(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-548031
(P2022-548031A)
(43)公表日　令和4年11月16日(2022.11.16)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/88 (2006.01)		C12N	15/88	Z	4B065
C12N 15/09 (2006.01)		C12N	15/09	110	4C076
C12N 15/38 (2006.01)		C12N	15/38	ZNA	4C084
C12N 15/55 (2006.01)		C12N	15/55		
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全115頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-516060(P2022-516060)
(86)(22)出願日　令和2年9月11日(2020.9.11)
(85)翻訳文提出日　令和4年4月15日(2022.4.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/050491
(87)国際公開番号　WO2021/050940
(87)国際公開日　令和3年3月18日(2021.3.18)
(31)優先権主張番号　62/900,080
(32)優先日　令和1年9月13日(2019.9.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/042,762
(32)優先日　令和2年6月23日(2020.6.23)
(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
最終頁に続く

(71)出願人　597160510
リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
ＲＥＧＥＮＥＲＯＮ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国１０５９１－６７０７ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード７７７番
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(72)発明者　ハント，　チャーリーン
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１，　タリータウン，　オールド ソー ミ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　脂質ナノ粒子によって送達されるＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳシステムを使用する動物における転写調節

(57)【要約】
同じ脂質ナノ粒子内にＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ相乗的活性化メディエーターシステム構成要素を一緒に含む脂質ナノ粒子、ならびにかかる脂質ナノ粒子を使用して、インビボおよびエクスビボで標的遺伝子の発現を増加させ、インビボおよびエクスビボで標的遺伝子の発現を増加させる能力についてＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ相乗的活性化メディエーターシステムを評価する方法が提供される。

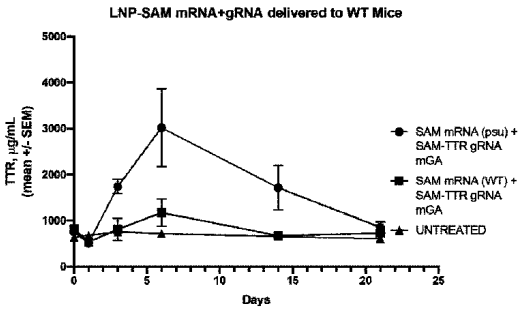


FIG. 9

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
標的遺伝子にカーゴを送達し、動物または細胞における前記標的遺伝子の発現を増加させるための脂質ナノ粒子であって、前記カーゴが、
（ａ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質を含む、キメラ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）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする核酸と、
（ｂ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したアダプタータンパク質を含む、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸と、
（ｃ）各ガイドＲＮＡが、前記キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる１つ以上のアダプター結合要素を含む、１つ以上のガイドＲＮＡまたは前記１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸であって、前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、前記Ｃａｓタンパク質と複合体を形成し、それを前記標的遺伝子内の標的配列に誘導することができ、それにより前記標的遺伝子の発現を増加させる、１つ以上のガイドＲＮＡまたは前記１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸と、を含む、脂質ナノ粒子。
【請求項２】
マルチシストロン性またはバイシストロン性核酸が、（ａ）および（ｂ）を含む、請求項１に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３】
（ａ）および（ｂ）が、前記マルチシストロン性またはバイシストロン性核酸における２Ａタンパク質コード配列によって連結される、請求項２に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項４】
（ａ）および（ｂ）が、別個の核酸である、請求項１に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項５】
（ａ）および（ｂ）が、各々メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の形態である、請求項１に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項６】
前記ｍＲＮＡが、シュードウリジンで完全に置換されるように修飾される、請求項５に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項７】
前記ｍＲＮＡが、（ａ）および（ｂ）を含むマルチシストロン性またはバイシストロン性核酸であり、前記ｍＲＮＡが、配列番号６１に記載の配列を含む、請求項５または６に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項８】
（ｃ）が、ＲＮＡの形態である、請求項１に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項９】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、５’末端および／または３’末端に１つ以上の安定化末端修飾を含むように修飾される、請求項８に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１０】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々の前記５’末端および／または３’末端が、１つ以上のホスホロチオエート結合を含むように修飾される、請求項９に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１１】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々の前記５’末端および／または３’末端が、１つ以上の２’－Ｏ－メチル修飾を含むように修飾される、請求項９または１０に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１２】
前記標的配列が、前記標的遺伝子内の制御性配列を含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１３】

