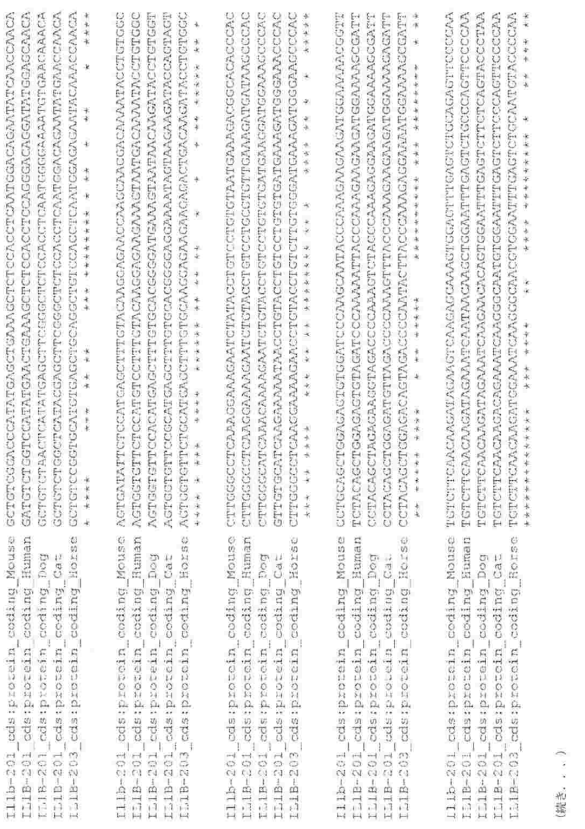
【図１２Ａ】



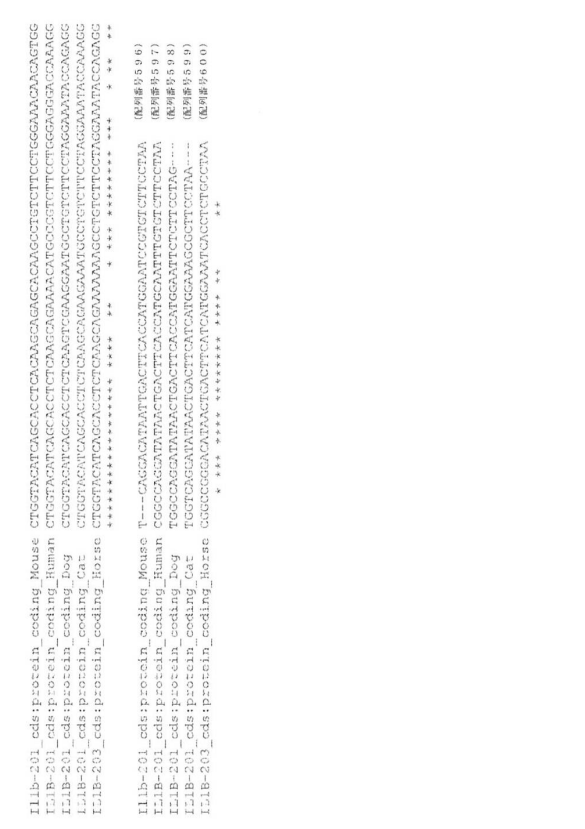
【図１２Ｂ】



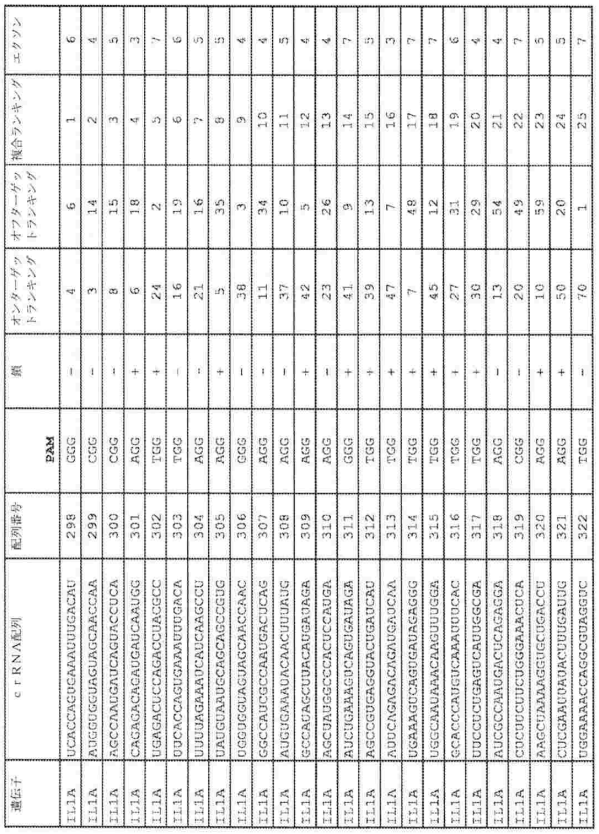
【図１２Ｃ】



【図１２Ｄ】



【図１３Ａ】



遺伝子	ｃｒＲＮＡ配列	配列番号	PAM	鎖	オンターゲットランキング	オフターゲットランキング	複合ランキング	エクソン
IL1A	UCACCAGUGAAAUUUGACAU	298	GGG	–	4	6	1	6
IL1A	AUGGUGGUAGUAGCAACAA	299	CGG	–	3	14	2	4
IL1A	AGCCAAGAUCACGUACCUCA	300	CGG	–	8	15	3	5
IL1A	CAGAGACAGAUGAUCAAUGG	301	AGG	+	6	18	4	3
IL1A	UGAGACUCCAGACCUACGCC	302	TGG	+	24	2	5	7
IL1A	UUCACCAGUGAAAUUUGACA	303	TGG	–	16	19	6	6
IL1A	UUUUAGAAAUCAUCAAGCCU	304	AGG	–	21	16	7	5
IL1A	UAUGUAAUGCAGCAGCCGUG	305	AGG	+	5	35	8	5
IL1A	UGGUGGUAGUAGCAACAAC	306	GGG	–	38	3	9	4
IL1A	GGCCAUCGCCAAUGACUCAG	307	AGG	–	11	34	10	4
IL1A	AUGUGAAAUACAACUUUAUG	308	AGG	–	37	10	11	5
IL1A	GCCAUAGCUUACAUGAUAGA	309	AGG	+	42	5	12	4
IL1A	AGCUAUGGCCCACUCCAUGA	310	AGG	–	23	26	13	4
IL1A	AUCUGAAAGUCAGUGAUAGA	311	GGG	+	41	9	14	7
IL1A	AGCCGUGAGGUACUGAUCAU	312	TGG	+	39	13	15	5
IL1A	AUUCAGAGCAGAUGAUCAA	313	TGG	+	47	7	16	3
IL1A	UGAAAGUCAGUGAUAGAGG	314	TGG	+	7	48	17	7
IL1A	UGGCAAUAAACAAGUUUGGA	315	TGG	+	45	12	18	7
IL1A	GCACCCAUGUCAAAUUCAC	316	TGG	+	27	31	19	6
IL1A	UUCCUCUGAGUCAUGGCGA	317	TGG	+	30	29	20	4
IL1A	AUCGCCAAUGACUCACAGGA	318	AGG	–	13	54	21	4
IL1A	CUCUUCUUCUGGGAAACUCA	319	CGG	–	20	49	22	7
IL1A	AAGCUAAAGGUGCUGACCU	320	AGG	+	10	59	23	5
IL1A	CUCGAAUUAUACUUUGAUUG	321	AGG	+	50	20	24	5
IL1A	UGGAAAACCAGGCGUAGGUC	322	TGG	–	76	1	25	7

【図１３Ｂ】

遺伝子	ｃｒＲＮＡ配列	配列番号	PAM	鎖	オンターゲットランキング	オフターゲットランキング	複合ランキング	エクソン
IL1A	CUUCUUCAGAACCUUCCCGU	323	TGG	+	34	37	26	4
IL1A	GUUGGUCUCACUACCUGUGA	324	TGG	+	44	28	27	7
IL1A	GCCUUCUAUCAUGUAAGCUA	325	TGG	–	55	17	28	4
IL1A	GAUACUGGAAAACCAGGCGU	326	AGG	–	12	63	29	7
IL1A	UACCUUCAAGGAGAGCAUGG	327	TGG	–	1	74	30	4
IL1A	AGACCAACCAGUCGUCGCA	328	AGG	–	9	68	31	6
IL1A	UAUCUGAAAGUCAGUGAUAG	329	AGG	+	33	43	32	7
IL1A	GGCAAUAAACAAGUUUGGAU	330	GGG	+	67	11	33	7
IL1A	CAUCACUGAUGAUGACCUGG	331	AGG	–	2	78	34	4
IL1A	GAGAUACCCAAAACCAUCAC	332	AGG	–	31	50	35	7
IL1A	UUUUGAGAUCUUAGAAUCA	333	CGG	+	61	22	36	6
IL1A	UUGCCACAAAGCAAGACUAC	334	TGG	–	51	33	37	7
IL1A	UGACCUUCAGCAGCACUGGU	335	TGG	+	25	60	38	6
IL1A	CUUUCAGAUCUGGAAAACC	336	AGG	–	22	61	39	7
IL1A	CCAUGCAGCCUUCAUGGAGU	337	GGG	+	17	69	40	4
IL1A	GCUAAGCUUUGGAUCUUUAG	338	AGG	+	81	8	41	4
IL1A	UUACAUAAUCUUGGAUGAAGC	339	AGG	–	29	61	42	5
IL1A	GGCUGCUGCAUGACAUAAUC	340	TGG	–	86	4	43	5
IL1A	ACAUUGCUCAGGAAGCUAAA	341	AGG	+	68	23	44	5
IL1A	GCUUACCUUCAAGGAGAGCA	342	TGG	–	26	65	45	4
IL1A	UUUGUGGCAAUAAACAAGUU	343	TGG	+	60	32	46	7
IL1A	CUCCAGGUCAUCAUCAGUCA	344	TGG	+	19	73	47	4
IL1A	CACCCAGUAGUCUUGCUUG	345	TGG	+	49	44	48	7
IL1A	GAGUUUCCCAGAAGAAGAGG	346	AGG	+	18	76	49	7
IL1A	AGUUGUAUUUCACAUUGCUC	347	AGG	+	56	38	50	5

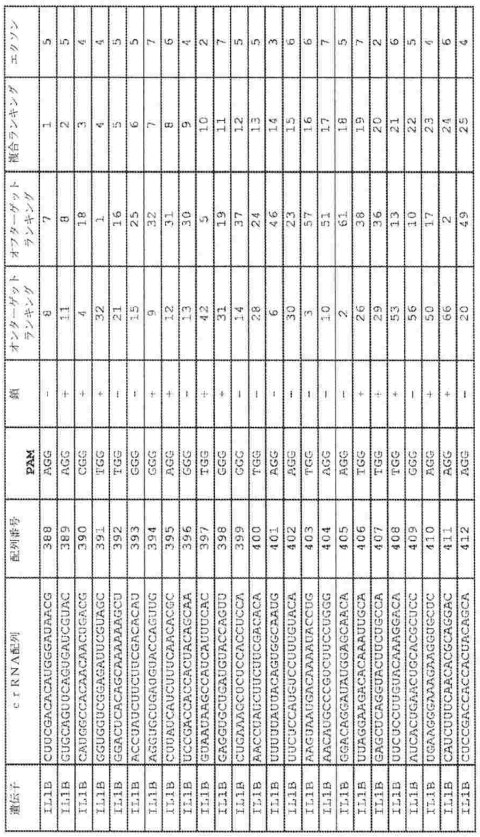
【図１３Ｃ】

遺伝子	ｃｒＲＮＡ配列	配列番号	PAM	鎖	オンターゲットランキング	オフターゲットランキング	複合ランキング	エクソン
IL1A	GGUCAUCAUCAGUGAUGGAU	348	TGG	+	54	41	31	4
IL1A	UUCAAACAUGUCUGGAACUU	349	TGG	+	75	21	32	2
IL1A	GGUAGUAGCAACAACGGGA	350	AGG	–	14	85	33	4
IL1A	UGCAUGCAGCCUUCAUGGAG	351	TGG	+	33	66	34	4
IL1A	UCGAAUUAUACUUUGAUUCA	352	CGC	+	79	24	35	5
IL1A	GGAAGGUUCUGAAGAAGAGA	353	CGG	–	15	88	36	4
IL1A	UUCAGGUCUUCAAACAUGUC	354	TGG	+	77	27	37	2
IL1A	ACUACUGGGUGUCCUGGGCA	355	GGG	–	63	42	38	7
IL1A	AACAUCCAAGCUUACCUUCA	356	AGG	–	76	30	39	4
IL1A	CGUGAGUUCUCCAGAAGAAG	357	AGG	+	36	71	40	7
IL1A	UUGGAUUGAGGGCGUCAUUC	358	AGG	+	82	25	41	5
IL1A	ACCCAUCACUGAUGAUGACC	359	TGG	–	52	55	42	4
IL1A	UUCCCAGAAGAAGAGGAGU	360	TGG	+	28	80	43	7
IL1A	GCUCUCCUUGAAGGUAAGCU	361	TGG	+	57	51	44	4
IL1A	ACUGGGUGUCCUGGGCAGGG	362	GGG	–	40	72	45	7
IL1A	GGGUGCUUAUAAGUCAUCAA	363	AGG	–	32	83	46	6
IL1A	UGAUCAUCUGUCUCUGAAUC	364	AGG	–	69	46	47	3
IL1A	CUGAAACAUCUUACAGCUA	365	ACC	–	62	58	48	2
IL1A	AAGACCUGAAGACAUGUUAC	366	AGG	–	84	36	49	2
IL1A	UACCACCAUGCUCUCCUUGA	367	AGG	+	65	57	50	4
IL1A	GCAAGACUACUGGGUGUGCU	368	TGG	–	43	81	51	7
IL1A	AUUGAUCCAUGCAGCCUUCA	369	TGG	+	73	52	52	4
IL1A	CAAUGACUCAGAGGAAGGUA	370	AGG	–	64	62	53	4
IL1A	CUUACCUUCCUCCUGAGUCAU	371	TGG	+	59	67	54	4
IL1A	UAUCACUGAGACUUUCAGAUAC	372	TGG	–	74	53	75	7

【図１３Ｄ】

遺伝子	ｃｒＲＮＡ配列	配列番号	PAM	鎖	オンターゲットランキング	オフターゲットランキング	複合ランキング	エクソン
IL1A	CCCACUCCAUGAAGGCUGCA	373	TGG	–	46	82	76	4
IL1A	CUCACUACCUGUGAUGGUUU	374	TGG	+	90	39	77	7
IL1A	UCACUACCUGUGAUGGUUUU	375	GGG	+	89	40	78	7
IL1A	CACUGGUUGGGUCUUCAUCU	376	GGG	+	83	47	79	6
IL1A	CUUACCUCUUAACAGUCUCUC	377	AGG	+	87	45	80	2
IL1A	AGUCAUUGGCGAUGGCCCC	378	AGG	+	48	90	81	4
IL1A	UGCCACAAAGCAAGACUACU	379	CGG	–	53	86	82	7
IL1A	GACUACUGGGUUGUGCUUGGC	380	AGG	–	85	56	83	7
IL1A	CAACUGACCUUCAGCAGCAC	381	TGG	+	58	87	84	6
IL1A	CUACUGGGUGUGCUUGGCAG	382	GGG	–	72	75	85	7
IL1A	UACUGGGUUGUGCUUGGCAGG	383	CGG	–	66	84	86	7
IL1A	GCACUGGUUGGGUCUUCAUCU	384	TGG	+	80	70	87	6
IL1A	GACCAACCUCCUCUUCUUCU	385	CGG	–	78	77	88	7
IL1A	GUGAUGGUUGUGGGUAUCUC	386	AGG	+	71	89	89	7
IL1A	AGACCAACCUCCUCUUCUUC	387	TGG	–	88	79	90	7

【図１４Ａ】



遺伝子	ｃｒＲＮＡ配列	配列番号	PAM	鎖	オンターゲットランキング	オフターゲットランキング	複合ランキング	エクソン
IL1B	CUUCGACACAUGGGAUAACG	388	AGG	−	8	7	1	5
IL1B	GUGCAGUGUCAGUGAUCGUAC	389	AGG	+	11	8	2	5
IL1B	CAUGGCCACAACAACUGACG	390	CGG	+	4	18	3	4
IL1B	GGUGGUCGGAGAUUCGUAGC	391	TGG	+	32	1	4	4
IL1B	GCACUCACAGCAAAAAGCCU	392	TGG	−	21	16	5	5
IL1B	ACCUAUCUUCUUCUGCACAU	393	CGG	−	15	25	6	5
IL1B	AGGUGCUGAUGUACCAGUUG	394	GGG	+	9	32	7	7
IL1B	CUUAUCAUCUUUCAACGGC	395	AGG	+	12	31	8	6
IL1B	UCCGACCACCACUACACCAA	396	GGG	−	13	30	9	4
IL1B	GUAAUAAGCCAUCAUUUCAC	397	TGG	+	42	5	10	2
IL1B	GAGGUGCUGAUGUACCAGUU	398	CGG	+	31	19	11	7
IL1B	CUGAAACGCUCCACCUCCA	399	CGG	−	14	37	12	5
IL1B	AACCUACUUCUUCUGCACA	400	TGG	−	28	24	13	5
IL1B	UUUUAUAUAACAGUGGCAAUG	401	AGG	−	6	46	14	3
IL1B	UUCUCCAUGUCCUUUGUACA	402	AGG	−	30	23	15	6
IL1B	AAGUAAUGACAAAUACCUG	403	TGG	−	3	57	16	6
IL1B	AACAUGCCCGUCUUCCUGGG	404	AGG	−	10	51	17	7
IL1B	GGACAGGAUAUGGAGCAACA	405	AGG	−	2	61	18	5
IL1B	UUAGGAAGACACAAUUGCA	406	TGG	+	26	38	19	7
IL1B	GAGCUCAGGUACUUCUGCCA	407	TGG	+	29	36	20	2
IL1B	UUCUCCUUGUACAAGGACA	408	TGG	+	53	13	21	6
IL1B	AUCACGAACUGCACGCUCC	409	CGG	−	56	10	22	5
IL1B	UGAAGGGAAAGAAGGUGCUC	410	AGG	+	50	17	23	4
IL1B	CAUCUUCAACACGCAGGAC	411	AGG	+	66	2	24	6
IL1B	CUCCGACCACCACUACAGCA	412	AGG	−	20	49	25	4

【図１４Ｂ】

遺伝子	ｃｒＲＮＡ配列	配列番号	PAM	鎖	オンターゲットランキング	オフターゲットランキング	複合ランキング	エクソン
IL1B	UGAUAAGCCCACUCUACAGC	413	TCG	−	67	3	26	6
IL1B	GCAGGCCGCGUCAGUGUGUG	414	TGG	−	60	11	27	4
IL1B	UAAGCCCACUCUACAGCUGG	415	AGG	−	18	54	28	6
IL1B	CUUACCUCCAGCUGUAGAGU	416	GGG	+	61	12	29	6
IL1B	GCUCCAUAUCCUGUCCUGG	417	AGG	+	7	73	30	5
IL1B	UUUCCCUUCAUCUUUGAAGA	418	AGG	−	54	28	31	4
IL1B	GCCCCUGCCUGUACUGCGU	419	CGG	+	23	60	32	4
IL1B	GCUGGAUGCCGCCAUCAGA	420	GGG	+	19	64	33	4
IL1B	UUCCUGGGAGGGACCAAAGG	421	CGG	−	25	59	34	7
IL1B	ACUUACCUCCAGCUGUACAG	422	TGG	+	43	41	35	6
IL1B	UUGUGGCCCAUGGACAAGCUG	423	AGG	−	5	79	36	4
IL1B	GAAAACAUGCCCGUCUUCCU	424	GGG	−	64	22	37	7
IL1B	GGGCAUGUUUCUCGCUUGAG	425	AGG	+	38	48	38	7
IL1B	UGGUGAAAGUCAGUUAUAUCC	426	TGG	+	68	20	39	7
IL1B	UCCCAUGUGUCGAAACAAGAU	427	AGG	+	51	39	40	5
IL1B	UGAAGGCCCUUGCUGUAGUGG	428	TGG	+	22	68	41	4
IL1B	UGAGCUCCGCCAGUGAAAUGA	429	TGG	−	58	33	42	2
IL1B	GAUCACUGAACUCCACGCUC	430	CGG	−	52	40	43	5
IL1B	AUCAUUUCACUGGCCGAGCUC	431	AGG	+	84	9	44	2
IL1B	UUGGUCCCCUCCAGCAAGAC	432	GGG	+	49	45	45	7
IL1B	GACCUCUGUCCCCUGGAUGG	433	CGG	−	17	77	46	4
IL1B	GUGAAAUGAUGGCUUAUAC	434	AGG	+	69	29	47	4
IL1B	AGCUUUUUUGCUGUCAAAGAUGA	435	AGG	−	94	4	48	2
IL1B	AGCUUUUUUGCUGUCAAAGAUCC	436	CGG	+	73	26	49	5
IL1B	ACAUGCCGUCUUCCUGGGA	437	GGG	−	24	76	50	7

【図１４Ｃ】

遺伝子	ｃｒＲＮＡ配列	配列番号	PAM	鎖	オンターゲットランキング	オフターゲットランキング	複合ランキング	エクソン
IL1B	GGUACAGAUGUCUUUCCUUG	438	AGG	+	37	63	51	6
IL1B	AGCUGGAUGCCGCCAUCCAG	439	AGG	+	39	62	52	4
IL1B	AGGUCCUGGAAGGAGCACUG	440	CGG	+	1	101	53	4
IL1B	AGAGGUGCUGAUGUACCAGU	441	TGG	+	36	67	54	7
IL1B	CUACAGCAAGGGCUUCAGGC	442	AGG	−	34	69	55	4
IL1B	UGACAAAAUAACCUGUGGCCU	443	TGG	−	100	6	56	6
IL1B	ACUGAAAAGCUCUCCACCUCC	444	AGG	−	59	47	57	5
IL1B	ACUUUCUUCUCCUUGUACAA	445	AGG	+	82	27	58	6
IL1B	CUACCUUCUUCAAAGAUGAA	446	GGG	+	57	52	59	4
IL1B	GGACAAGCUGAGAAGAUGC	447	TGG	−	27	82	60	4
IL1B	UGCGGCCAUCCAGAGGGCAG	448	AGG	+	41	70	61	4
IL1B	UGGAGAGCUUUCAGUUCAUA	449	TGG	+	98	15	62	5
IL1B	GAUGUACCAGUUGGGGAACU	450	GGG	+	16	100	63	7
IL1B	UCCUUGAGGCCCCAAGGCCAC	451	AGG	+	76	42	64	6
IL1B	GCUCAGGUCUUCCUGGA	452	AGG	+	33	85	65	4
IL1B	AGUCUUACCUUCAUCUCUUU	453	AGG	+	105	14	66	3
IL1B	CAAAAAAGCUUGGUGAGUCC	454	TGG	−	86	34	67	5
IL1B	AGAAAACAUGCCCGUCUGCC	455	TGG	−	102	21	68	7
IL1B	AUUCUUCUCCUGAGGCCCA	456	AGG	+	35	92	69	6
IL1B	CAUCUUCCUCAGCUGUCCA	457	TCC	+	46	83	70	4
IL1B	GUUGCUCCAUAUCCUGUCCC	458	TGG	+	87	43	71	5
IL1B	UCAUUCUCCUGGAAGGUCUG	459	TGG	+	62	71	72	4
IL1B	CAUUCUCCUGGAAGGUCUGU	460	GGG	+	63	75	73	4
IL1B	CUCUCCCGCAGUUCUCCUUCC	461	AGG	−	103	35	74	4
IL1B	UGAUGGCCCUAAACAGAUGA	462	AGG	−	40	98	75	3

【図１４Ｄ】

遺伝子	ｃｒＲＮＡ配列	配列番号	PAM	鎖	オンターゲットランキング	オフターゲットランキング	複合ランキング	エクソン
IL1B	AGGUGCUCAGGUCAUUCUCC	463	TGG	+	74	65	76	4
IL1B	AAAUUACCCAAAGAAGAAGA	464	TGG	−	44	96	77	7
IL1B	UUCAAAGAUGAAGGGAAAGA	465	AGG	+	48	95	78	6
IL1B	CUCGACCUCUGCCCUCUGGA	466	TGG	−	72	72	79	4
IL1B	CAUAGAAAUCAAAUAACAAGC	467	TGG	−	55	90	80	7
IL1B	ACCACUACAGCAAGGGCUUC	468	AGG	−	95	50	81	4
IL1B	AGUCUGCCCAGUUCCCCAAC	469	TGG	−	91	55	82	7
IL1B	UCCUGGAAGUCUGUGGGCA	470	GGG	+	65	81	83	4
IL1B	GUCUUCCUGGGAGGGACCAA	471	ACG	−	45	102	84	7
IL1B	UGAUGUACCAGUUGGGGAAC	472	TCG	+	96	53	85	7
IL1B	GUCUUACCUUCAUCUGUUUA	473	GGG	+	106	44	86	3
IL1B	ACCUGUUGGCCUUGGGCCUCA	474	AGG	−	85	66	87	6
IL1B	UUUGGUCCCUGAGAAGA	475	CGG	+	77	78	88	7
IL1B	GCCUGAAGCCCUUCUCUGAG	476	TCG	+	99	56	89	4
IL1B	GCAGAGGUCCAGGUCCUGGA	477	AGG	+	47	109	90	4
IL1B	CCACCUCCAGGGACAGGAUA	478	TGG	−	101	58	91	5
IL1B	AGCUCUUCCACCUCCAGGGAC	479	AGG	−	75	87	92	5
IL1B	UCCCUGCCCACAGACCUUCC	480	AGG	−	90	74	93	4
IL1B	GCAGUGCUCCUUCCAGGACC	481	TGG	−	83	84	94	4
IL1B	CCAUAUCCUGUCCCUGCAGG	482	TGG	+	89	80	95	5
IL1B	GACAAAAUACCUGUGGCCUU	483	GGG	−	71	99	96	6
IL1B	CUCCUGGAGAGGUCUGUGGC	484	ACG	+	81	94	97	4
IL1B	CGCGUCAGUUGUUGUGGCCA	485	TGG	−	70	105	98	4
IL1B	AGUUAUACUCUGCCCCUU	486	TCC	+	92	89	99	7
IL1B	GGCCGCCUUUGGUCCCCUCC	487	AGG	+	78	103	100	7

【図１４Ｅ】

遺伝子	crRNA配列	配列番号	PAM	鎖	オンターゲットランキング	オフターゲットランキング	複合ランキング	エクソン
IL1B	CAUCCAGAGGGCAGAGGUCC	488	AGG	+	88	93	101	4
IL1B	GAGGGCAGAGGUCCAGGUCC	489	TGG	+	97	86	102	4
IL1B	GGGAGGGACCAAAGGCGGCC	490	AGG	−	79	106	103	7
IL1B	GACUUGGUCUUGAAGCUGA	491	TGG	−	80	107	104	3
IL1B	CGCUUUUCCAUCUUCUUCUU	492	TGG	+	107	88	105	7
IL1B	GCACCUCCACCUCUUCCCCC	493	TCC	−	93	104	106	4
IL1B	CUUCUUCUUGGGUAAUUUU	494	TGG	+	108	91	107	7
IL1B	GCUUUUCCAUCUUCUUCUU	495	GGG	+	104	97	108	7
IL1B	UUCUUCUUGGGUAAUUUUU	496	GGG	+	109	108	109	7

【図１５Ａ】

遺伝子	crRNA	配列番号	PAM	エクソン	鎖	オンターゲット(Azimuth2)	オフターゲット	精度(Delphi)	フレームシフト(Delphi)	複合(オフ+精度+フレーム)
IL1b	GAAAUGUGAAGGUGCAGACCA	497	TGG	3	+	70.6	54.6	0.56	98.3	66.3
IL1b	UGAUGGCCCUGGCAAAUGUGA	498	AGG	3	+	66.1	51.5	0.53	91.2	63.2
IL1b	GUUCUCACCUUCACAUUUCC	499	AGG	3	−	36.6	44.3	0.39	87.6	63.6
IL1b	GUCUCACCUUCACAUUUCCA	500	GGG	3	−	62.4	48.6	0.57	83.2	62.9
IL1b	AAAUGUGAAGGUGCAGACCAU	501	GGG	3	+	68.4	61.9	0.41	78.2	60.4
IL1b	GACCUAUUCUCUUGAAGCUGA	502	TGG	3	+	55.9	58.4	0.48	80.4	55.6
IL1b	UUCUUGGAGCUGAUGGCCC	503	TGG	3	+	47.6	67	0.51	47.8	55.3
IL1b	GCCCAUCAGCUUCAAAGAAU	504	AGG	3	−	46.5	45.6	0.46	69.5	53.7
IL1b	CGUGUCAGUCAUGUAGCUU	505	TGG	4	+	42.6	86.8	0.43	84.4	71.4
IL1b	ACUCUUGUUACAGAGCUGGU	506	GGG	4	−	68.9	62	0.64	84	70
IL1b	CCUCAUCCUACCAGAAACUG	507	TGG	4	−	76.7	60.6	0.58	90	69.5
IL1b	AGACCUGAACCACAGUCUC	508	TGG	4	+	54.5	62.1	0.55	89.3	68.8
IL1b	GCUGGUGGGAGACUUUGCAAC	509	TGG	4	−	48.7	74.9	0.53	78.2	68.7
IL1b	CACAGUUCUGGUAGAUGCA	510	GGG	4	+	61.8	66.6	0.56	81	67.9
IL1b	AGGUCUUGGGCAGCAGCACUG	511	TGG	4	−	69.3	49.5	0.57	91.5	66
IL1b	UCAGACUCUGUUACAGAGC	512	TGG	4	−	56.6	65.4	0.49	82.7	65.7
IL1b	AGCUCUGUAACAACAGUCUC	513	ACG	4	+	64.1	58.3	0.62	76.8	65.7
IL1b	GAGAACUGUGGUUCAGGUCU	514	TGG	4	−	49.3	63.7	0.49	80.7	64.5
IL1b	GCAGCAGUGUGGAGAGACCA	515	AGG	4	−	62.5	50.7	0.55	84	63.2
IL1b	UCAGAGUCUGCUGGGUAGAUG	516	AGG	4	+	56.7	66.1	0.43	78.1	62.4
IL1b	CUACCAGAGGAACUUGUUUUC	517	AGG	4	−	35.7	68	0.47	69.9	61.6
IL1b	CAUCCUCCUGGAGCAGCUGU	518	GGG	4	−	57.1	59.3	0.45	78.1	60.8
IL1b	GACCUUUGUUACAGAGCUGG	519	TGG	4	−	54.4	60.4	0.44	75.4	59.9
IL1b	UUUUGCUACAUCUUUGAAGA	520	AGG	4	+	48.9	49.2	0.35	73.5	59.2
IL1b	UCUAGCAAAAGAGUCCUCUUC	521	ACG	4	−	34.5	59.5	0.46	70.6	58.7

【図１５Ｂ】

遺伝子	crRNA	配列番号	PAM	エクソン	鎖	オンターゲット(Azimuth2)	オフターゲット	精度(Delphi)	フレームシフト(Delphi)	複合(オフ+精度+フレーム)
IL1b	UCCUGGAGGACCUGUGUGGCA	522	GGG	4	−	47.8	43.8	0.45	78.7	55.8
IL1b	GCUGAAGAAGCCUGCCCAC	523	AGG	4	+	54.5	52.3	0.41	71.3	54.9
IL1b	UGCUCUUCAGGUCAUCCUCC	524	TGG	4	−	48.6	60.4	0.59	43.9	54.4
IL1b	CUCCUGGAGACCUGUGGGC	525	AGG	4	−	43	46.1	0.41	74.4	53.8
IL1b	CUGCCCACAGGUCUCUCCAGG	526	AGG	4	+	68.4	42.1	0.55	62.4	53.2
IL1b	UCAUCCUCCUGGAGGACCUG	527	TGG	4	−	55.5	44.9	0.45	66.6	52.2
IL1b	UCUUCAGGUCAUCCUCCUGG	528	AGG	4	−	70.1	54	0.45	55.5	51.5
IL1b	GCCCUGCCCACAGGUCUCCC	529	AGG	4	+	48.7	40.8	0.6	42.7	47.8
IL1b	UGAUGCAGCCAUGCAAUCGG	530	TGG	5	+	67.5	89.8	0.6	87.7	79.2
IL1b	CUUGCAGUCCACGGAUGCA	531	TGG	5	−	57.9	87.4	0.61	89.3	79.2
IL1b	AUCGGUGGACUGCAAGUUAC	532	AGG	5	+	47.1	85.8	0.57	93	75.3
IL1b	GUGAACAAACAAGGUAACGG	533	GGG	5	+	74.7	81.2	0.59	82.9	74.4
IL1b	CUUCGGCUCUCCACCUCAA	534	TGG	5	+	50.3	74.1	0.62	87.1	74.4
IL1b	UCGGGCUCUCCACCUCAAUG	535	GGG	5	+	74.9	80.8	0.56	84.6	73.8
IL1b	GGACAAAACCCACAAAUACC	536	TGG	5	+	58.7	66.4	0.64	82.1	70.8
IL1b	UAGACAGCACCAGGUAUUUG	537	TGG	5	−	43.7	66.6	0.61	83.6	70.4
IL1b	GAGUGAUGCAGCCAUGCAAU	538	CGG	5	+	57	77.1	0.49	85	70.4
IL1b	UUCGGGCUCUCCACCUCAAU	539	GGG	5	+	33.9	79.3	0.49	82.3	70.2
IL1b	UGUUGAUCAAACAAGGUAACG	540	GGG	5	+	73.2	76.5	0.53	78.7	69.4
IL1b	AUGUGAACAAACAAGGUAACG	541	GGG	5	+	42.5	38.5	0.62	85.1	68.5
IL1b	GGGGAAAAUGUGAACAAACA	542	AGG	5	+	62.3	49.2	0.63	91.2	67.8
IL1b	GUCUAACUCAUAUGAGCUUUC	543	GGG	5	+	36.6	79.3	0.43	80.4	67.6
IL1b	CAUAUGAGUUAGACAUCACC	544	AGG	5	−	57.8	76.9	0.56	68.9	67.3
IL1b	UGUUCACAUUUCCCCAUGG	545	AGG	5	−	58.9	55.1	0.57	87	66.4
IL1b	UGUCUAACUCAUAUGAGCUU	546	CGG	5	+	49.5	73.7	0.4	82.3	65.3

【図１５Ｃ】

遺伝子	crRNA	配列番号	PAM	エクソン	鎖	オンターゲット(Azimuth2)	オフターゲット	精度(Delphi)	フレームシフト(Delphi)	複合(オフ+精度+フレーム)
IL1b	AGAUGAUAGUUCUGAAAUG	547	TGG	5	−	66.3	48.3	0.53	90.3	63.9
IL1b	GCAUCUGUUUGCAUAGAU	548	AGG	5	−	48.6	56.4	0.66	67.9	63.4
IL1b	UCACAUUUUCCCCAUUCAG	549	TCC	5	−	60.6	57.1	0.46	77.6	60.2
IL1b	AAUGUCAUACAAAGUUA	550	CGG	5	+	58.8	48.2	0.48	78.3	58.2
IL1b	UAUCAUCUGCAAAACAGAUG	551	CGG	5	+	68.8	44.5	0.42	80.1	55.5

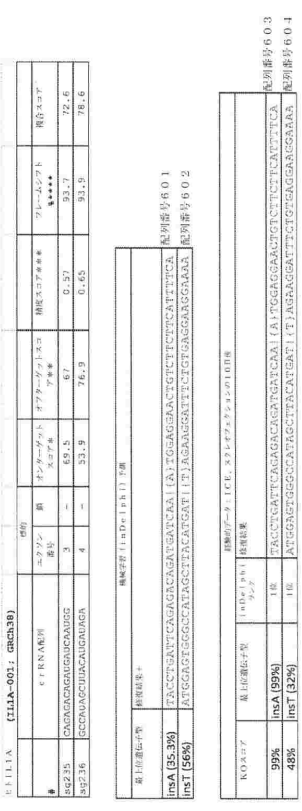
【図１６Ａ】

遺伝子	crRNA	配列番号	PAM	エクソン	鎖	オンターゲット (Azimuth2)	オフターゲット	特異 (Doench)	フレームシフト (Doench)	複合（オフ+特異+フレーム）
IL1A	UGACCAUCUUCUCUCUGAAUGC	552	AGG	3	+	49.9	57.7	0.55	78.3	63.7
IL1A	UUACCUGAUUCAGAGACAGA	553	TGG	3	−	58.3	40.9	0.56	74.7	57.2
IL1A	GACAUCCCAGCUUACCUUCA	554	AGG	4	+	43.8	41.8	0.61	87.2	63.3
IL1A	GUCACAGCUUCAUAUCAUAGA	555	AGG	4	−	54.2	35.6	0.62	91.9	63.2
IL1A	AUGACACAGAAAGAAGUAAG	556	AGG	4	+	66.2	30.5	0.63	96	63.2
IL1A	CACUACCACAUUUUCCUUGA	557	AGG	4	−	37.5	34.3	0.63	89.6	62.3
IL1A	AAUGUCUUCCCAGCUCAUCAU	558	CGG	4	−	54.4	39.3	0.7	73.5	60.9
IL1A	UGGGAGUGUGUCCAGCCAAU	559	GGG	4	+	55.8	39.3	0.52	90.4	60.6
IL1A	AUCAUAGAAGGAUUUCUAUG	560	AGG	4	−	60.9	32.4	0.65	83.7	60.4
IL1A	GGAUGCUUUUGAAUUUCAG	561	AGG	4	−	70.3	33.6	0.61	83.9	59.5
IL1A	CAUUUUCCUUGAAGGUAAGC	562	TGG	4	−	48.3	39.5	0.53	85.7	59.4
IL1A	AUUUUCCUUGAAGGUAAGCU	563	GGG	4	−	61.3	38.6	0.55	84.5	59.4
IL1A	ACAUGCAGCUCCUCAUGAAG	564	GGG	4	−	64.4	39.6	0.54	83.2	58.9
IL1A	UGUCAUUGGCAAUGGCUUCC	565	AGG	4	−	30.2	37.1	0.64	74.8	58.6
IL1A	GUGUUAGUGGUGGCAGCCAA	566	TGG	4	+	56.3	34.9	0.48	88.9	57.3
IL1A	GACCUGUGACCCACUUCAUG	567	AGG	4	+	71.5	42.7	0.47	79.7	56.3
IL1A	CUUACCUUCUUCUGUGCAU	568	TGG	4	−	41.3	34.8	0.57	77.6	56.5
IL1A	UAGAAGAGAUUCCUAUGAGA	569	AGG	4	−	55.8	35.5	0.54	76.9	55.5
IL1A	GCUUACCUUCUAAGGAAAUG	570	TGG	4	+	67.3	33.4	0.54	78.5	55.3
IL1A	GGAAGAUUCUAAGGAAGAGA	571	CGG	4	+	61	26.1	0.52	85.5	54.5
IL1A	AUUCAUCACCGAUGAUGACC	572	TGG	4	+	57.1	44	0.43	71.9	53.6
IL1A	CUUCUUUAGAAUCUUCCCAG	573	TGG	4	−	50.7	34	0.44	79.9	52.6
IL1A	GACAUGCAGUCCUGUGAAG	574	TGG	4	−	58.5	40.5	0.44	72.8	52.4
IL1A	AUUGCCAAUGACACAGAAGA	575	AGG	4	+	61.9	32.1	0.6	64.6	52.2
IL1A	CUUCAAGGAAAAUGUGGUAG	576	TGG	4	+	58.6	35.1	0.59	37.5	43.9