前記制御性配列が、プロモーターまたはエンハンサーを含む、請求項１２に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１４】
前記標的配列が、前記標的遺伝子の転写開始部位の２００塩基対以内にある、請求項１～１３のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１５】
前記標的配列が、前記転写開始部位の２００塩基対上流および前記転写開始部位の１塩基対下流の領域内にある、請求項１４に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１６】
１つまたはガイドＲＮＡの各々が、前記キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる２つのアダプター結合要素を含む、請求項１～１５のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１７】
第１のアダプター結合要素が、前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々の第１のループ内にあり、第２のアダプター結合要素が、前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々の第２のループ内にある、請求項１６に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１８】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）部分と融合されるＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）部分を含む、単一ガイドＲＮＡであり、
前記第１のループが、配列番号１２、１４、５２、または５３の残基１３～１６に対応するテトラループであり、前記第２のループが、配列番号１２、１４、５２、または５３の残基５３～５６に対応するステムループ２である、請求項１７に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項１９】
前記アダプター結合要素が、配列番号１６に記載の配列を含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項２０】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、配列番号４０、４５、５６、または５７に記載の配列を含む、請求項１９に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項２１】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの少なくとも１つが、Ｔｔｒ遺伝子を標的とし、任意に、前記Ｔｔｒ標的化ガイドＲＮＡが、配列番号３４～３６のいずれか１つに記載の配列を含む配列を標的とするか、または任意に、前記Ｔｔｒ標的化ガイドＲＮＡが、配列番号３７～３９および５５のいずれか１つに記載の配列を含む、請求項１～２０のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項２２】
前記１つ以上のガイドＲＮＡが、２つ以上の標的遺伝子を標的とする、請求項１～２１のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項２３】
前記１つ以上のガイドＲＮＡが、単一標的遺伝子を標的とする複数のガイドＲＮＡを含む、請求項１～２２のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項２４】
前記１つ以上のガイドＲＮＡが、単一標的遺伝子を標的とする少なくとも３つのガイドＲＮＡを含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項２５】
前記少なくとも３つのガイドＲＮＡが、マウスＴｔｒ遺伝子座を標的とし、第１のガイドＲＮＡが、配列番号３４を含む配列を標的とするか、または配列番号３７に記載の配列を含み、第２のガイドＲＮＡが、配列番号３５を含む配列を標的とするか、または配列番号３８に記載の配列を含み、第３のガイドＲＮＡが、配列番号３６を含む配列を標的とするか、または配列番号３９もしくは５５に記載の配列を含む、請求項２４に記載の脂質ナ

ノ粒子。
【請求項２６】
前記Ｃａｓタンパク質が、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脂質ナノ粒子。
【請求項２７】
前記Ｃａｓ９タンパク質が、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ　Ｃａｓ９タンパク質、またはＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９タンパク質である、請求項２６に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項２８】
前記Ｃａｓ９タンパク質が、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質と最適に整列された場合に、Ｄ１０ＡおよびＮ８６３ＡまたはＤ１０ＡおよびＨ８４０Ａに対応する変異を含む、請求項２６または２７に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項２９】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする配列が、前記動物または細胞における発現のためにコドン最適化される、請求項１～２８のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３０】
前記キメラＣａｓタンパク質における前記１つ以上の転写活性化因子ドメインが、ＶＰ１６、ＶＰ６４、ｐ６５、ＭｙｏＤ１、ＨＳＦ１、ＲＴＡ、ＳＥＴ７／９、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項１～２９のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３１】
前記キメラＣａｓタンパク質における前記１つ以上の転写活性化因子ドメインが、ＶＰ６４を含む、請求項３０に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３２】
前記キメラＣａｓタンパク質が、Ｎ末端からＣ末端まで、触媒的に不活性なＣａｓタンパク質、核局在化シグナル、およびＶＰ６４転写活性化因子ドメインを含む、請求項３１に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３３】
前記キメラＣａｓタンパク質が、配列番号１に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む、請求項３２に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３４】
前記キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸が、配列番号２５に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む、請求項３３に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３５】
前記アダプタータンパク質が、前記キメラアダプタータンパク質のＮ末端にあり、前記１つ以上の転写活性化ドメインが、前記キメラアダプタータンパク質のＣ末端にある、請求項１～３４のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３６】
前記アダプタータンパク質が、ＭＳ２コートタンパク質またはその機能的断片もしくはバリアントを含む、請求項１～３５のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３７】
前記キメラアダプタータンパク質における前記１つ以上の転写活性化ドメインが、ＶＰ１６、ＶＰ６４、ｐ６５、ＭｙｏＤ１、ＨＳＦ１、ＲＴＡ、ＳＥＴ７／９、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項１～３６のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３８】
前記キメラＣａｓタンパク質における前記１つ以上の転写活性化ドメインが、ｐ６５およびＨＳＦ１を含む、請求項３７に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項３９】

前記キメラアダプタータンパク質が、Ｎ末端からＣ末端まで、ＭＳ２コートタンパク質、核局在化シグナル、ｐ６５転写活性化ドメイン、およびＨＳＦ１転写活性化ドメインを含む、請求項３８に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項４０】

前記キメラアダプタータンパク質が、配列番号６に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む、請求項３９に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項４１】

前記キメラアダプタータンパク質をコードする核酸が、配列番号２７に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む、請求項４０に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項４２】

前記動物が、非ヒト動物である、請求項１～４１のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項４３】

前記動物が、哺乳動物である、請求項１～４２のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項４４】

前記哺乳動物が、齧歯動物である、請求項４３に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項４５】

前記齧歯動物が、ラットまたはマウスである、請求項４４に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項４６】

前記齧歯動物が、前記マウスである、請求項４５に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項４７】

前記動物が、ヒトである、請求項１～４２のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項４８】

前記標的遺伝子が、肝臓で発現される遺伝子である、請求項１～４７のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項４９】

前記標的遺伝子が、疾患関連遺伝子である、請求項１～４８のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項５０】

前記標的遺伝子の発現または活性の減少が、疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはその原因となる、請求項１～４９のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項５１】

前記標的遺伝子が、ハプロ不全遺伝子であるか、またはＯＴＣ、ＨＢＧ１、またはＨＢＧ２である、請求項１～５０のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項５２】

前記標的遺伝子が、表３に列挙される遺伝子から選択されるハプロ不全遺伝子である、請求項５１に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項５３】

前記ハプロ不全遺伝子が、ＫＣＮＱ４、ＰＩＮＫ１、ＴＰ７３、ＧＬＵＴ１、ＭＹＨ、ＡＢＣＡ４、ＬＲＨ－１、ＰＡＸ８、ＳＬＣ４０Ａ１、ＢＭＰＲ２、ＰＫＤ２、ＰＩＫ３Ｒ１、ＨＭＧＡ１、ＧＣＫ、ＥＬＮ、ＧＴＦ３、ＧＡＴＡ３、ＢＵＢ３、ＰＡＸ６、ＦＬＩ１、ＨＮＦ１Ａ、ＰＫＤ１、ＭＣ４Ｒ、ＤＭＰＫ、またはＭＹＨ９である、請求項５１または５２に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項５４】

前記標的遺伝子の発現または活性の増加が、疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはその原因となる、請求項１～４９のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。

【請求項５５】

前記脂質ナノ粒子が、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、およびステルス脂質

を含む、請求項１～５４のいずれか一項に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項５６】
前記カチオン性脂質がＭＣ３であり、および／または前記中性脂質が、ＤＳＰＣであり、および／または前記ヘルパー脂質が、コレステロールであり、および／または前記ステルス脂質が、ＰＥＧ－ＤＭＧである、請求項５５に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項５７】
前記脂質ナノ粒子が、約５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、ＭＣ３、ＤＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＭＧを含む、請求項５６に記載の脂質ナノ粒子。
【請求項５８】
インビボでの動物における標的遺伝子の発現を増加させるための方法であって、
（ａ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質を含む、キメラ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）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする核酸と、
（ｂ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したアダプタータンパク質を含む、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸と、
（ｃ）各ガイドＲＮＡが、前記キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる１つ以上のアダプター結合要素を含む、１つ以上のガイドＲＮＡまたは前記１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸であって、前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、前記Ｃａｓタンパク質と複合体を形成し、それを前記標的遺伝子内の標的配列に誘導することができ、それにより前記標的遺伝子の発現を増加させる、１つ以上のガイドＲＮＡまたは前記１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸と、を動物へ導入することを含み、
（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）が、同じ脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内で一緒に送達される、方法。
【請求項５９】
マルチシストロン性またはバイシストロン性核酸が、（ａ）および（ｂ）を含む、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
（ａ）および（ｂ）が、前記マルチシストロン性またはバイシストロン性核酸における２Ａタンパク質コード配列によって連結される、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
（ａ）および（ｂ）が、別個の核酸である、請求項５８に記載の方法。
【請求項６２】
（ａ）および（ｂ）が、各々メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の形態で導入される、請求項５８～６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
前記ｍＲＮＡが、シュードウリジンで完全に置換されるように修飾される、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記ｍＲＮＡが、（ａ）および（ｂ）を含むマルチシストロン性またはバイシストロン性核酸であり、前記ｍＲＮＡが、配列番号６１に記載の配列を含む、請求項６２または６３に記載の方法。
【請求項６５】
（ｃ）が、ＲＮＡの形態で導入される、請求項５８～６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６６】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、５’末端および／または３’末端に１つ以上の安定化末端修飾を含むように修飾される、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々の前記５’末端および／または３’末端が、１つ以上