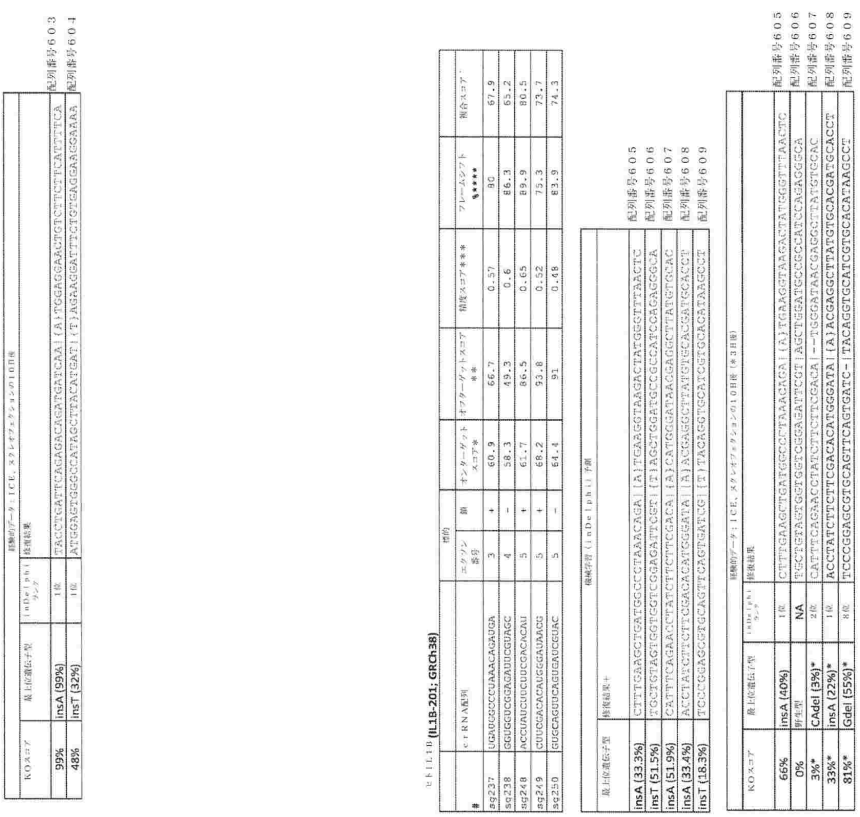
【図１６Ｂ】

遺伝子	crRNA	配列番号	PAM	エクソン	鎖	オンターゲット (Azimuth2)	オフターゲット	特異 (Doench)	フレームシフト (Doench)	複合（オフ+特異+フレーム）
IL1A	CAAGGAAAAUGUGGUAGUGG	577	TGG	4	+	66.8	25.7	0.57	39.6	40.8
IL1A	AGUAUAGUUCGACAAACAGG	578	AGG	5	+	72.1	83.1	0.49	77.6	70.6
IL1A	UCUGUAAUGCAGCAGUCAUG	579	AGG	5	−	68.4	66.6	0.48	90.4	68.3
IL1A	UUACAUAAUUUUGAUAAUGC	580	AGG	5	+	57	57.6	0.56	80.8	64.6
IL1A	GUCGAACUAUACUUUUAUUG	581	AGG	5	−	54.7	85.7	0.62	93.5	80.4
IL1A	AAGUUGUAUGCUACUGAUCU	582	GGG	5	−	51.5	73.5	0.6	92.6	75.4
IL1A	CAAAGUAUAGUUCGACAAAC	583	AGG	5	+	44.3	91.5	0.6	87	79.5
IL1A	GUUCUCAUUCAGUAUAAUU	584	GGG	5	−	42	59	0.56	84.4	66.5
IL1A	AUGAAAAAUACAACUAUAUA	585	AGG	5	+	38	41.8	0.65	94.3	67
IL1A	GAAGUUGUAUGCUACUGAUC	586	TGG	5	−	37.5	83.1	0.52	95.4	72.8
IL1A	GGUUGUCAUUCAGGAUGAAU	587	TGG	5	−	34.6	64.7	0.47	77.9	63.2
IL1A	UUUGAUGAGGGUGGUCAUUC	588	AGG	5	−	29.9	69.4	0.6	85.6	71.7
IL1A	AGUUGUAUUUUCAUUGUUA	589	TGG	5	−	29.3	38.8	0.49	72.5	53.4
IL1A	GACUGCUUCAUUACAGAAUU	590	TGG	5	+	27.7	63.5	0.54	86.1	67.9

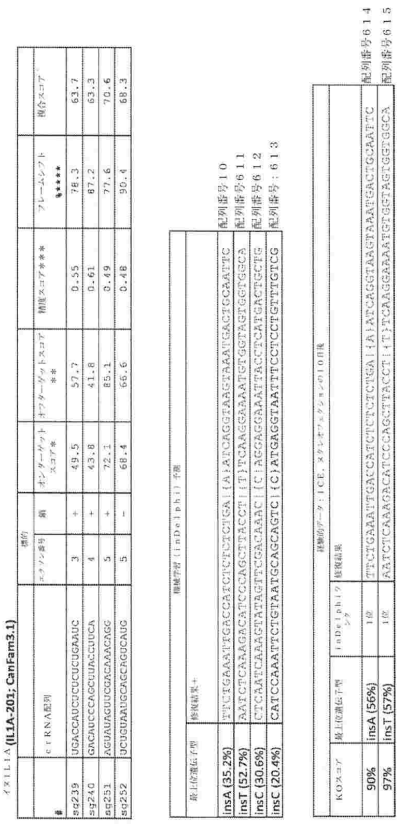
【図１７Ａ】



【図１７Ｂ】



【図１７Ｃ】



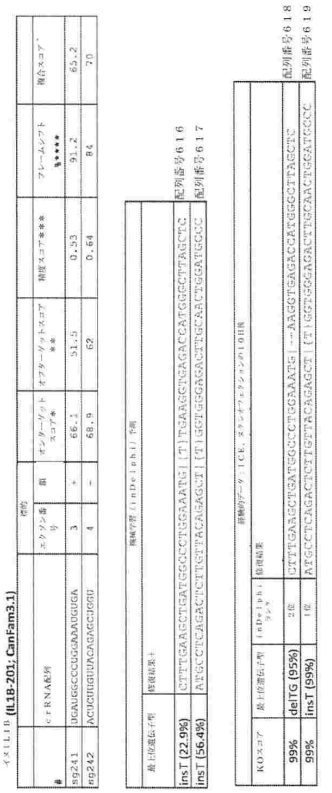
イヌIL1A (IL1A-201; CanFam3.1)

#	crRNA配列	鎖	エクソン番号	前	オンターゲットスコア**	オフターゲットスコア**	精度スコア***	フレームシフト§§§§§	複合スコア^
sg239	UGACCAUCUCUCUCUGAAUC	3	+	49.5	37.7	0.55	78.3	63.7	
sg240	GACAUCCCAGCUUACCUUCA	4	+	43.8	41.8	0.61	87.2	63.3	
sg253	AGUAUACUUCCACAACAGG	5	+	72.1	85.1	0.49	77.6	70.6	
sg252	UCUGUUAUGCAGCAGGCAUG	5	−	68.4	66.6	0.48	90.4	68.3	

最上位遺伝子型 | 修復結果+ | | 配列番号610
insA (35.2%) | TTCTGAAATTGACCATCTCTCTGA(A)ATCAGGTAAGTAAATGACTGCAATTC
insT (52.7%) | AATCTCAAAGACATCCAGCTTACCT(T)TCAAGGAAAATGTGGTAGTGGTGGCA | 配列番号611
insC (30.6%) | CTCAATCAAAGTATAGTTCGACAAAC(C)AGGAGGAAATTACCTCATGACTGCTG | 配列番号612
insC (20.4%) | CATCCAAATTCTGTAATGCAGCAGTC(C)ATGAGGTAATTTCCCTCCTGTTTGTCG | 配列番号：613

KOスコア	最上位遺伝子型	indel phi分	修復結果	配列番号
90%	insA (56%)	1位	TTCTGAAATTGACCATCTCTCTGA(A)ATCAGGTAAGTAAATGACTGCAATTC	配列番号614
97%	insT (57%)	1位	AATCTCAAAGACATCCAGCTTACCT(T)TCAAGGAAAATGTGGTAGTGGTGGCA	配列番号615

【図１７Ｄ】



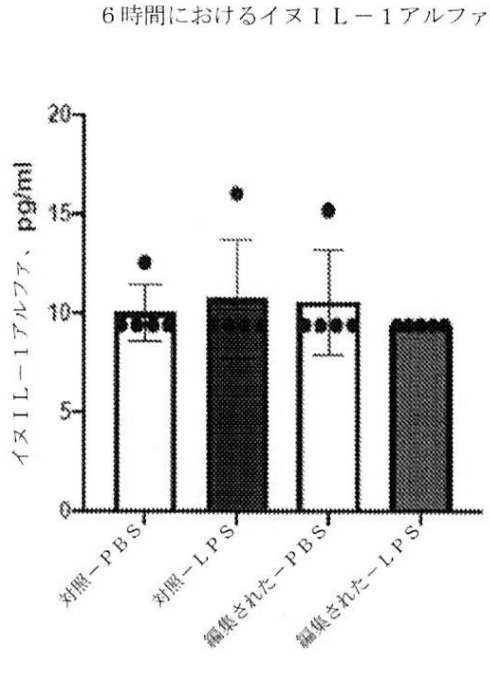
イヌIL1B (IL1B-201; CanFam3.1)

#	crRNA配列	鎖	エクソン番号	前	オンターゲットスコア*	オフターゲットスコア**	精度スコア***	フレームシフト§§§§§	複合スコア^
sg241	UGAUGGCCUGUGAAGUGUGA	3	+	66.1	31.5	0.53	91.2	65.2	
sg242	ACUCUGUUUACAGAGCUGGU	4	−	68.9	62	0.64	84	70	

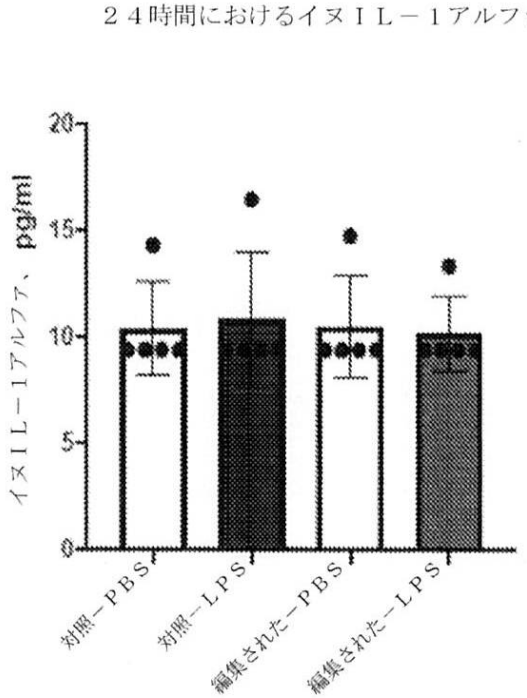
最上位遺伝子型 | 修復結果+ | | 配列番号616
insT (22.9%) | CTTTGAAGCTGATGGCCTTGGAAATG(T)TCAAGGTGAGACCATGGGCTTAGCTC
insT (56.4%) | ATGCCTCAGACTCTTGTTACAGAGCT(T)GCTGGGAGACCTTGCAACTGGATTGCCC | 配列番号617

KOスコア	最上位遺伝子型	indel phi分	修復結果	配列番号
99%	delTG (95%)	2位	CTTTGAAGCTGATGGCCTTGGAAATG(-)--AAGGTGAGACCATGGGCTTAGCTC	配列番号618
99%	insT (99%)	1位	ATGCCTCAGACTCTTGTTACAGAGCT(T)GCTGGGAGACCTTGCAACTGGATTGCCC	配列番号619