のホスホロチオエート結合を含むように修飾される、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々の前記５’末端および／または３’末端が、１つ以上の２’－Ｏ－メチル修飾を含むように修飾される、請求項６６または６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記標的配列が、前記標的遺伝子内の制御性配列を含む、請求項５８～６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０】
前記制御性配列が、プロモーターまたはエンハンサーを含む、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
前記標的配列が、前記標的遺伝子の転写開始部位の２００塩基対以内にある、請求項５８～７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２】
前記標的配列が、前記転写開始部位の２００塩基対上流および前記転写開始部位の１塩基対下流の領域内にある、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
１つまたはガイドＲＮＡの各々が、前記キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる２つのアダプター結合要素を含む、請求項５８～７２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７４】
第１のアダプター結合要素が、前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々の第１のループ内にあり、第２のアダプター結合要素が、前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々の第２のループ内にある、請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）部分と融合されるＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）部分を含む、単一ガイドＲＮＡであり、
前記第１のループが、配列番号１２、１４、５２、または５３の残基１３～１６に対応するテトラループであり、前記第２のループが、配列番号１２、１４、５２、または５３の残基５３～５６に対応するステムループ２である、請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
前記アダプター結合要素が、配列番号１６に記載の配列を含む、請求項５８～７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、配列番号４０、４５、５６、または５７に記載の配列を含む、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
前記１つ以上のガイドＲＮＡの少なくとも１つが、Ｔｔｒ遺伝子を標的とし、任意に、前記Ｔｔｒ標的化ガイドＲＮＡが、配列番号３４～３６のいずれか１つに記載の配列を含む配列を標的とするか、または任意に、前記Ｔｔｒ標的化ガイドＲＮＡが、配列番号３７～３９および５５のいずれか１つに記載の配列を含む、請求項５８～７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９】
前記１つ以上のガイドＲＮＡが、２つ以上の標的遺伝子を標的とする、請求項５８～７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８０】
前記１つ以上のガイドＲＮＡが、単一標的遺伝子を標的とする複数のガイドＲＮＡを含む、請求項５８～７９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８１】

前記１つ以上のガイドＲＮＡが、単一標的遺伝子を標的とする少なくとも３つのガイドＲＮＡを含む、請求項５８～８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８２】
前記少なくとも３つのガイドＲＮＡが、マウスＴｔｒ遺伝子座を標的とし、第１のガイドＲＮＡが、配列番号３４を含む配列を標的とするか、または配列番号３７に記載の配列を含み、第２のガイドＲＮＡが、配列番号３５を含む配列を標的とするか、または配列番号３８に記載の配列を含み、第３のガイドＲＮＡが、配列番号３６を含む配列を標的とするか、または配列番号３９もしくは５５に記載の配列を含む、請求項８１に記載の方法。
【請求項８３】
前記Ｃａｓタンパク質が、Ｃａｓ９タンパク質である、請求項５８～８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８４】
前記Ｃａｓ９タンパク質が、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ Ｃａｓ９タンパク質、またはＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質である、請求項８３に記載の方法。
【請求項８５】
前記Ｃａｓ９タンパク質が、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質と最適に整列された場合に、Ｄ１０ＡおよびＮ８６３ＡまたはＤ１０ＡおよびＨ８４０Ａに対応する変異を含む、請求項８３または８４に記載の方法。
【請求項８６】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする配列が、前記動物における発現のためにコドン最適化される、請求項５８～８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７】
前記キメラＣａｓタンパク質における前記１つ以上の転写活性化因子ドメインが、ＶＰ１６、ＶＰ６４、ｐ６５、ＭｙｏＤ１、ＨＳＦ１、ＲＴＡ、ＳＥＴ７／９、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項５８～８６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８】
前記キメラＣａｓタンパク質における前記１つ以上の転写活性化因子ドメインが、ＶＰ６４を含む、請求項８７記載の方法。
【請求項８９】
前記キメラＣａｓタンパク質が、Ｎ末端からＣ末端まで、触媒的に不活性なＣａｓタンパク質、核局在化シグナル、およびＶＰ６４転写活性化因子ドメインを含む、請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
前記キメラＣａｓタンパク質が、配列番号１に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む、請求項８９に記載の方法。
【請求項９１】
前記キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸が、配列番号２５に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む、請求項９０に記載の方法。
【請求項９２】
前記アダプタータンパク質が、前記キメラアダプタータンパク質のＮ末端にあり、前記１つ以上の転写活性化ドメインが、前記キメラアダプタータンパク質のＣ末端にある、請求項５８～９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３】
前記アダプタータンパク質が、ＭＳ２コートタンパク質またはその機能的断片もしくはバリアントを含む、請求項５８～９２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９４】