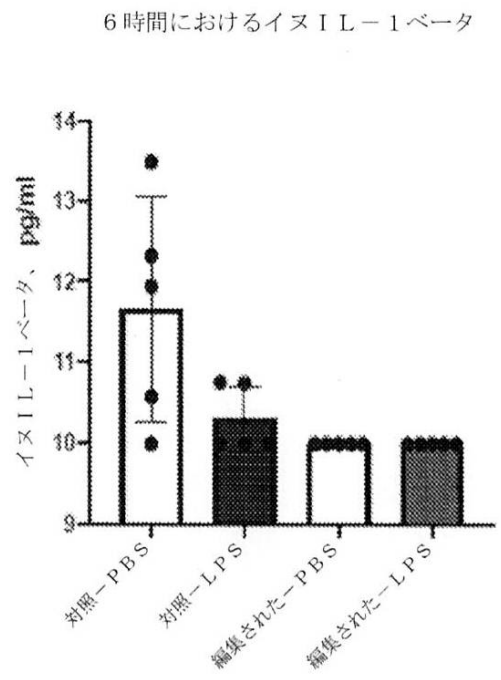
【図１８Ａ】



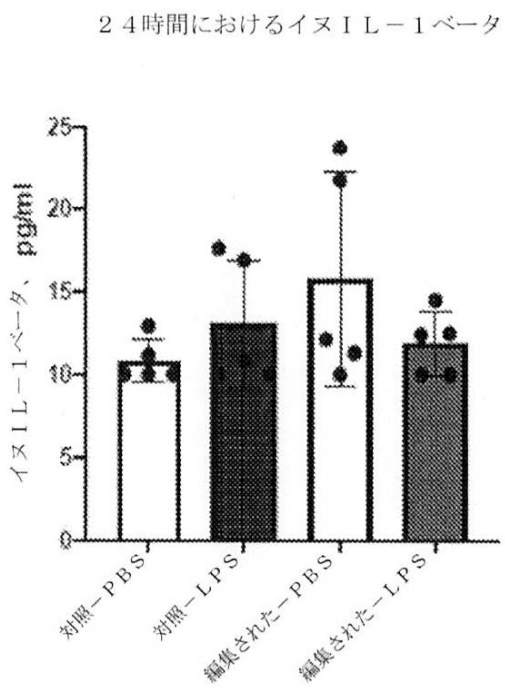
【図１８Ｂ】



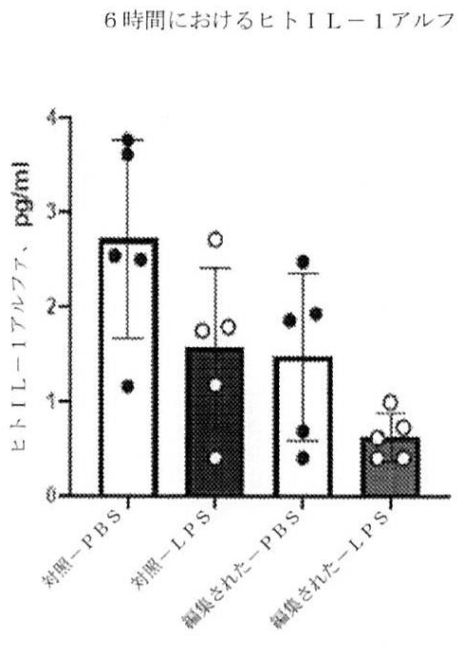
【図１８Ｃ】



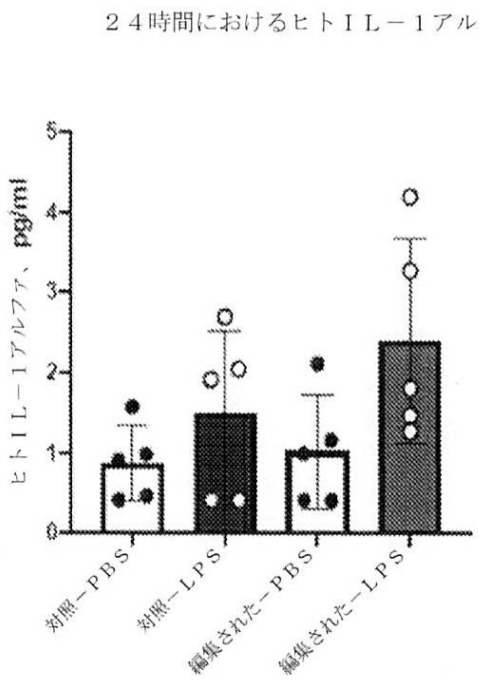
【図１８Ｄ】



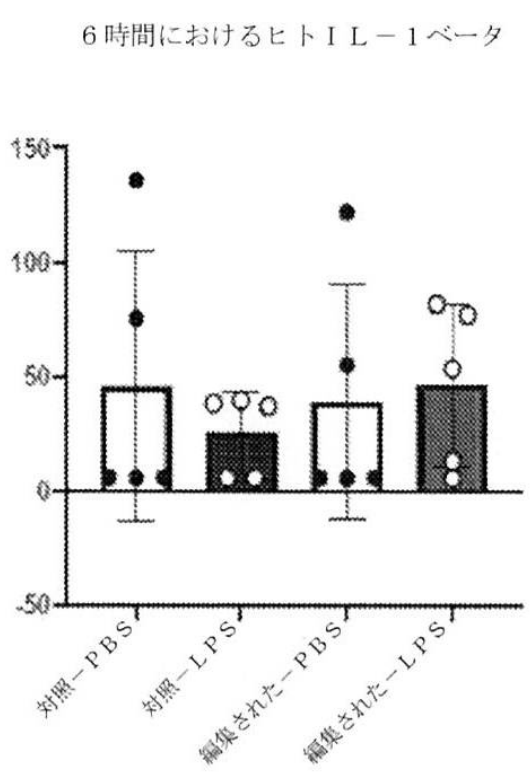
【図１９Ａ】



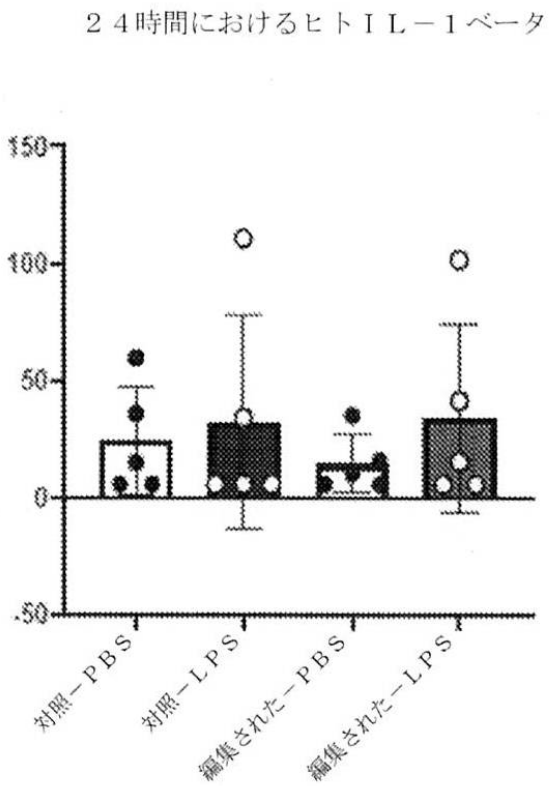
【図１９Ｂ】



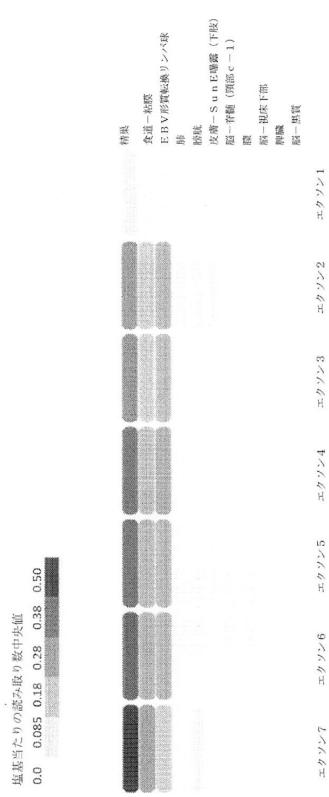
【図１９Ｃ】



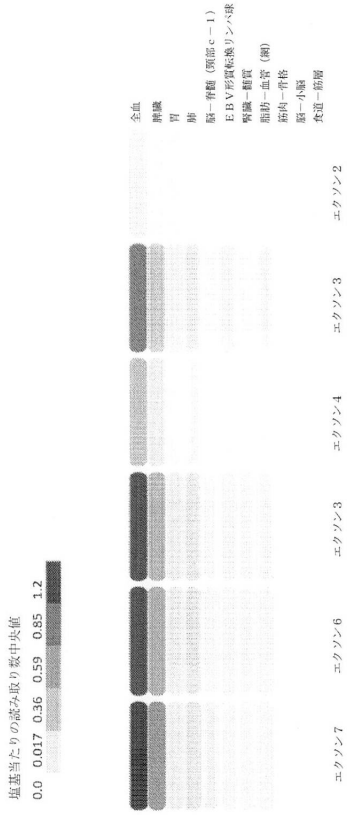
【図１９Ｄ】



【図２０】



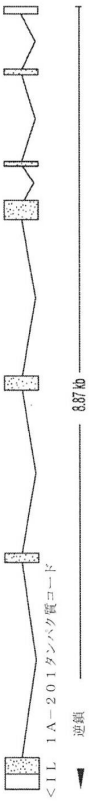
【図２１】



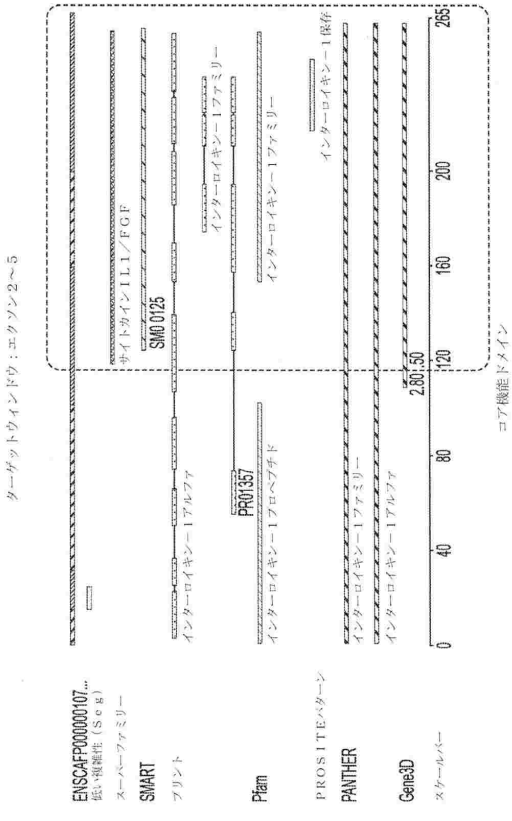
【図２２】

#	シングルガイドRNA（sgRNA）標的配列	エクソン番号	鎖	標的ドメイン	オンターゲット AA	オンターゲット スコア	inDelphi予測 精度	inDelphi予測 フレームシフト	オフターゲット（0～1～2～3～4個のミスマッチ（シードのみ））
ヒトIL-1A (IL1A-001; GRCh38)									
235	CAGAGACAGATGATCAATGG	3	-	インターロイキン-1ファミリー（1-109aa）	25	0.69	0.57	94%	(0-0-0-11-232 (0-0-0-2-1)
236	GCCATAGCTTACATGATAGA	4	-	インターロイキン-1ファミリー（1-109aa）	36	0.52	0.65	94%	(0-0-0-14-133 (0-0-0-2-3)
ヒトIL-1B (IL1B-201; GRCh38)									
237	TGATGGCCCTAAACAGATGA	3	+	インターロイキン-1ファミリー（1-153aa）	32	0.55	0.57	80%	(0-0-7-21-180 (0-0-2-7-2)
238	GGTGGTCCGGAGATTCGTAGC	4	-	インターロイキン-1ファミリー（1-153aa）	50	0.57	0.6	86%	(0-0-1-1-20 (0-0-0-0-0)
248	ACCTACTCTTCTTCGACACAT	5	+		107	0.63	0.65	90%	(0-0-0-15-140 (0-0-0-0-0)
249	CTTCGACACATGGGATAACG	5	+		110	0.66	0.52	75%	(0-0-0-1-38 (0-0-0-0-0)
250	GTGCAGTTCAGTGATCGTAC	5	-		119/120	0.64	0.48	84%	(0-0-0-2-27 (0-0-0-0-0)
259	CATCGCCCACAACAACATCGACG	4	-	インターロイキン-1ファミリー（1-153aa）	66	0.67	0.46	79%	(0-0-1-3-74 (0-0-0-0-2)
260	AGGTCCTGGAAGGAGCACTG	4	-	インターロイキン-1ファミリー（1-153aa）	33/34	0.79	0.64	92%	(0-0-14-4-377 (0-0-4-3-12)

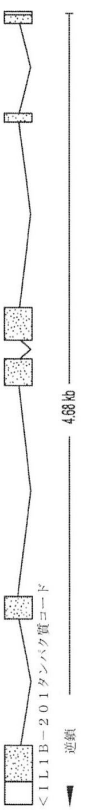
【図２３Ａ】



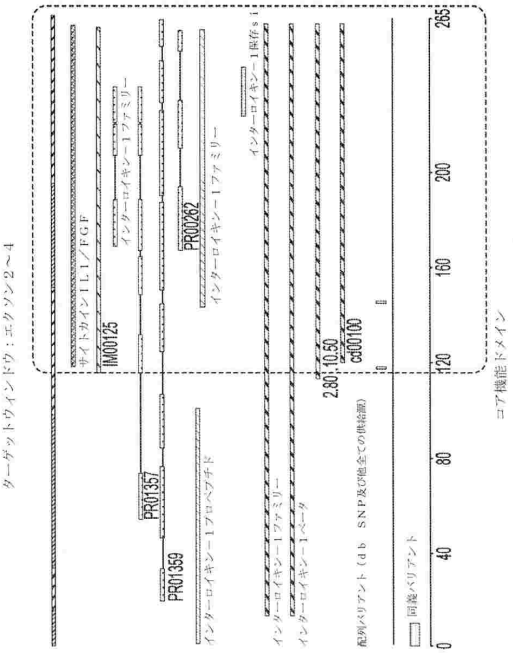
【図２３Ｂ】



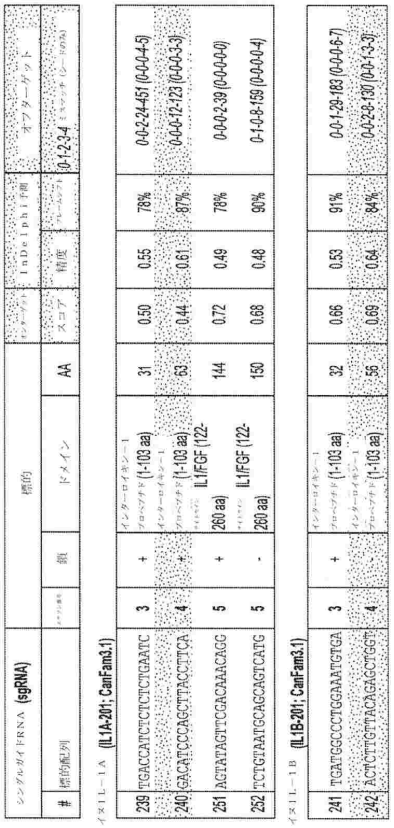
【図２３Ｃ】



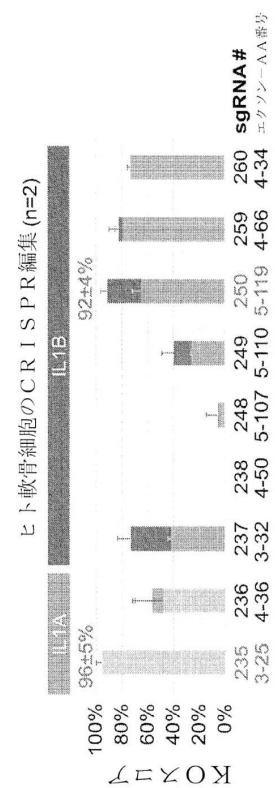
【図２３Ｄ】



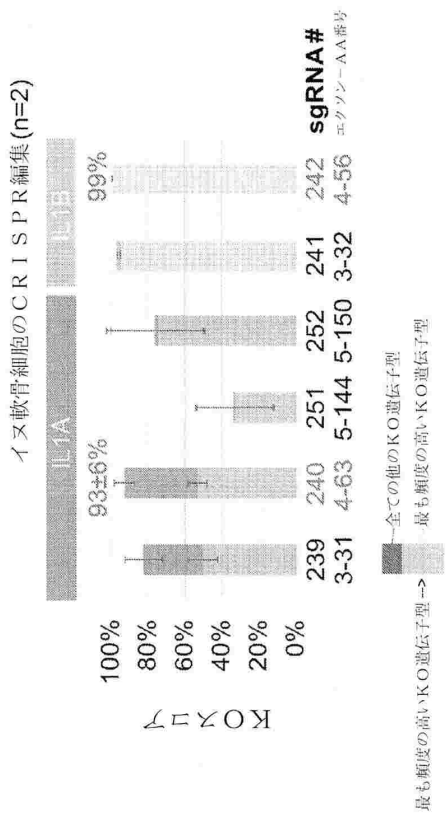
【図２４】



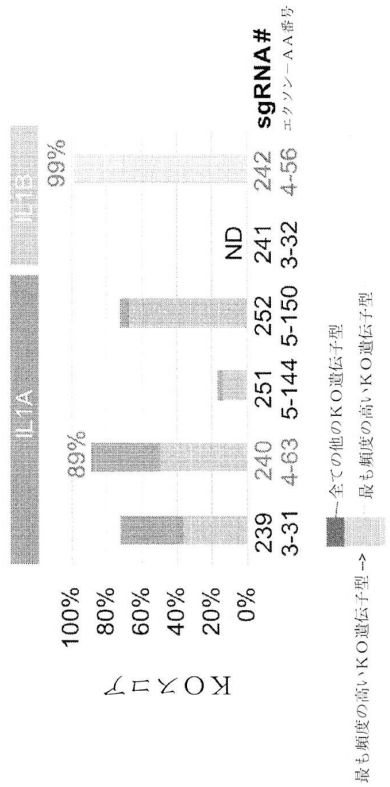
【図２５Ａ】



【図２５Ｂ】



【図２５Ｃ】



【図２６】

イヌのイヌゲノム中のｓｇＲＮＡ ＃２４０のインシリコ予測オフターゲット

ターゲット	配列 (5'→3')	PAM	スコア	遺伝子	染色体	鎖	位置	ミスマッチ	ターゲット	編集効率
	GACAACCCCAGCTTACCTTCA	AGG	100	IL1A	chr17	-1	38977152	0	真	97%
#1	CACAACCCCAGCTTACCTTCA	CGG	1.67322207	lncRNA	chr27	-1	34712401	3	偽	0%
#2	TTAATTACCAGCTTACCTTCA	CAG	1.54205094		chr35	-1	18871659	3	偽	0%
#3	CTGGACCCCAGCTTACCTTCA	CAG	1.32351687		chr10	-1	2693301	4	偽	0%

イヌのイヌゲノム中のｓｇＲＮＡ ＃２４２のインシリコ予測オフターゲット

ターゲット	配列 (5'→3')	PAM	スコア	遺伝子	染色体	鎖	位置	ミスマッチ	ターゲット	編集効率
	ACTCTTGTTACAGACTTGGT	GGG	100	IL1B	chr17	1	37022194	0	真	99%
#1	ACTTTTGTTCAGAGCTTGGT	CAG	6.16161972		chr33	-1	20224937	2	偽	0%
#2	CCTCAATGCTACAGAGCTGGT	GGG	2.76664774		chr1	-1	47541663	3	偽	99%
#3	GTGCTTGTTACAGACTTGGT	GGG	2.32143742		chr26	-1	32223843	3	偽	25%

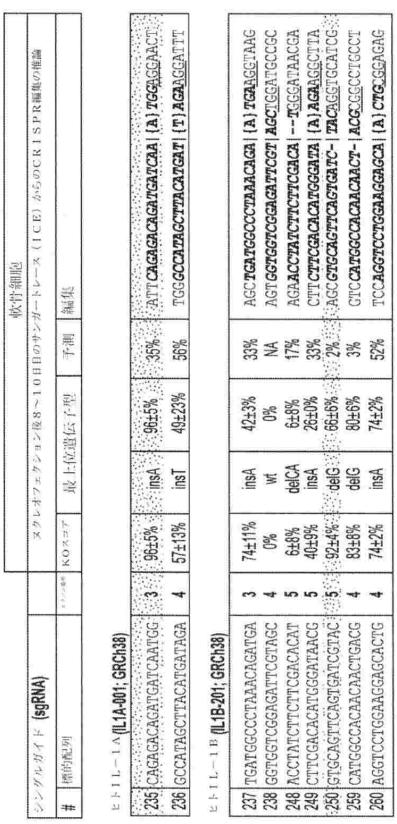
【図２７Ａ】

	オンターゲット	オフターゲット	オフターゲット
２日目	99%	99%	0%
１０日目	99%	99%	6%

【図２７Ｂ】

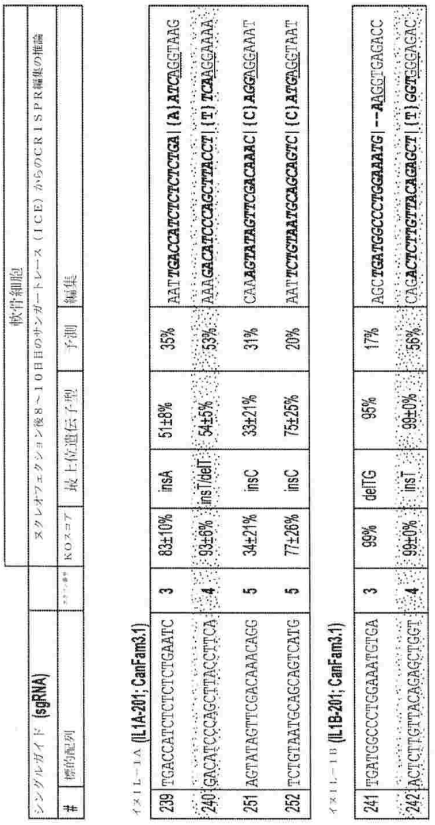
	オンターゲット	オフターゲット＃２		オフターゲット＃３	
２日目	99%	0%		0%	
１０日目	99%	0%		0%	

【図２８Ａ】



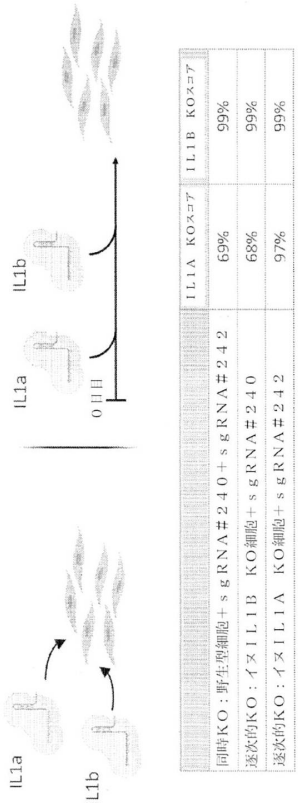
	軟骨細胞						
シングルガイド（sgRNA）		スクレオフェクション後8～10日目のサンガートレース（ICE）からのCRISPR編集の推論					
#	感作配列	ノーマル	KOスコア	最上位遺伝子型	予測	編集
ヒトIL-1A (IL1A-001; GRCh38)							
235	CAGAGACAGATGATCAATGG	3	96±5%	insA	96±5%	35%	ATT**CAGAGACAGATGATCAA**[A]TGGAGGAACTT
236	GCCATTAGCTTACATCATGATAGA	4	57±13%	insT	49±23%	56%	TGG**CCATTAGCTTACATCATGAT**[T]AGAAGGATTT
ヒトIL-1B (IL1B-201; GRCh38)							
237	TGATGGCCCTAAACAGATGA	3	74±11%	insA	42±3%	33%	AGC**TGATGGCCCTAAACAGA**[A]TGAAGGTAAG
238	GGTGGTCGGAGATTCGTAGC	4	0%	wt	0%	NA	AGT**GGTGGTCGGAGATTCGT**[AGC]TGGATCCCGC
248	ACCTATCTTCTTCGACACAT	5	6±8%	delCA	6±8%	17%	AGA**ACCTATCTTCTTCGACA**[--]TGGATAACCA
249	CTTCGACACATGGGATAACG	5	40±9%	insA	26±0%	33%	CTT**CTTCGACACATGGGATA**[A]AGAAGGCTTA
250	GTGCAGTTCAGTGATCGTAC	5	92±4%	delG	86±6%	2%	AGC**GTGCAGTTCAGTGATC**[TAC]TGGTGCATCG
259	CATCGCCACAACAACTGACG	4	83±6%	delG	80±6%	3%	GTC**CATCGCCACAACAACT**[ACG]CGGCCTGCCT
260	AGGTCCTGGAAGGAGCACTG	4	74±2%	insA	74±2%	52%	TCC**AGGTCCTGGAAGGAGCA**[A]CTGCGGAGAG

【図２８Ｂ】



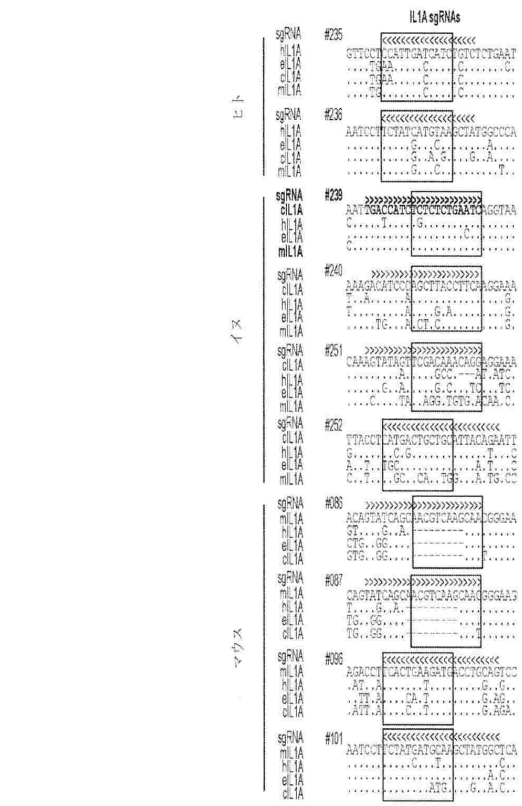
	軟骨細胞						
シングルガイド（sgRNA）		スクレオフェクション後8～10日目のサンガートレース（ICE）からのCRISPR編集の推論					
#	感作配列	ノーマル	KOスコア	最上位遺伝子型	予測	編集
イヌIL-1A (IL1A-201; CanFam3.1)							
239	TGACCATCTCTCTCTCGAATC	3	83±10%	insA	51±8%	35%	AAT**TGACCATCTCTCTCTCGA**[A]ATCAGGTAAG
240	GACATCCCAGCTTACCTTCA	4	93±6%	insT/delT	54±5%	53%	AAA**GACATCCCAGCTTACCT**[T]TCAAGGAAAA
251	AGTATAGTTCGACAAACAGG	5	34±21%	insC	33±21%	31%	CAA**AGTATAGTTCGACAAAC**[C]AGGAGGAAAT
252	TCTGTAATGCAGCAGTCATG	5	77±26%	insC	75±25%	20%	AAT**TCTGTAATGCAGCAGTC**[C]ATGAGGTAAT
イヌIL-1B (IL1B-201; CanFam3.1)							
241	TGATGGCCCTGGAAATGTGA	3	99%	delTG	95%	17%	AGC**TGATGGCCCTGGAAATG**[--]AAGGTGAGACC
242	ACTCTTGTTTACAGAGCTGGT	4	99±0%	insT	99±0%	56%	CAG**ACTCTTGTTTACAGAGCT**[T]GGTAGGAGAC

【図２９】

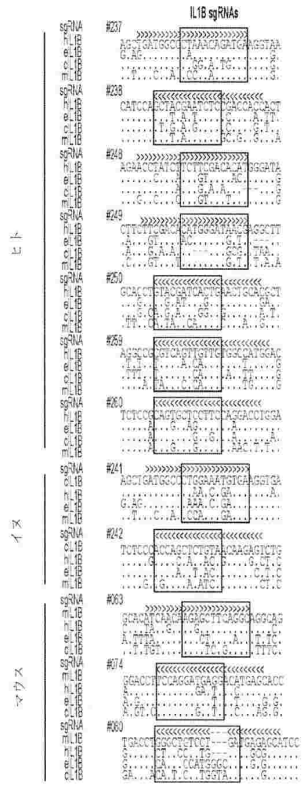


	IL1A KOスコア	IL1B KOスコア
同時KO：野生型細胞＋sgRNA#240＋sgRNA#242	69%	99%
逐次的KO：イヌIL1B KO細胞＋sgRNA#240	68%	99%
逐次的KO：イヌIL1A KO細胞＋sgRNA#242	97%	99%

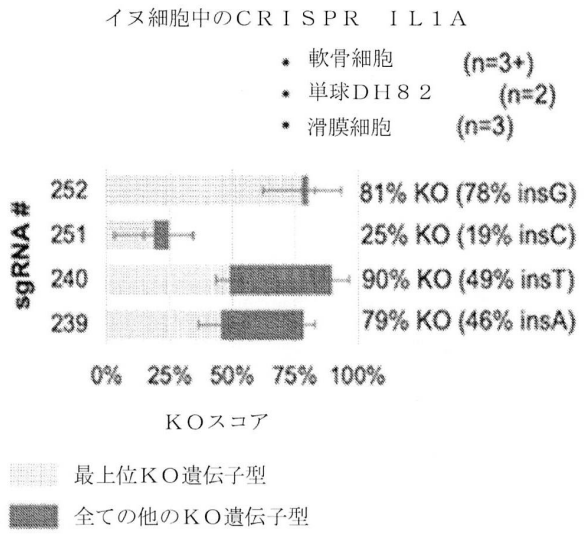
【図３０Ａ】



【図３０Ｂ】



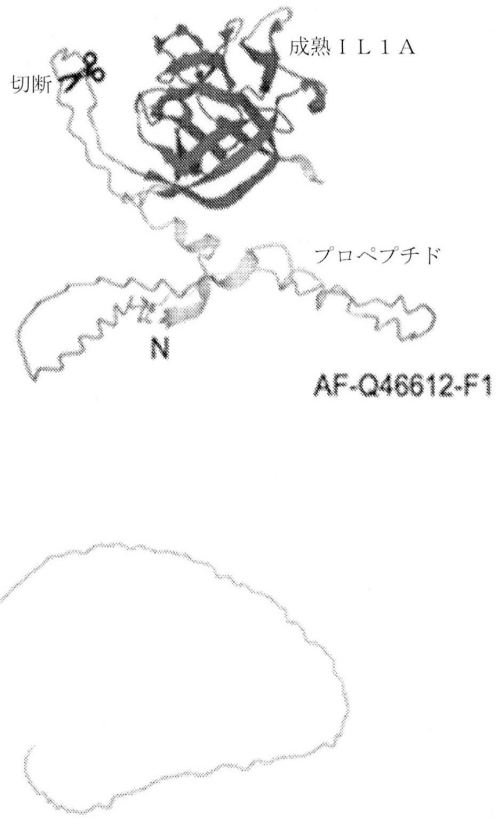
【図３１Ａ】



【図３１Ｂ】



【図３１Ｃ】



【図３２Ａ】

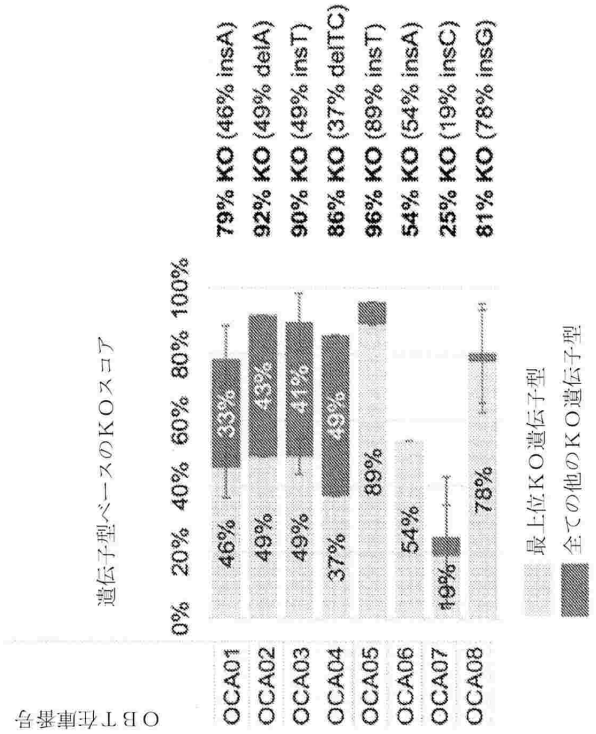
古いsg番号	新しい参照／番号	エクソン	アミノ酸切断	標的配列	GC %	PAM
239	OCA01	3	IL1A-203: DHLSL-N[31]	TGACCATCTCTCTCTGAATC	45	AGG
360	OCA02	4	IL1A-203: MSCDP-L[43]	ACATGCAGTCCTCATGAAGT	45	GGG
240	OCA03	4	IL1A-203: TSQLT-F[63]	GACATCCCAGCTTACCTTCA	50	AGG
358	OCA05	5	IL1A-203: LNDNL-N[137]	GTCGAACTATACTTTGATTG	35	AGG
251	OCA07	5	IL1A-203: SIVRQ-T[144]	AGTATAGTTCGACAAACAGG	40	AGG
359	OCA04	5	IL1A-203: IMKPR-S[109]	AAGTTGTATGCTACTGATCT	35	GGG
361	OCA06	5	IL1A-203: QSIVR-Q[143]	CAAAGTATAGTTCGACAAAC	35	AGG
252	OCA08	5	IL1A-203: GGNYL-M[150]	TCTGTAATGCAGCAGTCATG	45	AGG

【図３２Ｂ】

新しい参照／番号	エクソン	タンパク質O466 12：アミノ酸含量 [切断位置]	オフターゲット MIT	CFD	オフ	オフターゲット番号	オンターゲット Azimuth	DeepSpCas9	CrisprScan	オン	フレームシフト Lindel	InDelphi	フレームシフト	精度
OCA01	3	DHLSL-N[31]	60	81	71	477	45	23	33	34	67	78	73	55
OCA02	4	MSCDP-L[43]	81	89	85	112	67	62	33	54	82	83	83	54
OCA03	4	TSQLT-F[63]	79	86	83	135	42	18	27	29	83	87	85	61
OCA04	5	IMKPR-S[109]	77	90	84	125	51	46	49	49	86	93	89	60
OCA05	5	LNDNL-N[137]	91	97	94	29	56	40	52	49	91	94	92	62
OCA06	5	QSIVR-Q[143]	94	93	94	66	43	11	58	37	82	87	85	60
OCA07	5	SIVRQ-T[144]	91	97	94	41	68	62	49	60	72	78	75	49
OCA08	5	GGNYL-M[150]	51	86	69	168	62	49	40	50	84	90	87	48

フィットネス

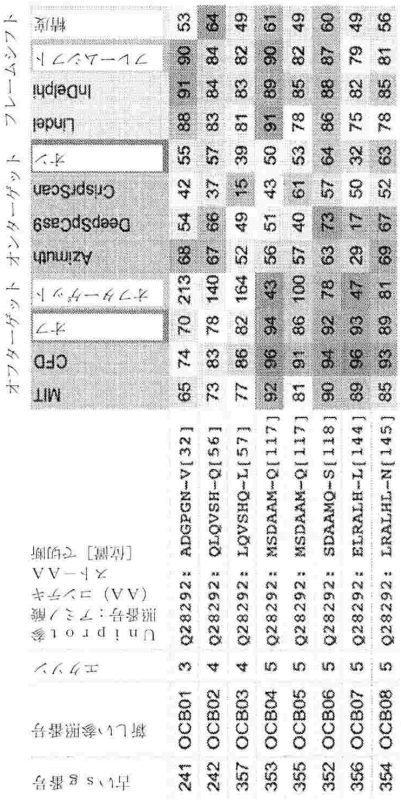
【図３２Ｃ】



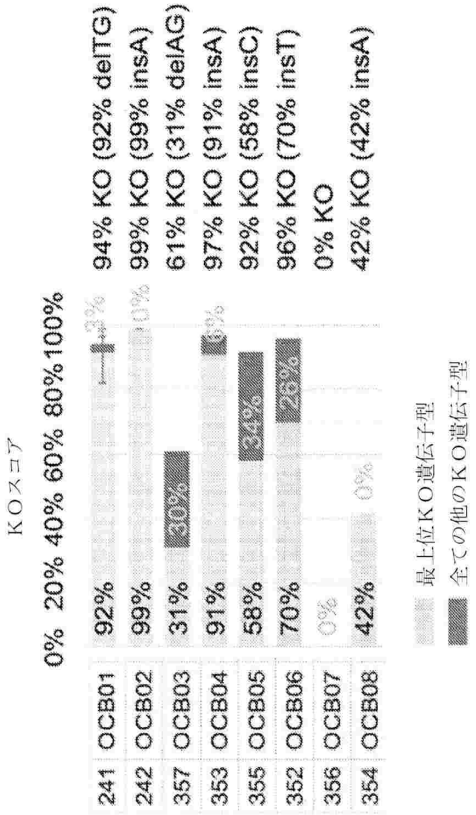
【図３３Ａ】

新しい参照番号	エクソン	アミノ酸切断	標的配列	GC %	PAM
353	5	MSDAAM-Q[117]	CTTGCAGTCCACCGATTGCA	55	TGG
356	5	ELRALH-L[144]	TTCGGGCTCTCCACCTCAAT	55	GGG
352	5	SDAAMQ-S[118]	TGATGCAGCCATGCAATCGG	55	TGG
354	5	LRALHL-N[145]	TCGGGCTCTCCACCTCAATG	60	GGG
355	5	MSDAAM-Q[117]	GAGTGATGCAGCCATGCAAT	50	CGG
357	4	LQVSHQ-L[57]	TCAGACTCTTGTTACAGAGC	45	TGG
242	4	QLQVSH-Q[56]	ACTCTTGTTACAGAGCTGGT	45	GGG
241	3	ADGPGN-V[32]	TGATGGCCCTGGAAATGTGA	50	AGG