前記キメラアダプタータンパク質における前記１つ以上の転写活性化ドメインが、ＶＰ１６、ＶＰ６４、ｐ６５、ＭｙｏＤ１、ＨＳＦ１、ＲＴＡ、ＳＥＴ７／９、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項５８～９３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９５】

前記キメラＣａｓタンパク質における前記１つ以上の転写活性化ドメインが、ｐ６５およびＨＳＦ１を含む、請求項９４に記載の方法。

【請求項９６】

前記キメラアダプタータンパク質が、Ｎ末端からＣ末端まで、ＭＳ２コートタンパク質、核局在化シグナル、ｐ６５転写活性化ドメイン、およびＨＳＦ１転写活性化ドメインを含む、請求項９５に記載の方法。

【請求項９７】

前記キメラアダプタータンパク質が、配列番号６に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む、請求項９６に記載の方法。

【請求項９８】

前記キメラアダプタータンパク質をコードする核酸が、配列番号２７に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む、請求項９７に記載の方法。

【請求項９９】

前記動物が、非ヒト動物である、請求項５８～９８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１００】

前記動物が、哺乳動物である、請求項５８～９９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０１】

前記哺乳動物が、齧歯動物である、請求項１００に記載の方法。

【請求項１０２】

前記齧歯動物が、ラットまたはマウスである、請求項１０１に記載の方法。

【請求項１０３】

前記齧歯動物が、前記マウスである、請求項１０２に記載の方法。

【請求項１０４】

前記動物が、ヒトである、請求項５８～９９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０５】

前記動物が、標的遺伝子の発現の増加を必要とする対象であり、前記標的遺伝子が、前記対象において過少発現されており、前記過少発現が、前記対象における疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはその原因となる、請求項５８～１０４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０６】

前記標的遺伝子が、肝臓で発現される遺伝子である、請求項５８～１０５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０７】

前記標的遺伝子が、疾患関連遺伝子である、請求項５８～１０６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０８】

前記標的遺伝子の発現または活性の減少が、疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはその原因となる、請求項５８～１０７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０９】

前記標的遺伝子が、ハプロ不全遺伝子であるか、またはＯＴＣ、ＨＢＧ１、またはＨＢＧ２である、請求項５８～１０８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１１０】

前記標的遺伝子が、表３に列挙される遺伝子から選択されるハプロ不全遺伝子である、請求項１０９に記載の方法。

【請求項１１１】
前記ハプロ不全遺伝子が、ＫＣＮＱ４、ＰＩＮＫ１、ＴＰ７３、ＧＬＵＴ１、ＭＹＨ、ＡＢＣＡ４、ＬＲＨ－１、ＰＡＸ８、ＳＬＣ４０Ａ１、ＢＭＰＲ２、ＰＫＤ２、ＰＩＫ３Ｒ１、ＨＭＧＡ１、ＧＣＫ、ＥＬＮ、ＧＴＦ３、ＧＡＴＡ３、ＢＵＢ３、ＰＡＸ６、ＦＬＩ１、ＨＮＦ１Ａ、ＰＫＤ１、ＭＣ４Ｒ、ＤＭＰＫ、またはＭＹＨ９である、請求項１０９または１１０に記載の方法。
【請求項１１２】
前記標的遺伝子の発現または活性の増加が、疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはその原因となる、請求項５８～１０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１３】
前記脂質ナノ粒子が、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、およびステルス脂質を含む、請求項５８～１１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１４】
前記カチオン性脂質がＭＣ３であり、および／または前記中性脂質が、ＤＳＰＣであり、および／または前記ヘルパー脂質が、コレステロールであり、および／または前記ステルス脂質が、ＰＥＧ－ＤＭＧである、請求項１１３に記載の方法。
【請求項１１５】
前記脂質ナノ粒子が、約５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、ＭＣ３、ＤＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＭＧを含む、請求項１１４に記載の方法。
【請求項１１６】
前記動物への前記１つ以上のガイドＲＮＡの投与経路が、静脈内注入、実質内注入、腹腔内注入、鼻腔内注入、または硝子体内注入である、請求項５８～１１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１７】
前記標的遺伝子の発現の増加が、対照動物と比較して、少なくとも０．５倍、１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、または２０倍高い、請求項５８～１１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１８】
前記標的遺伝子の発現の増加の持続時間が、少なくとも約１日、少なくとも約２日、少なくとも約３日、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約１週、少なくとも約２週、少なくとも約３週、少なくとも約４週、少なくとも約１ヶ月、または少なくとも約２ヶ月である、請求項５８～１１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１９】
（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）を含む前記脂質ナノ粒子が、２回以上連続して前記動物に導入される、請求項５８～１１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２０】
（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）を含む前記脂質ナノ粒子が、３回以上連続して前記動物に導入される、請求項１１９に記載の方法。
【請求項１２１】
前記標的遺伝子の発現が、前記脂質ナノ粒子の各連続導入後に、少なくとも同じレベルまで増加する、請求項１１９または１２０に記載の方法。
【請求項１２２】
前記標的遺伝子の発現が、前記脂質ナノ粒子が一度だけ導入される方法よりも高いレベルに増加する、請求項１１９～１２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２３】
細胞における標的遺伝子の発現を増加させるための方法であって、
（ａ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質を含む、キメラ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）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする核酸と、
（ｂ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したアダプタータンパク質を含む、キメラ