【図３３Ｂ】



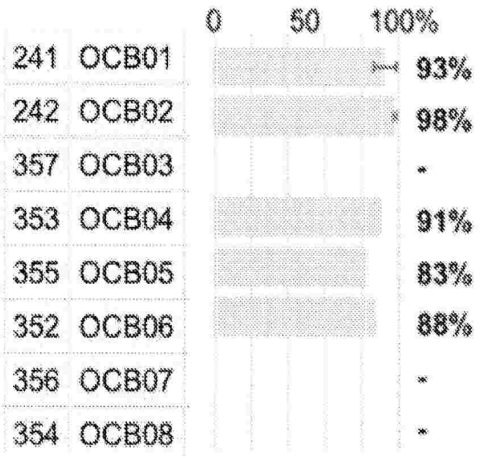
【図３３Ｃ】



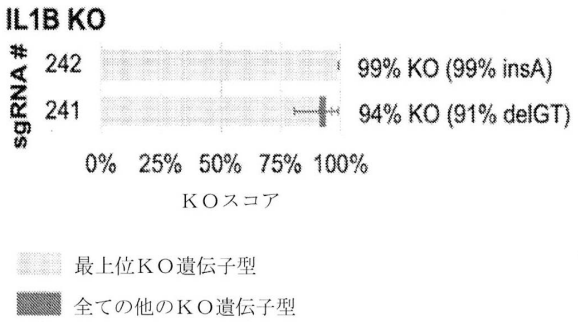
【図３３Ｄ】



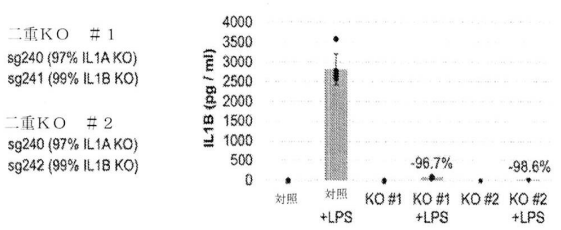
タンパク質／表現型ベースのＫＯスコア（ＥＬＩＳＡ）



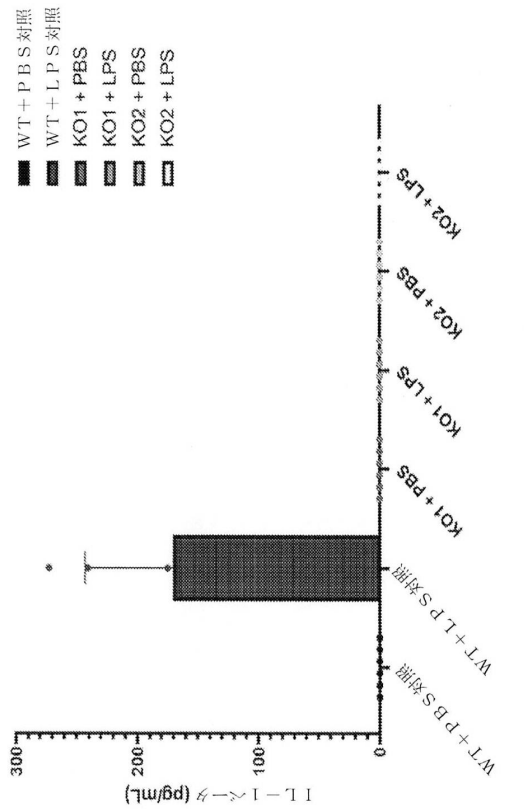
【図３４Ａ】



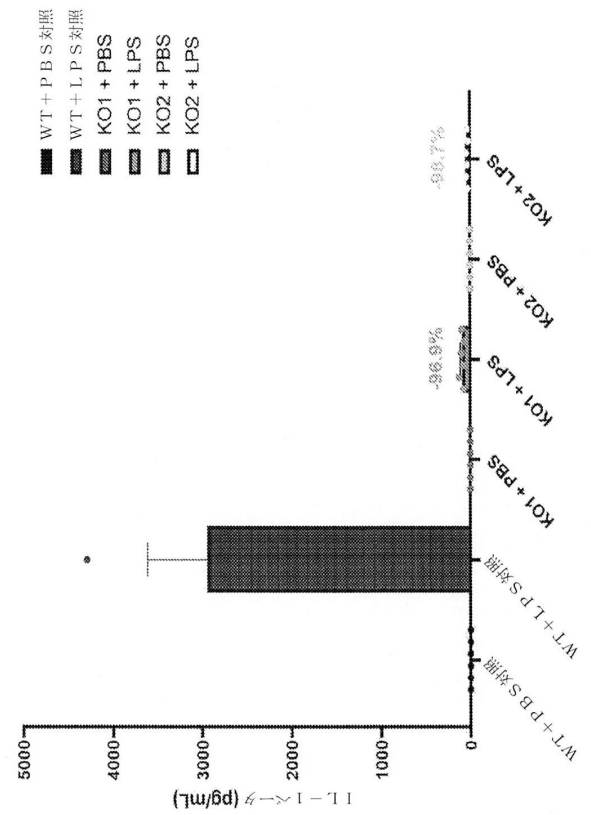
【図３４Ｂ】



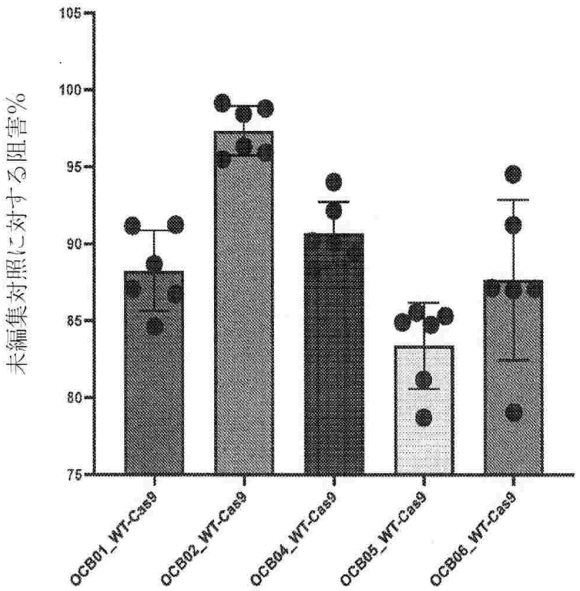
【図３５Ａ】



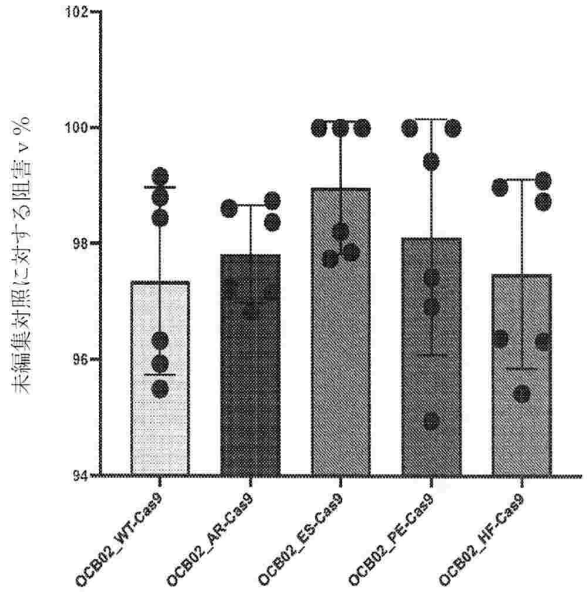
【図３５Ｂ】



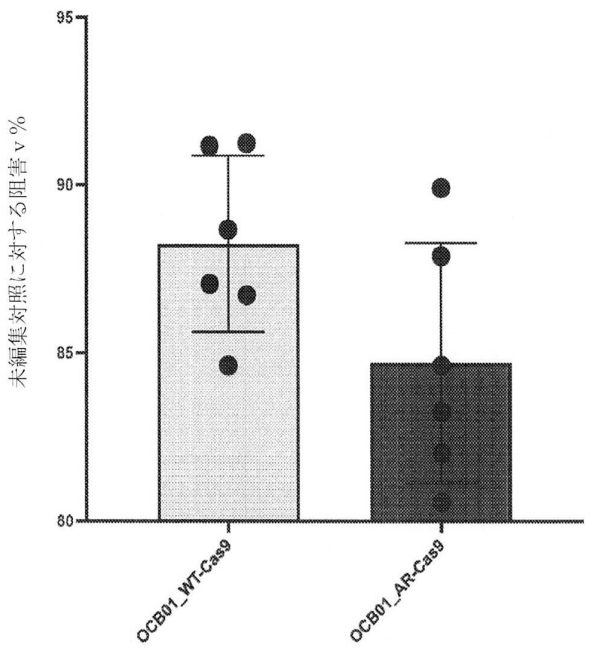
【図３６】



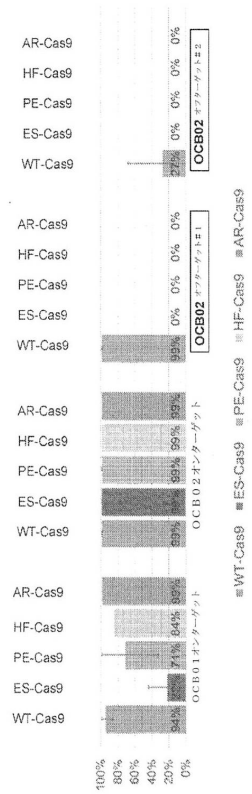
【図３７Ａ】



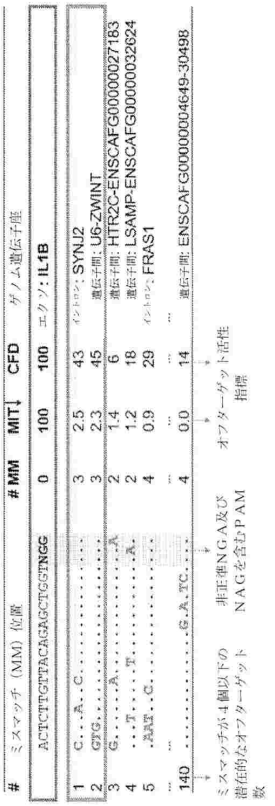
【図３７Ｂ】



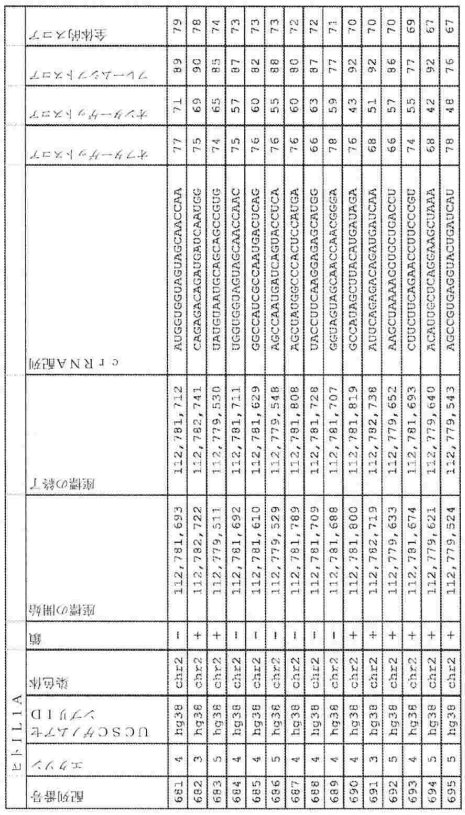
【図３８Ａ】



【図３８Ｂ】

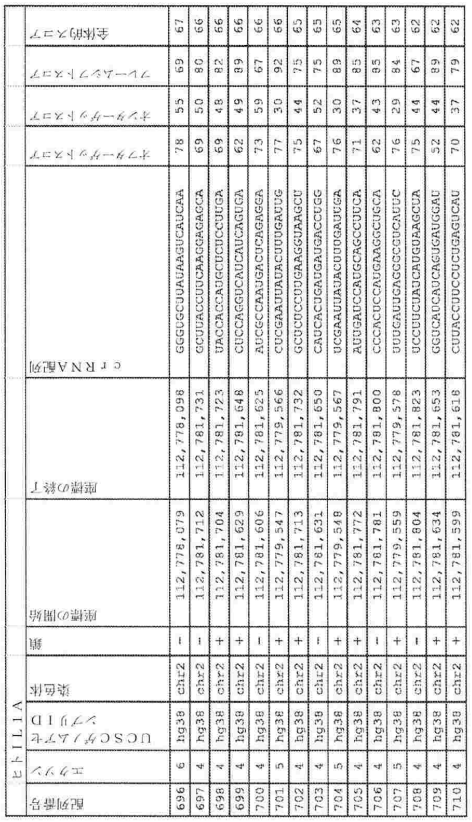


【図３９Ａ】



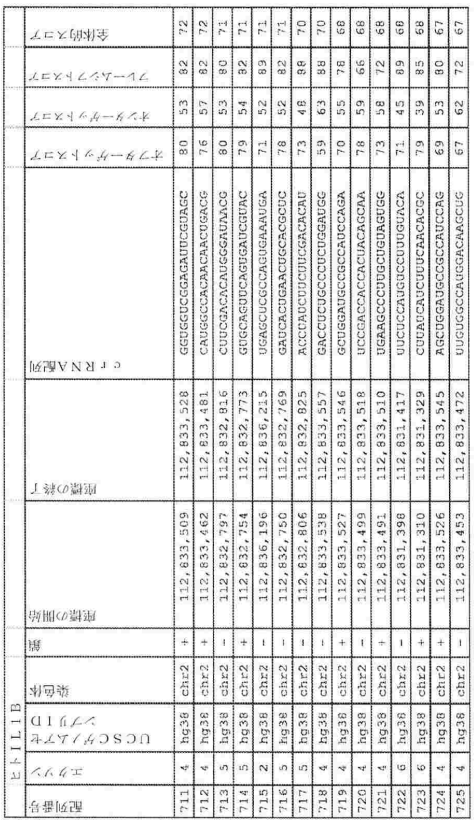
ヒトIL1A										
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	gRNA配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	全体的スコア
681	4	hg38	chr2	−	112,781,693	112,781,712	AUGCUGGUAGUAGCAACCAA	77	71	79
682	3	hg38	chr2	+	112,782,722	112,782,741	CACAGACAGAUGAUCAAUGG	75	69	78
683	5	hg38	chr2	+	112,779,511	112,779,530	UAUGUAAUGCAGCAGCGGUG	74	65	74
684	4	hg38	chr2	−	112,781,692	112,781,711	UGGUGGUAGUAGCAACAAC	75	57	73
685	4	hg38	chr2	−	112,781,610	112,781,629	GGCCAUCGCCAAUGACUCAG	76	60	82
686	5	hg38	chr2	−	112,779,529	112,779,548	AGCCAAUGAUCAGUACCUCA	76	55	88
687	4	hg38	chr2	−	112,781,789	112,781,808	AGCUAUGGCCCACUCCAUGA	76	60	80
688	4	hg38	chr2	−	112,781,709	112,781,728	UACCUUCAAGGAGACAGCGG	66	63	87
689	4	hg38	chr2	−	112,781,688	112,781,707	GGUAGUAGCAACCAACGGGA	78	59	77
690	4	hg38	chr2	+	112,781,800	112,781,819	GCCAUAGCUUACAUGAUAGA	76	43	92
691	3	hg38	chr2	+	112,782,719	112,782,738	AUUCAGAGACAGAUGAUCAA	68	51	92
692	5	hg38	chr2	+	112,779,633	112,779,652	AACCUAAAACCUCCUCACCU	66	57	86
693	4	hg38	chr2	+	112,781,674	112,781,693	CUUCUUCAGAACCUUCCGGU	74	55	77
694	5	hg38	chr2	+	112,779,621	112,779,640	ACAUUGCCUCAGGAAGCUAAA	68	42	92
695	5	hg38	chr2	+	112,779,524	112,779,543	AGCCGUGAGGUACUGAUCAU	78	48	76

【図３９Ｂ】



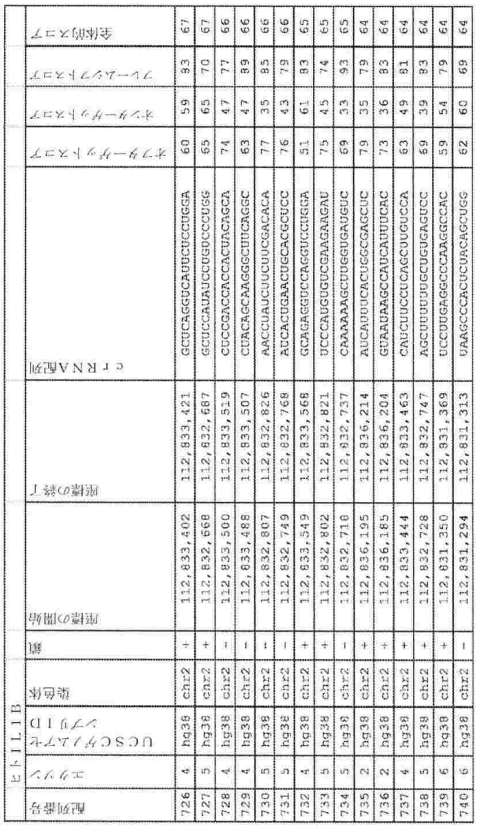
ヒトIL1A										
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	gRNA配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	全体的スコア
696	6	hg38	chr2	−	112,778,079	112,778,098	GGGUCGCUUAUAAGUCAUCAA	78	55	67
697	4	hg38	chr2	−	112,781,712	112,781,731	GCUUACCUUCAAGGAGAGCA	69	50	66
698	4	hg38	chr2	+	112,781,704	112,781,723	UACCACCAUGCUCCUUCUGA	69	48	66
699	4	hg38	chr2	+	112,781,629	112,781,648	CUCCAGGUCAUCAUCAGUGA	62	49	66
700	4	hg38	chr2	−	112,781,606	112,781,625	AUCGCCAAUGACUCAGAGGA	73	59	67
701	5	hg38	chr2	+	112,779,547	112,779,566	CUCGAAUUAUACUUUGAUUG	77	30	92
702	4	hg38	chr2	+	112,781,713	112,781,732	GCUCCCCUUGAGGUAAGCUU	75	44	75
703	4	hg38	chr2	−	112,781,631	112,781,650	CAUCACUGAUGAUGACCUGG	67	52	75
704	5	hg38	chr2	+	112,779,548	112,779,567	UCGAAUUAUACUUUGAUUGA	76	30	89
705	4	hg38	chr2	+	112,781,772	112,781,791	AUUGAUCCAUGCAGCCUUCA	71	37	85
706	4	hg38	chr2	−	112,781,781	112,781,800	CCCACUCCAUGAAGGCUGCA	62	43	85
707	5	hg38	chr2	+	112,779,559	112,779,578	UUUGAUUGAGCCCGUCAUUC	76	29	84
708	4	hg38	chr2	−	112,781,804	112,781,823	UCCUUCUAUCAUUGUAAGCUA	75	44	67
709	4	hg38	chr2	+	112,781,634	122,781,653	GGUCAUCAUCAGUGAUGGAU	52	44	89
710	4	hg38	chr2	+	112,781,599	112,781,618	CUUACCUUCCUCUGAGUCAU	70	37	79

【図４０Ａ】



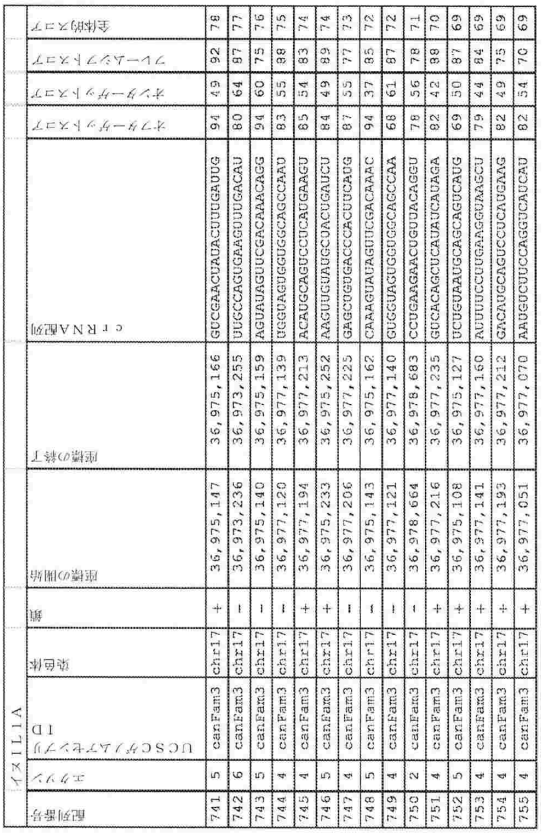
ヒトIL1B										
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	gRNA配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	全体的スコア
711	4	hg38	chr2	+	112,833,509	112,833,528	GGUGGCUCGGAGAUUCGUAGC	80	53	72
712	4	hg38	chr2	+	112,833,481	112,833,500	CAUGGCCACAACACUGACGG	76	57	72
713	5	hg38	chr2	−	112,832,816	112,832,797	CUUCGACACAUGGGAUUAUG	80	53	80
714	5	hg38	chr2	+	112,832,773	112,832,754	GUGCAGCUCAGUGAUCGUAC	79	54	82
715	2	hg38	chr2	−	112,836,225	112,836,196	UGAGCUCGCCAGUGAAAUGA	71	52	89
716	5	hg38	chr2	−	112,832,769	112,832,750	GAUCACUGAACUGCACGCUC	78	52	82
717	5	hg38	chr2	−	112,832,825	112,832,806	ACCUAUCUUCUUCUGACACAU	73	48	88
718	4	hg38	chr2	−	112,833,557	112,833,538	GACCUCUGCCCUCUGGAUGG	59	63	88
719	4	hg38	chr2	+	112,833,546	112,833,527	GCUGGAUGCCGCCAUCCAGA	70	55	78
720	4	hg38	chr2	−	112,833,518	112,833,499	UCCGACCACCACUACAGCAA	78	59	66
721	4	hg38	chr2	+	112,833,510	112,833,491	UGAAGCCCCUGCUGUAGUGG	73	58	72
722	6	hg38	chr2	−	112,831,417	112,831,398	UUCUCCAUGUCCUUUGUACA	71	45	89
723	6	hg38	chr2	+	112,831,329	112,831,310	CUUAUCAUCUUCAACACGC	79	39	85
724	4	hg38	chr2	+	112,833,545	112,833,526	AGCUGGAUGCCGCCAUCCAG	69	53	80
725	4	hg38	chr2	−	112,833,472	112,833,453	UUCUGGCCAGGGACAACGCUG	67	62	72

【図４０Ｂ】



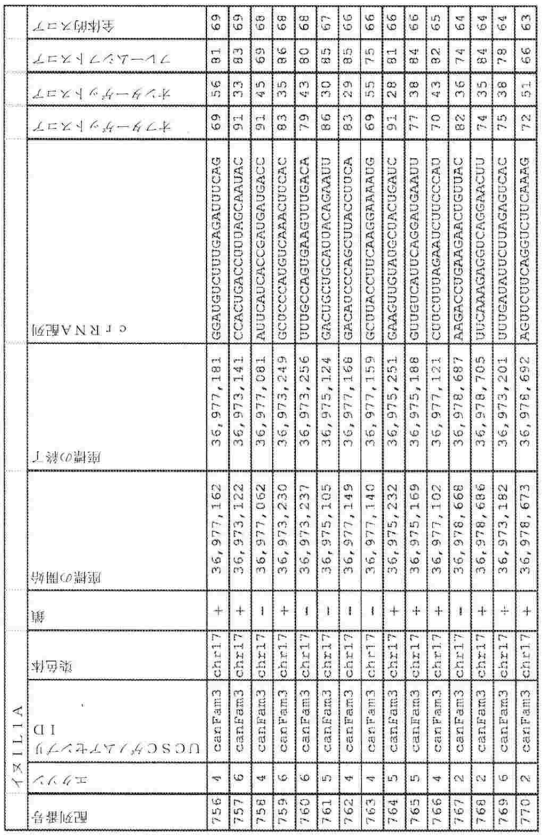
ヒトIL1B										
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	gRNA配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	全体的スコア
726	4	hg38	chr2	+	112,833,402	112,833,421	GCUCAGGUCAUGUCUCCUGGA	60	59	83
727	5	hg38	chr2	+	112,832,668	112,832,687	GCUCCAUACUCGUCCCUGG	65	65	70
728	4	hg38	chr2	−	112,833,500	112,833,519	CUCCGAGCCACCACUACAGCA	74	47	77
729	4	hg38	chr2	−	112,833,488	112,833,507	CUACAGCAAGGCUUCAGGC	63	47	89
730	5	hg38	chr2	−	112,832,807	112,832,826	AACCUAUCUCUUCUGACACA	77	35	85
731	5	hg38	chr2	−	112,832,749	112,832,768	AUCACUGAACUGCACGCUCC	76	43	79
732	4	hg38	chr2	+	112,833,549	112,833,568	GCAGAGGUCCAGGUCCUGGA	51	61	83
733	5	hg38	chr2	+	112,832,802	112,832,821	UCCCAUGUGUCUAAGAAGAU	75	45	74
734	5	hg38	chr2	−	112,832,710	112,832,737	CAAAAAAGCUUGGUGAUGUC	69	53	93
735	2	hg38	chr2	+	112,836,195	112,836,214	AUCAUUUCACUGGCGAGCUC	79	35	79
736	2	hg38	chr2	+	112,836,185	112,836,204	GUAAUAAGCCAUCAUUUCAC	73	36	83
737	4	hg38	chr2	+	112,833,444	112,833,463	CAUCUUCCUCAGCUUGUCCA	63	49	81
738	5	hg38	chr2	+	112,832,728	112,832,747	AGCUUGUUGGCUGUGAGUCC	69	39	93
739	6	hg38	chr2	+	112,831,350	112,831,369	UCCUUGAGGCCCAAGGCCAC	59	54	79
740	6	hg38	chr2	−	112,831,294	112,831,313	UAAGCCCACUCUACAGCUGG	62	60	69

【図４１Ａ】



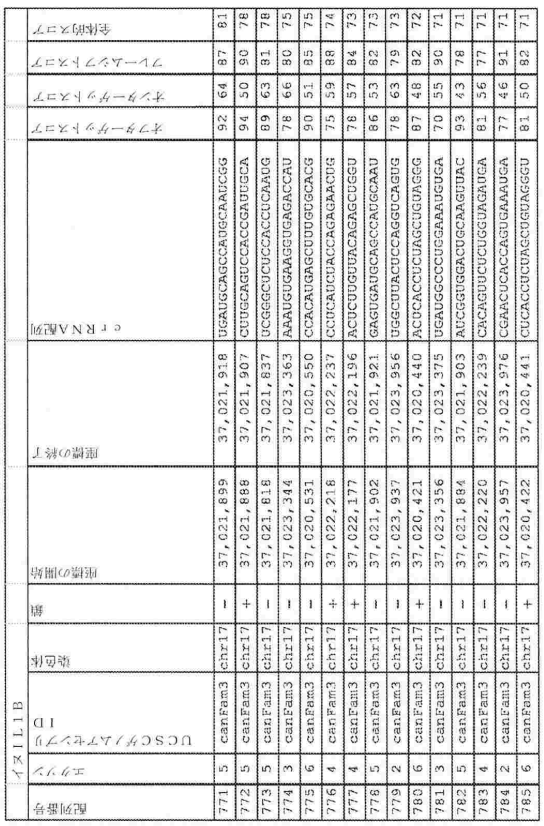
イメイ1L1A										
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	cfRNA配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	全体的スコア
741	5	canFam3	chr17	+	36,975,147	36,975,166	GUCGAACUAUACUUUGAUUG	94	49	78
742	6	canFam3	chr17	−	36,973,236	36,973,255	UUGCCAGUGAAGUUUGACAU	80	64	77
743	5	canFam3	chr17	−	36,975,140	36,975,159	AGUAUAGUUCCACAAACAGG	94	60	76
744	4	canFam3	chr17	−	36,977,120	36,977,139	UGGUAGUGGUGGCAGCCAAU	83	55	75
745	4	canFam3	chr17	+	36,977,194	36,977,213	ACAUGCAGUCCUCAUGAAGU	85	54	74
746	5	canFam3	chr17	+	36,975,233	36,975,252	AAGUUCUAUGCUACUGAUCU	84	49	73
747	4	canFam3	chr17	−	36,977,206	36,977,225	GAGCUGUGACCACCUCUAUG	87	55	73
748	5	canFam3	chr17	−	36,975,143	36,975,162	CAAAGUAUAGUUCGACAAAC	94	37	85
749	4	canFam3	chr17	−	36,977,121	36,977,140	GUGGUAGUGGUGGCAGCCAA	68	61	72
750	2	canFam3	chr17	−	36,978,664	36,978,683	CCUGAAGAACUGUUACAGGU	78	56	71
751	4	canFam3	chr17	+	36,977,216	36,977,235	GUCACAGCUCAUACUAGAA	82	42	70
752	5	canFam3	chr17	+	36,975,108	36,975,127	UCUGUAAUGCAGCAGUCAUG	69	50	67
753	4	canFam3	chr17	+	36,977,141	36,977,160	AUUUUCCUUGAAGGUAAGCU	79	44	69
754	4	canFam3	chr17	+	36,977,193	36,977,212	GACAUGCAGUCCUCAUGAAG	82	49	75
755	4	canFam3	chr17	+	36,977,051	36,977,070	AAUGGUCUCCAGGUCAUCAU	82	54	70

【図４１Ｂ】



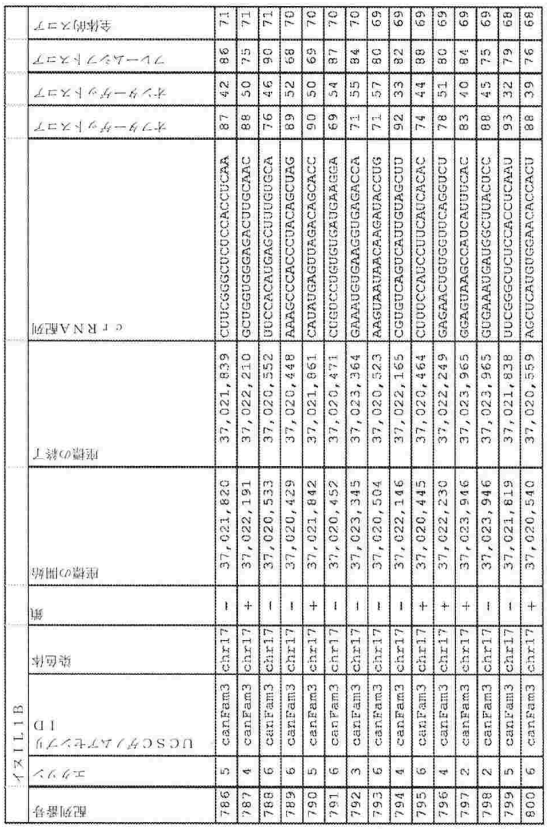
イメイ1L1A										
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	cfRNA配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	全体的スコア
756	4	canFam3	chr17	+	36,977,162	36,977,181	GGAUGUCUUUGAGAUUUCAG	69	56	69
757	6	canFam3	chr17	+	36,973,122	36,973,141	CCACUGACCUUUAGCAAUAC	91	33	69
758	4	canFam3	chr17	−	36,977,062	36,977,081	AUUCAUCACCGAUGAUGACC	91	45	69
759	6	canFam3	chr17	+	36,973,249	36,973,230	GCUCCCAUGUCAAACUUCAC	83	35	66
760	6	canFam3	chr17	−	36,973,237	36,973,256	UUUGCCAGUGAAGUUUGACA	79	43	68
761	5	canFam3	chr17	−	36,975,105	36,975,124	GACUGCUGCAUUACAGAAUU	86	30	67
762	4	canFam3	chr17	−	36,977,149	36,977,168	GACAUCCCAGCUUACCUUCA	83	29	66
763	4	canFam3	chr17	−	36,977,140	36,977,159	GCUUACCUUCAAGGAAAAUG	69	55	66
764	5	canFam3	chr17	+	36,975,232	36,975,251	GAAGUUGUAUGCCUACUGAUC	91	28	66
765	5	canFam3	chr17	+	36,975,169	36,975,188	GUUGUCAUUCAGGAUGAAUU	77	38	66
766	4	canFam3	chr17	+	36,977,102	36,977,121	CUUCUUUAGAAUCUUCCCAU	70	43	65
767	2	canFam3	chr17	−	36,978,668	36,978,687	AAGACCUGAGAGACUGGUUAC	82	36	64
768	2	canFam3	chr17	+	36,978,686	36,978,705	UUCAAAGAGGUCAGGAACUU	74	35	64
769	6	canFam3	chr17	+	36,973,192	36,973,201	UUUGAUAUUCUUAGAGUCAC	75	38	64
770	2	canFam3	chr17	+	36,978,673	36,976,692	AGUUCUUCAGGUCUUCAAAG	72	51	66

【図４２Ａ】



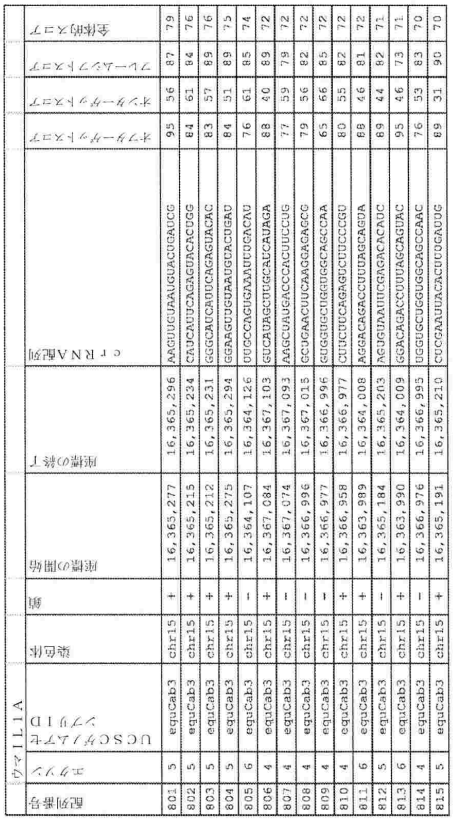
イメイ1L1B										
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	cfRNA配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	全体的スコア
771	5	canFam3	chr17	−	37,021,899	37,021,918	UGAUGCAGCCAUGCAAUCGG	92	64	81
772	5	canFam3	chr17	+	37,021,888	37,021,907	CUUGCAGUCCACCGAUUGCA	94	50	78
773	5	canFam3	chr17	−	37,021,818	37,021,837	UCGGGCUCUCCACCUCAAUG	89	63	81
774	3	canFam3	chr17	−	37,023,344	37,023,363	AAAUGUGAAGGUGAGACCAU	78	66	80
775	6	canFam3	chr17	−	37,020,531	37,020,550	CCACAUGAGCUUUGUGGCACG	90	51	75
776	4	canFam3	chr17	+	37,022,218	37,022,237	CCUCAUCUACCAGAGAACUG	75	59	74
777	4	canFam3	chr17	+	37,022,177	37,022,196	ACUCUUGUUACAGAGCUCGU	78	57	73
778	5	canFam3	chr17	−	37,021,902	37,021,921	GAGUGAUGCAGCCAGCAAU	86	53	73
779	2	canFam3	chr17	−	37,023,937	37,023,956	UGGCUUACUCCAGGUCAGUG	78	63	73
780	6	canFam3	chr17	+	37,020,421	37,020,440	ACUCACCUCUAGCUGUAGGG	87	48	72
781	3	canFam3	chr17	−	37,023,356	37,023,375	UGAUGGCCCUGGAAAUGUGA	70	55	71
782	5	canFam3	chr17	−	37,021,884	37,021,903	AUCGGUGACUGCAAGUUAC	93	43	71
783	4	canFam3	chr17	−	37,022,220	37,022,239	CACAGUUCUCUGGUAGAUGA	81	56	71
784	2	canFam3	chr17	−	37,023,957	37,023,976	CGAACUCACCAGUGAAAUGA	77	46	71
785	6	canFam3	chr17	+	37,020,422	37,020,441	CUCACCUCUAGCUGUAGGGU	81	50	71

【図４２Ｂ】



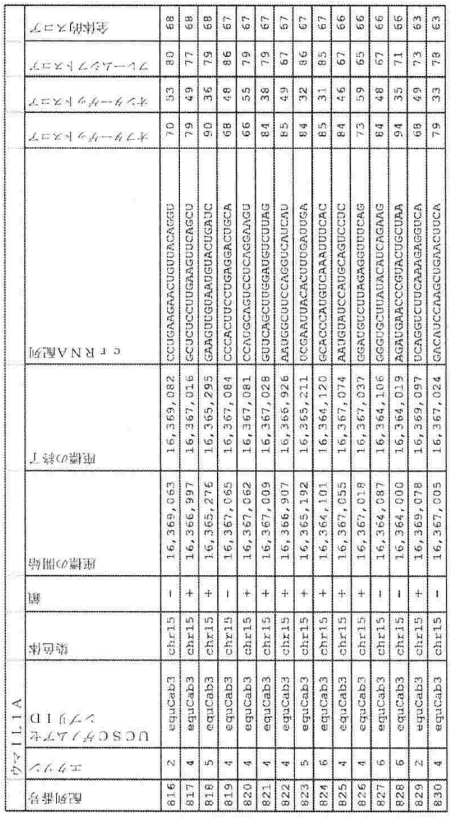
イメイ1L1B										
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	cfRNA配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	全体的スコア
786	5	canFam3	chr17	−	37,021,820	37,021,839	CUUCGGGGCUCUCCACCUCAA	87	42	71
787	4	canFam3	chr17	+	37,022,191	37,022,210	GCUGGUGGGAGACUGUGCAAC	88	50	71
788	6	canFam3	chr17	−	37,020,533	37,020,552	UUCCACAUGAGCUUUGUGCA	76	46	70
789	6	canFam3	chr17	−	37,020,429	37,020,448	AAACCCCACCCCRACAGCUAG	89	52	70
790	5	canFam3	chr17	+	37,021,842	37,021,861	CAUAUGAGGUUAGACAGCACC	90	50	70
791	6	canFam3	chr17	−	37,020,452	37,020,471	CUGUCCUGUUGCAUGAAGGA	69	54	70
792	3	canFam3	chr17	−	37,023,345	37,023,364	GAAAUGUGAAGGUGAGACCA	71	55	70
793	6	canFam3	chr17	−	37,020,504	37,020,523	AAGUAAUUACACAGAUACCUG	71	57	69
794	4	canFam3	chr17	−	37,022,146	37,022,165	CGUGUCAGUCAUUGUAGCUU	92	33	69
795	6	canFam3	chr17	+	37,020,445	37,020,464	CUUUCCAUCCUUCAUCACAC	74	44	69
796	4	canFam3	chr17	+	37,022,230	37,022,249	GAGAACUUGUGGUUCAGGUCU	78	51	69
797	2	canFam3	chr17	+	37,023,946	37,023,965	GGAGUAAGCCAUCAUUUCAC	83	40	69
798	2	canFam3	chr17	−	37,023,946	37,023,965	GUGAAAUGAUGGCUUACUCC	88	45	68
799	5	canFam3	chr17	−	37,021,819	37,021,838	UUCCGGGCUCUCCACCUCAAU	93	32	68
800	6	canFam3	chr17	+	37,020,540	37,020,559	AGCUCAUGUGGAACACCACU	88	39	68

【図４３Ａ】



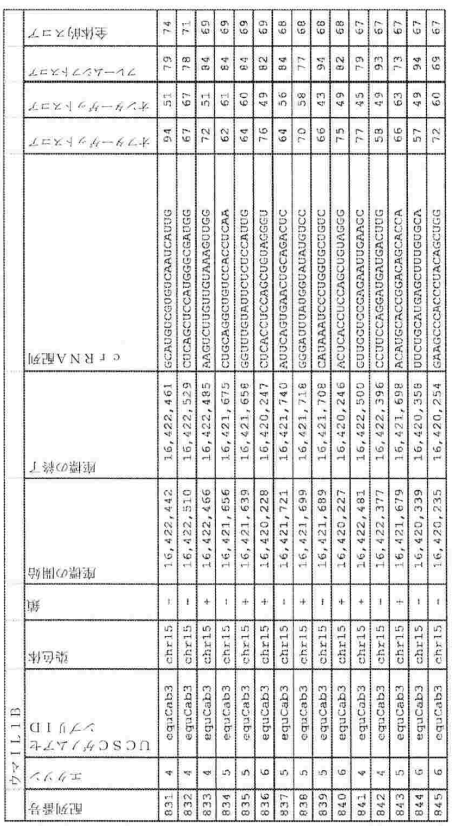
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	cDNA配列	ネコゲノムスコア	ネコゲノムスコア	フィルタスコア	全体的スコア
831	4	equCab3	chr15	-	16,422,442	16,422,461	GCAUGUCGUGUCAAUCAUUG	94	51	79	74
832	4	equCab3	chr15	-	16,422,510	16,422,529	CUCAGCUCCAUGGGCGAUGG	67	67	78	71
833	4	equCab3	chr15	+	16,422,466	16,422,485	AAGUCUUGUUGUAAAGUGGG	72	51	84	69
834	5	equCab3	chr15	-	16,421,656	16,421,675	CUGCAGGCUGUCCACCUCAA	62	61	84	69
835	5	equCab3	chr15	+	16,421,639	16,421,658	GGUUUGUAGUCCUCCAUUG	64	60	84	69
836	6	equCab3	chr15	+	16,420,228	16,420,247	CUCACCUCCAGCUGUAGGGU	76	49	82	69
837	5	equCab3	chr15	-	16,421,721	16,421,740	AUUCAGUUGAACUGCAGACUC	64	56	84	68
838	5	equCab3	chr15	+	16,421,699	16,421,718	GGGAUUUAGGGUAUGUCC	70	58	77	68
839	3	equCab3	chr15	-	16,421,689	16,421,708	CAUAAAUCCCUGGUUGCUGC	66	43	94	68
840	6	equCab3	chr15	+	16,420,227	16,420,246	ACUCACUCUCAGCUGUAGGG	75	49	82	68
841	4	equCab3	chr15	+	16,422,481	16,422,500	CUUGGUCGCAGAAUUGAAGC	77	45	79	67
842	4	equCab3	chr15	-	16,422,377	16,422,396	CCUCCCAGGAUGAUGACUUG	58	49	93	67
843	5	equCab3	chr15	+	16,421,679	16,421,698	ACAUGCACCGGAACAGCACCA	66	63	73	67
844	6	equCab3	chr15	-	16,420,339	16,420,358	UUCUGCAUGAGCUUUGUGCA	57	49	94	67
845	6	equCab3	chr15	-	16,420,235	16,420,254	GAACCCCACCCUACAGCUGG	72	60	69	67

【図４３Ｂ】



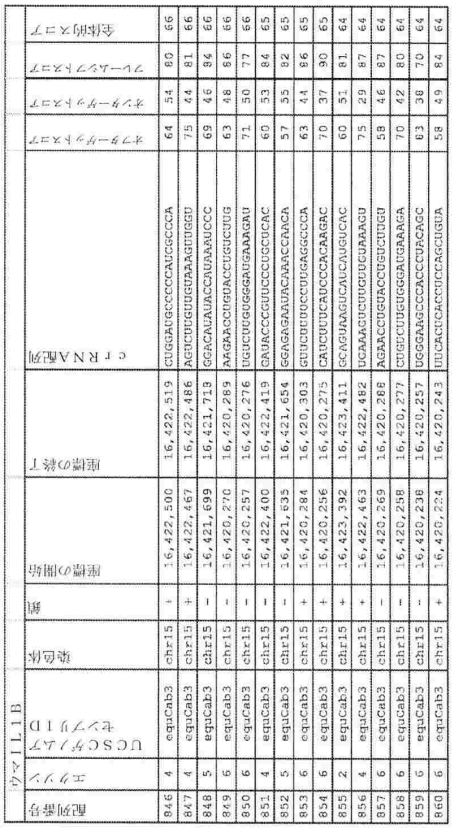
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	cDNA配列	ネコゲノムスコア	ネコゲノムスコア	フィルタスコア	全体的スコア
816	2	equCab3	chr15	-	16,369,063	16,369,082	CCUGAGGAACUGUUUACAGGU	70	33	80	68
817	4	equCab3	chr15	+	16,366,997	16,367,016	GCUCUCCUUGAAGGUCAGCU	79	49	77	68
818	5	equCab3	chr15	+	16,365,276	16,365,295	GAAGUUGUAAUGUACUGAUC	90	36	79	68
819	4	equCab3	chr15	-	16,367,065	16,367,084	CCCACUUCCUGAGGACUGCA	68	48	86	67
820	4	equCab3	chr15	+	16,367,062	16,367,081	CCAUGCAGUCCUCAGGAAGU	66	55	79	67
821	4	equCab3	chr15	+	16,367,009	16,367,028	GUUCAGCUUUGAUGCUUAG	84	38	79	67
822	4	equCab3	chr15	+	16,366,907	16,366,926	AAUGGCUUCCAGGUCAUCAU	85	49	67	67
823	5	equCab3	chr15	+	16,365,192	16,365,211	UCGAAUUACACUUGAUUGA	84	32	86	67
824	6	equCab3	chr15	+	16,364,101	16,364,120	GCACCCAUGUCCAAUUUCAC	65	31	85	67
825	4	equCab3	chr15	+	16,367,055	16,367,074	AAUGGUAUCCAGUCCAGUCCUC	84	46	67	66
826	4	equCab3	chr15	+	16,367,018	16,367,037	GGAGUCCUUAGAGGUUUCAG	73	59	65	66
827	6	equCab3	chr15	-	16,364,087	16,364,106	GGGUGCUUAUACAUCAGAAG	84	48	67	66
828	6	equCab3	chr15	-	16,364,000	16,364,019	AGAUGAACCCGUACUGCUAA	94	35	71	66
829	2	equCab3	chr15	+	16,369,078	16,369,097	UCAGGUCUUUCAAAGAGGUCA	68	49	73	63
830	4	equCab3	chr15	-	16,367,005	16,367,024	GACAUCCAAGCUGAACUUCA	79	33	78	63

【図４４Ａ】



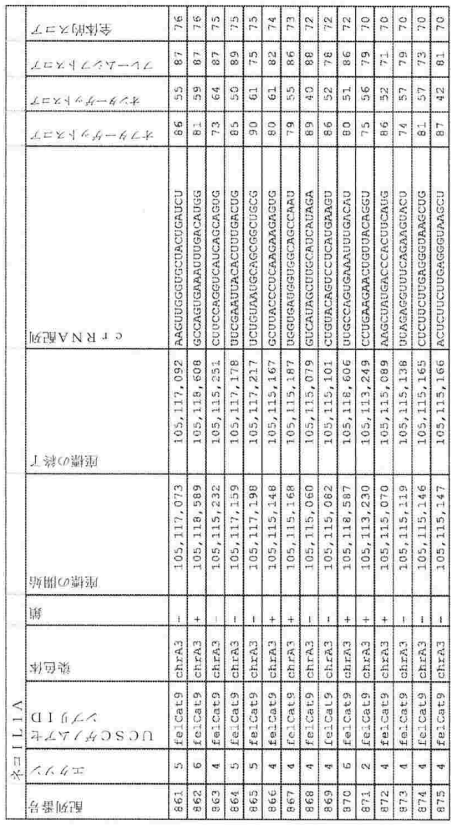
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	cDNA配列	ネコゲノムスコア	ネコゲノムスコア	フィルタスコア	全体的スコア
846	4	equCab3	chr15	+	16,422,500	16,422,519	CUGGAUGCCCCCAUCGCCCA	64	54	60	66
847	4	equCab3	chr15	+	16,422,467	16,422,486	AGUCUUGUUGUAAAGUUGGU	75	44	81	66
848	5	equCab3	chr15	-	16,421,699	16,421,718	GGACAUAUACCAUAAAUCCC	69	46	84	66
849	6	equCab3	chr15	-	16,420,270	16,420,289	AAGAACCUGUACCUGUCUUG	63	48	86	66
850	6	equCab3	chr15	-	16,420,257	16,420,276	UGUCUUGGGGAUGAAAGAU	71	50	77	66
851	4	equCab3	chr15	-	16,422,400	16,422,419	CAUACCCGUUCCCCUCCAC	60	53	84	65
852	5	equCab3	chr15	-	16,421,635	16,421,654	GGAGAGAUAUACAACCAACA	57	55	82	65
853	6	equCab3	chr15	+	16,420,284	16,420,303	GUUCUUUGCCCUUGAGGCCCA	63	44	86	65
854	6	equCab3	chr15	+	16,420,256	16,420,275	CAUCUUCAUCCCACAAGAC	70	37	90	65
855	2	equCab3	chr15	+	16,423,392	16,423,411	GCAGUAAGUCAUCAUGUCAC	60	51	81	64
856	4	equCab3	chr15	+	16,422,463	16,422,482	UGAAAGCUCUUGUUGUAAAGU	75	29	87	64
857	6	equCab3	chr15	-	16,420,269	16,420,288	AGAACCUGUACCUGUCUUGU	58	46	87	64
858	6	equCab3	chr15	-	16,420,258	16,420,277	CUGUCUUGUGGGAUGAAAGA	70	42	80	64
859	6	equCab3	chr15	-	16,420,236	16,420,257	UGGGAAGCCCCACCCUACAGC	63	38	70	64
860	6	equCab3	chr15	+	16,420,224	16,420,243	UUCCACCCACCUCCAGCUGUA	58	49	84	64