アダプタータンパク質をコードする核酸と、
（ｃ）各ガイドＲＮＡが、前記キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる１つ以上のアダプター結合要素を含む、１つ以上のガイドＲＮＡまたは前記１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸であって、前記１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、前記Ｃａｓタンパク質と複合体を形成し、それを前記標的遺伝子内の標的配列に誘導することができ、それにより前記標的遺伝子の発現を増加させる、１つ以上のガイドＲＮＡまたは前記１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸と、を細胞へ導入することを含み、
（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）が、同じ脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内で一緒に送達される、方法。

【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、２０１９年９月１３日に出願された米国出願第６２／９００，０８０号、および２０２０年６月２３日に出願された米国出願第６３／０４２，７６２号の利益を主張し、これらのそれぞれは、すべて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。
【０００２】
ＥＦＳ　ＷＥＢを介してテキストファイルとして提出された配列表への参照
ファイル６９３７４６ＳＥＱＬＩＳＴ．ｔｘｔに記述された配列表は１２２キロバイトであり、２０２０年９月１１日に作成され、参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００３】
遺伝子発現は、発達および疾患などの多くの生物学的プロセスで厳密に制御されている。転写因子は、標的遺伝子のエンハンサーおよびプロモーター領域で特定のＤＮＡ配列と結合することによって遺伝子発現を制御し、それらのエフェクタードメインを介して転写を調節する。同じ原理に基づいて、人工転写因子（ＡＴＦ）は、様々な機能ドメインを目的の遺伝子と結合するように操作されたＤＮＡ結合ドメインと融合することによって生成され、それによってそれらの発現を調節する。しかしながら、これらのＡＴＦの結合特異性は通常縮退しており、予測が困難であり得、複雑で時間のかかるＡＴＦの設計および生成がその適用を制限している。
【０００４】
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系活性化は、機能的な遺伝子調査のための強力なツールであるが、送達の難しさが、インビボでのその適用を制限している。インビボでの１つの制限は、すべての構成要素が同じ細胞に到達し、標的遺伝子の転写の強力かつ持続的な増加を誘導するように、すべての構成要素を生体に同時に導入する必要があることである。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ剤をインビボで導入するために、より優れた方法およびツールが必要である。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００５】
同じ脂質ナノ粒子内にＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ相乗的活性化メディエーターシステム構成要素を一緒に含む脂質ナノ粒子、ならびにかかる脂質ナノ粒子を使用して、真核生物のゲノム、細胞、および生物におけるインビボおよびエクスビボで標的遺伝子の発現を増加させ、真核生物のゲノム、細胞、および生物におけるインビボおよびエクスビボで標的遺伝子の発現を増加させる能力についてＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ相乗的活性化メディエーターシステムを評価する方法が提供される。
【０００６】
一態様では、標的遺伝子にカーゴを送達し、動物または細胞における標的遺伝子の発現

を増加させるための脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）が提供される。いくつかのかかるＬＮＰでは、カーゴは、（ａ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質を含む、キメラ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）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする核酸と、（ｂ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したアダプタータンパク質を含む、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸と、（ｃ）各ガイドＲＮＡが、キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる１つ以上のアダプター結合要素を含む、１つ以上のガイドＲＮＡまたは１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸であって、１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、Ｃａｓタンパク質と複合体を形成し、それを標的遺伝子内の標的配列に誘導することができ、それにより標的遺伝子の発現を増加させる、１つ以上のガイドＲＮＡまたは１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸と、を含む。