【図４４Ｂ】



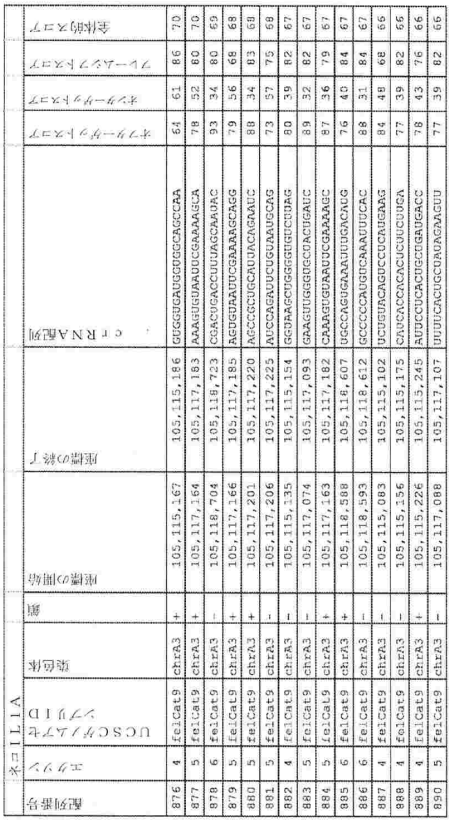
配列番号	エクソン	UCSCゲノムアセンブリID	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	cDNA配列	ネコゲノムスコア	ネコゲノムスコア	フィルタスコア	全体的スコア
846	4	equCab3	chr15	+	16,422,500	16,422,519	CUGGAUGCCCCCAUCGCCCA	64	54	60	66
847	4	equCab3	chr15	+	16,422,467	16,422,486	AGUCUUGUUGUAAAGUUGGU	75	44	81	66
848	5	equCab3	chr15	-	16,421,699	16,421,718	GGACAUAUACCAUAAAUCCC	69	46	84	66
849	6	equCab3	chr15	-	16,420,270	16,420,289	AAGAACCUGUACCUGUCUUG	63	48	86	66
850	6	equCab3	chr15	-	16,420,257	16,420,276	UGUCUUGGGGAUGAAAGAU	71	50	77	66
851	4	equCab3	chr15	-	16,422,400	16,422,419	CAUACCCGUUCCCCUCCAC	60	53	84	65
852	5	equCab3	chr15	-	16,421,635	16,421,654	GGAGAGAUAUACAACCAACA	57	55	82	65
853	6	equCab3	chr15	+	16,420,284	16,420,303	GUUCUUUGCCCUUGAGGCCCA	63	44	86	65
854	6	equCab3	chr15	+	16,420,256	16,420,275	CAUCUUCAUCCCACAAGAC	70	37	90	65
855	2	equCab3	chr15	+	16,423,392	16,423,411	GCAGUAAGUCAUCAUGUCAC	60	51	81	64
856	4	equCab3	chr15	+	16,422,463	16,422,482	UGAAAGCUCUUGUUGUAAAGU	75	29	87	64
857	6	equCab3	chr15	-	16,420,269	16,420,288	AGAACCUGUACCUGUCUUGU	58	46	87	64
858	6	equCab3	chr15	-	16,420,258	16,420,277	CUGUCUUGUGGGAUGAAAGA	70	42	80	64
859	6	equCab3	chr15	-	16,420,236	16,420,257	UGGGAAGCCCCACCCUACAGC	63	38	70	64
860	6	equCab3	chr15	+	16,420,224	16,420,243	UUCCACCCACCUCCAGCUGUA	58	49	84	64

【図４５Ａ】



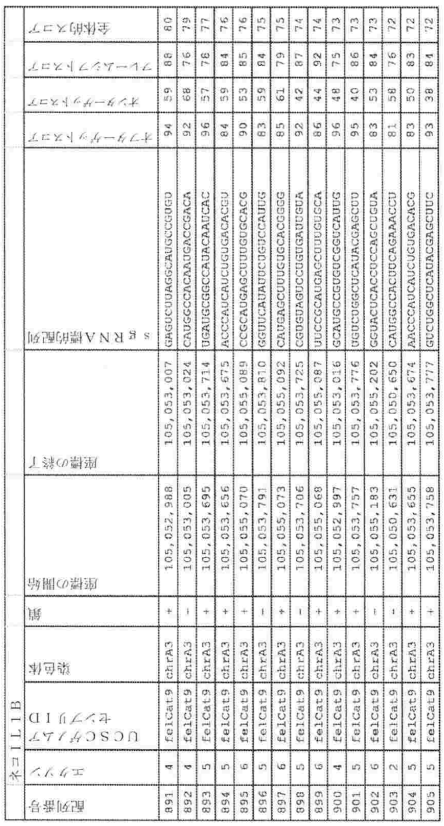
表ＩＬＩＡ											
配列番号	エクソン	ＵＣＳＣゲノムアセンブリＩＤ	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	ｃｒＲＮＡ配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	アレルスプライスコア	全体的スコア
861	5	felCat9	chrA3	−	105,117,073	105,117,092	AAGUUGGGUUGCUACUGAUCU	86	55	87	76
862	6	felCat9	chrA3	+	105,118,589	105,118,608	GCCAGUUGAAAUUUGACAUGG	81	59	87	76
863	4	felCat9	chrA3	−	105,115,232	105,115,251	CUUCCAGGUCAUCAGCAGUG	73	64	87	75
864	5	felCat9	chrA3	−	105,117,159	105,117,178	UUCGAAUUACACUUUGACUG	85	50	89	75
865	5	felCat9	chrA3	−	105,117,198	105,117,217	UCUGUAAUGCAGCGGCUGCG	90	61	75	75
866	4	felCat9	chrA3	+	105,115,148	105,115,167	GCUUACCCUCAAGAAGAGUG	80	61	82	74
867	4	felCat9	chrA3	+	105,115,168	105,115,187	UGGUGAUGGUGGCAGCCAAU	79	55	86	73
868	4	felCat9	chrA3	−	105,115,060	105,115,079	GUCAUAGGUUGCAUCAUAGA	89	40	88	72
869	4	felCat9	chrA3	−	105,115,082	105,115,101	CUGUACAGUCCUCAUGAAGU	86	52	78	72
870	6	felCat9	chrA3	+	105,118,597	105,118,606	UUGCCAGUGAAAUUUGACAU	80	51	86	72
871	2	felCat9	chrA3	+	105,113,230	105,113,249	CCUGAAGAACUCGUUACAGGU	75	56	79	70
872	4	felCat9	chrA3	+	105,115,070	105,115,089	AAGCUAUGACCCACUUGAUG	86	52	71	70
873	4	felCat9	chrA3	−	105,115,119	105,115,138	UUAGAGGUUUCAGAGUACCU	74	57	79	70
874	4	felCat9	chrA3	−	105,115,146	105,115,165	CUCCUUCUUGAGGGUAAGCU	81	57	73	70
875	4	felCat9	chrA3	−	105,115,147	105,115,166	ACUCUUCUUGAGGGUAAGCU	87	42	81	70

【図４５Ｂ】



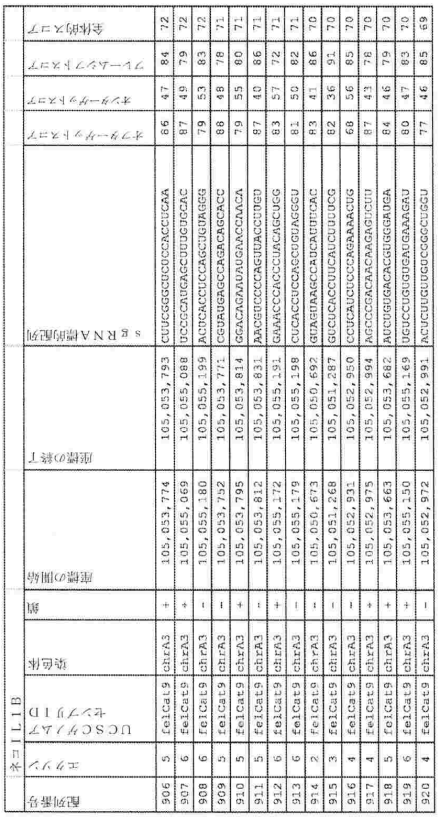
表ＩＬＩＡ											
配列番号	エクソン	ＵＣＳＣゲノムアセンブリＩＤ	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	ｃｒＲＮＡ配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	アレルスプライスコア	全体的スコア
876	4	felCat9	chrA3	+	105,115,167	105,115,186	GUGGUGAUGGUGGCAGCCAA	64	61	86	70
877	5	felCat9	chrA3	+	105,117,164	105,117,183	AAAGUUGUAAUUCGAAAGUA	78	52	80	70
878	6	felCat9	chrA3	−	105,118,704	105,118,723	CGACUGACCCUUUAGCAAUAC	93	34	80	69
879	5	felCat9	chrA3	+	105,117,166	105,117,185	AGUGGUAUUCGAAAAGCAGG	79	56	68	68
880	5	felCat9	chrA3	+	105,117,201	105,117,220	ACCCCGUGCAUUACAGAAUC	88	34	83	68
881	5	felCat9	chrA3	−	105,117,206	105,117,225	AUCCAGAUCUCUGUAAUGCAG	73	57	75	68
882	4	felCat9	chrA3	−	105,115,135	105,115,154	GGUAAGCUGGGGUGCUAUGAG	80	39	82	67
883	5	felCat9	chrA3	−	105,117,074	105,117,093	GAAGUUGGGGUGCUACUGAUC	89	32	82	67
884	5	felCat9	chrA3	+	105,117,163	105,117,182	CAAAGUGUAAUUCGAAAAGC	87	36	79	67
885	6	felCat9	chrA3	+	105,118,588	105,118,607	UGCCAGUGAAAUUUGACAUG	76	40	84	67
886	6	felCat9	chrA3	−	105,118,693	105,118,612	GCCCCCAUGUUCAAAUUUCAC	88	31	84	67
887	4	felCat9	chrA3	−	105,115,083	105,115,102	UCUGUUACAGUCCUCAUGAAG	84	48	68	66
888	4	felCat9	chrA3	−	105,115,156	105,115,175	CAUCACCACUACUGCUUGA	77	39	82	66
889	4	felCat9	chrA3	+	105,115,226	105,115,245	AUGCCUCACUGCUGAUGAGUC	78	43	76	66
890	5	felCat9	chrA3	−	105,117,088	105,117,107	UUUUCACUGCUAUAGAAGUU	77	39	82	66

【図４６Ａ】



表ＩＬＩＢ											
配列番号	エクソン	ＵＣＳＣゲノムアセンブリＩＤ	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	ｓｇＲＮＡ標的配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	アレルスプライスコア	全体的スコア
891	4	felCat9	chrA3	+	105,052,988	105,053,007	GAGUCUUAGGCAUGCCGUGU	94	59	88	80
892	4	felCat9	chrA3	−	105,053,005	105,053,024	CAUGGCCACAAUGACCGACA	92	68	76	79
893	5	felCat9	chrA3	+	105,053,695	105,053,714	UGAUGCGGCCAUACAAUCAC	96	57	76	77
894	5	felCat9	chrA3	+	105,053,656	105,053,675	ACCCAUCAUCUGUGACACUU	84	59	84	76
895	6	felCat9	chrA3	+	105,055,070	105,055,089	CCGCAUGAGUUUGUGCACG	90	53	85	76
896	5	felCat9	chrA3	−	105,053,791	105,053,810	GGUUCAUAUUCUGGCCAUUG	83	59	84	75
897	6	felCat9	chrA3	+	105,055,073	105,055,092	CAUGACGUUUGUGCACGGGG	85	61	79	75
898	5	felCat9	chrA3	−	105,053,706	105,053,725	CGGUGAGUCCUGUGAUGUGA	92	42	87	74
899	6	felCat9	chrA3	+	105,055,068	105,055,087	UUCCGCAUGACCUUUGUGCA	86	44	92	74
900	4	felCat9	chrA3	+	105,052,997	105,053,016	GCAUGCCGUGUCGGUCAUUG	96	48	75	73
901	5	felCat9	chrA3	+	105,053,757	105,053,776	UGUCUGGCUCAUACGAGCUU	95	40	86	73
902	6	felCat9	chrA3	−	105,055,183	105,055,202	GCUACUCACCUCCACGCUGA	83	53	84	73
903	2	felCat9	chrA3	−	105,050,631	105,050,650	CAUUGGCCACUUCAGAAACCU	81	58	76	72
904	5	felCat9	chrA3	+	105,053,655	105,053,674	AACCCAUCAUCUGUGACACG	83	50	83	72
905	5	felCat9	chrA3	+	105,053,758	105,053,777	GUCUGGCUCAUACGAGCUUC	93	38	84	72

【図４６Ｂ】



表ＩＬＩＢ											
配列番号	エクソン	ＵＣＳＣゲノムアセンブリＩＤ	染色体	鎖	座標の開始	座標の終了	ｓｇＲＮＡ標的配列	オフターゲットスコア	オンターゲットスコア	アレルスプライスコア	全体的スコア
906	5	felCat9	chrA3	+	105,053,774	105,053,793	CUUCGGGGUUCUCCACCUCAA	66	47	84	72
907	6	felCat9	chrA3	+	105,055,069	105,055,088	UCCGCAUGAGCUUUGUGCAC	87	49	79	72
908	6	felCat9	chrA3	−	105,055,199	105,055,180	AUUCACCUCCACGCUGAGGG	79	53	83	72
909	5	felCat9	chrA3	−	105,053,702	105,053,721	CGGAUGAGCCAGACAGCACC	88	48	78	71
910	5	felCat9	chrA3	+	105,053,795	105,053,814	GGACAGAAUAUGACCAACA	79	55	80	71
911	5	felCat9	chrA3	−	105,053,812	105,053,831	AACGUUCCCCAGUUACCUUGU	87	40	86	71
912	6	felCat9	chrA3	+	105,055,172	105,055,191	GAAACCCACCCUACAGCUCG	83	57	72	71
913	6	felCat9	chrA3	−	105,055,179	105,055,198	CUCACCUCCAGCUGUAGGGU	81	50	82	71
914	2	felCat9	chrA3	−	105,050,673	105,050,692	GUAGUAAGCCCAUCAUUUCAC	83	41	86	70
915	3	felCat9	chrA3	−	105,051,268	105,051,287	GUCUCACCCUUCAUCUUUCG	82	36	91	70
916	4	felCat9	chrA3	−	105,052,931	105,052,950	CCUCAUCCCCAGAAAACUG	68	56	85	70
917	4	felCat9	chrA3	+	105,052,975	105,052,994	AGCCCCACACAAGAGUCUUU	87	43	78	70
918	5	felCat9	chrA3	+	105,053,663	105,053,682	AUCUGUGACACGUGGGAUGA	84	46	79	70
919	6	felCat9	chrA3	+	105,055,150	105,055,169	UGUCCUGUGUGAUGAAAGAU	80	47	83	70
920	4	felCat9	chrA3	−	105,052,972	105,052,991	ACUCUUGUUGUCCGGCCUGCU	77	46	85	69

【配列表】
20245298990000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/37490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. A61K 48/00; C12N 15/11; C12N 9/22; C12N 15/113 (2022.01)
ADD. A61K 35/76; C12N 15/86 (2022.01)

CPC - INV. A61K 48/005; C12N 15/11; C12N 9/22; C12N 15/1136
ADD. A61K 35/76; C12N 15/111; C12N 15/86; C12N 2310/20; C12N 2740/15043

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2020/0360454 A1 (ORTHOBIO THERAPEUTICS, INC.) 19 November 2020; Abstract, Paragraph [0012], [0017], [0048], [0051], [0091], [0092], [0134], [0135]	1-3, 26/1-3, 27/26/1-3, 28/26/1-3 — 4, 26/4, 27/26/4, 28/26/4
Y	US 2005/0282198 A1 (DUFF GORDON W) 22 December 2005; Paragraph [0110]	4, 26/4, 27/26/4, 28/26/4
A	WO 2017/083722 A1 (GREENBERG KENNETH P) 18 May 2017	1-4, 26-28

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 October 2022 (28.10.2022)	JAN 10 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/37490

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☐ forming part of the international application as filed.
   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/37490

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 29-74
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-28, and human IL-1a (gene target), exon 4 (exon of gene target), SEQ ID NO: 168 (crRNA sequence)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/37490

-***-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-28, and human IL-1a (gene target), exon 4 (exon of gene target), SEQ ID NO: 168 (crRNA sequence), are directed towards compositions for treatment or prevention of a joint disease or condition.

The compositions of Claims 1(in-part), 2, 3-4 (each in-part), 26-28 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass human IL-1a (exemplary gene target), exon 4 (exemplary exon of gene target), SEQ ID NO: 168 (exemplary crRNA sequence).

This first named invention of Group I+ has been selected with the context provided by dependent claims 2 and 4 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional gene target(s), exons of gene target(s), and crRNA sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO:, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional gene target(s), exons of gene target(s), and crRNA sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected gene target(s), exons of gene target(s), and crRNA sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be human IL-1B (gene target), exon 4 (exon of gene target), SEQ ID NO: 188 (crRNA sequence).

Groups I+ share the technical features including: a composition for the treatment or prevention of a joint disease or condition, comprising: i) an RNA-guided nuclease or a nucleic acid encoding an RNA-guided nuclease; and ii) at least one guide RNA or a nucleic acid encoding at least one guide RNA targeting an IL-1a or IL-1B gene, wherein the guide RNA specifically binds a target sequence that is adjacent to a protospacer adjacent motif "PAM" sequence for the Cas9 protein; these shared technical features are previously disclosed by WO 2020/150633 A1 to ORTHOBIO THERAPEUTICS, INC. (hereinafter 'ORTHOBIO').

ORTHOBIO discloses a composition for the treatment or prevention of a joint disease or condition (a composition for treating joint disorders; paragraph [0006]), comprising: i) an RNA-guided nuclease or a nucleic acid encoding an RNA-guided nuclease (comprising a CRISPR-Cas9 method, which is guided by RNA; paragraphs [0006], [0012], [0049]); and ii) at least one guide RNA or a nucleic acid encoding at least one guide RNA targeting an IL-1a or IL-1B gene (at least one guide RNA targeting the gene, where the gene is IL-1a or IL-1B; claim 65), wherein the guide RNA specifically binds a target sequence that is adjacent to a protospacer adjacent motif "PAM" sequence for the Cas9 protein (a guide RNA, which specifically binds to a target sequence which is adjacent to a PAM sequence for Cas9; paragraphs [0051], [0091], claim 65)

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the ORTHOBIO reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*29/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	
Ａ６１Ｋ	*35/761(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/761	
Ａ６１Ｋ	*35/763(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/763	
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088	
Ａ６１Ｋ	*9/51 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/51	
Ａ６１Ｋ	*9/127(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/127	
Ａ６１Ｋ	*47/18 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18	
Ａ６１Ｋ	*47/24 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24	
Ａ６１Ｋ	*47/10 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/10	
Ａ６１Ｋ	*47/28 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28	

(32)優先日　令和3年7月16日(2021.7.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/326,571
(32)優先日　令和4年4月1日(2022.4.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

弁理士　松尾 淳一
(74)代理人　100187540
弁理士　國枝 由紀子
(72)発明者　ゲンチュ，ジョージ
英国 シービー４・１ユーエイ ケンブリッジ，レンツ・ウェイ １２
(72)発明者　ミレット，ピーター・ジェイ
アメリカ合衆国コロラド州８１６３２，エドワーズ，ピルグリム・ドライブ ９７５
(72)発明者　ラッセル，イアン・アラスダー
英国 シービー１・９エイチイー ケンブリッジ，ヘディントン・ドライブ １１
(72)発明者　アレン，マシュー・ジェイ
英国 シービー２５・０エイチピー キャムス，スワファム・バルベック，ハイ・ストリート ３３

Ｆターム（参考）　4C076 AA19 AA65 BB11 BB36 CC04 CC09 DD49 DD63 DD70 EE23 FF16
4C084 AA13 MA21 MA24 MA55 MA66 NA05 ZA96 ZB11
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA03 MA04 MA05 MA21 MA24 MA55 MA66 NA05 ZA96 ZB11
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA21 MA24 MA55 MA66 NA05 ZA96 ZB11