【０００７】

いくつかのかかるＬＮＰでは、マルチシストロン性またはバイシストロン性核酸は、（ａ）および（ｂ）を含む。任意に、（ａ）および（ｂ）は、マルチシストロン性またはバイシストロン性核酸における２Ａタンパク質コード配列によって連結される。いくつかのかかるＬＮＰでは、（ａ）および（ｂ）は、別個の核酸である。いくつかのかかるＬＮＰでは、（ａ）および（ｂ）は、各々メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の形態である。任意に、ｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されるように修飾される。任意に、ｍＲＮＡは、（ａ）および（ｂ）を含むマルチシストロン性またはバイシストロン性の核酸であり、ｍＲＮＡは、配列番号６１に記載の配列を含むか、または配列番号６１に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、もしくは１００％同一の配列を含む（任意に、配列番号６１と同じタンパク質をコードする）。いくつかのかかるＬＮＰでは、（ｃ）は、ＲＮＡの形態である任意に、１つ以上のガイドＲＮＡの各々は、５’末端および／または３’末端に１つ以上の安定化末端修飾を含むように修飾される。任意に、１つ以上のガイドＲＮＡの各々の５’末端および／または３’末端は、１つ以上のホスホロチオエート結合を含むように修飾される。任意に、１つ以上のガイドＲＮＡの各々の５’末端および／または３’末端は、１つ以上の２’－Ｏ－メチル修飾を含むように修飾される。

【０００８】

いくつかのかかるＬＮＰでは、標的配列は、標的遺伝子内の制御性配列を含む。任意に、制御性配列は、プロモーターまたはエンハンサーを含む。いくつかのかかるＬＮＰでは、標的配列は、標的遺伝子の転写開始部位の２００塩基対以内にある。任意に、標的配列は、転写開始部位の２００塩基対上流および転写開始部位の１塩基対下流の領域内にある。

【０００９】

いくつかのかかるＬＮＰでは、１つまたはガイドＲＮＡの各々は、キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる２つのアダプター結合要素を含む。任意に、第１のアダプター結合要素は、１つ以上のガイドＲＮＡの各々の第１のループ内にあり、第２のアダプター結合要素は、１つ以上のガイドＲＮＡの各々の第２のループ内にある。任意に、１つ以上のガイドＲＮＡの各々は、トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）部分と融合されるＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）部分を含む、単一ガイドＲＮＡであり、第１のループは、配列番号１２、１４、５２、または５３の残基１３～１６に対応するテトラループであり、第２のループは、配列番号１２、１４、５２、または５３の残基５３～５６に対応するステムループ２である。

【００１０】

いくつかのかかるＬＮＰでは、アダプター結合要素は、配列番号１６に記載の配列を含む。任意に、１つ以上のガイドＲＮＡの各々は、配列番号４０、４５、５６、または５７に記載の配列を含む。

【００１１】

いくつかのかかるＬＮＰでは、１つ以上のガイドＲＮＡの少なくとも１つは、Ｔｔｒ遺

伝子を標的とし、任意に、Ｔｔｒ標的化ガイドＲＮＡは、配列番号３４～３６のいずれか１つに記載の配列を含む配列を標的とするか、または任意に、Ｔｔｒ標的化ガイドＲＮＡは、配列番号３７～３９および５５のいずれか１つに記載の配列を含む。

【００１２】

いくつかのかかるＬＮＰでは、１つ以上のガイドＲＮＡは、２つ以上の標的遺伝子を標的とする。いくつかのかかるＬＮＰでは、１つ以上のガイドＲＮＡは、単一標的遺伝子を標的とする複数のガイドＲＮＡを含む。いくつかのかかるＬＮＰでは、１つ以上のガイドＲＮＡは、単一標的遺伝子を標的とする少なくとも３つのガイドＲＮＡを含む。任意に、少なくとも３つのガイドＲＮＡは、マウスＴｔｒ遺伝子座を標的とし、第１のガイドＲＮＡが、配列番号３４を含む配列を標的とするか、または配列番号３７に記載の配列を含み、第２のガイドＲＮＡは、配列番号３５を含む配列を標的とするか、または配列番号３８に記載の配列を含み、第３のガイドＲＮＡが、配列番号３６を含む配列を標的とするか、または配列番号３９もしくは５５に記載の配列を含む。

【００１３】

いくつかのかかるＬＮＰでは、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質である。任意に、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ Ｃａｓ９タンパク質、またはＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質である。任意に、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質と最適に整列された場合に、Ｄ１０ＡおよびＮ８６３ＡまたはＤ１０ＡおよびＨ８４０Ａに対応する変異を含む。

【００１４】

いくつかのかかるＬＮＰでは、Ｃａｓタンパク質をコードする配列は、動物または細胞における発現のためにコドン最適化される。

【００１５】

いくつかのかかるＬＮＰでは、キメラＣａｓタンパク質における１つ以上の転写活性化因子ドメインが、ＶＰ１６、ＶＰ６４、ｐ６５、ＭｙｏＤ１、ＨＳＦ１、ＲＴＡ、ＳＥＴ７／９、およびそれらの組み合わせから選択される。任意に、キメラＣａｓタンパク質における１つ以上の転写活性化因子ドメインは、ＶＰ６４を含む。任意に、キメラＣａｓタンパク質は、Ｎ末端からＣ末端まで、触媒的に不活性なＣａｓタンパク質、核局在化シグナル、およびＶＰ６４転写活性化因子ドメインを含む。任意に、キメラＣａｓタンパク質は、配列番号１に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む。任意に、キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸は、配列番号２５に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む。

【００１６】

いくつかのかかるＬＮＰでは、アダプタータンパク質は、キメラアダプタータンパク質のＮ末端にあり、１つ以上の転写活性化ドメインは、キメラアダプタータンパク質のＣ末端にある。いくつかのかかるＬＮＰでは、アダプタータンパク質は、ＭＳ２コートタンパク質またはその機能的断片もしくはバリアントを含む。いくつかのかかるＬＮＰでは、キメラアダプタータンパク質における１つ以上の転写活性化ドメインは、ＶＰ１６、ＶＰ６４、ｐ６５、ＭｙｏＤ１、ＨＳＦ１、ＲＴＡ、ＳＥＴ７／９、およびそれらの組み合わせから選択される。任意に、キメラＣａｓタンパク質における１つ以上の転写活性化ドメインは、ｐ６５およびＨＳＦ１を含む。任意に、キメラアダプタータンパク質は、Ｎ末端からＣ末端まで、ＭＳ２コートタンパク質、核局在化シグナル、ｐ６５転写活性化ドメイン、およびＨＳＦ１転写活性化ドメインを含む。任意に、キメラアダプタータンパク質は、配列番号６に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む。任意に、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸は、配列番号２７に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む。

【００１７】
いくつかのかかるＬＮＰでは、動物は、非ヒト動物である。いくつかのかかるＬＮＰでは、動物は、哺乳動物である。任意に、哺乳動物は、齧歯動物である。任意に、齧歯動物は、ラットまたはマウスである。任意に、齧歯動物は、マウスです。いくつかのかかるＬＮＰでは、動物は、ヒトである。いくつかのかかるＬＮＰでは、標的遺伝子は、肝臓で発現される遺伝子である。
【００１８】
いくつかのかかるＬＮＰでは、標的遺伝子は、疾患関連遺伝子である。いくつかのかかるＬＮＰでは、標的遺伝子の発現または活性の減少は、疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはその原因となる。いくつかのかかるＬＮＰでは、標的遺伝子は、ハプロ不全遺伝子であるか、またはＯＴＣ、ＨＢＧ１、またはＨＢＧ２である。任意に、ハプロ不全遺伝子は、ＫＣＮＱ４、ＰＩＮＫ１、ＴＰ７３、ＧＬＵＴ１、ＭＹＨ、ＡＢＣＡ４、ＬＲＨ－１、ＰＡＸ８、ＳＬＣ４０Ａ１、ＢＭＰＲ２、ＰＫＤ２、ＰＩＫ３Ｒ１、ＨＭＧＡ１、ＧＣＫ、ＥＬＮ、ＧＴＦ３、ＧＡＴＡ３、ＢＵＢ３、ＰＡＸ６、ＦＬＩ１、ＨＮＦ１Ａ、ＰＫＤ１、ＭＣ４Ｒ、ＤＭＰＫ、またはＭＹＨ９である。任意に、ハプロ不全遺伝子は、表２または表３内の遺伝子のうちのいずれかである。いくつかのかかるＬＮＰでは、標的遺伝子の発現または活性の増加は、疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはその原因となる。
【００１９】
いくつかのかかるＬＮＰは、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、およびステルス脂質を含む。任意に、カチオン性脂質はＭＣ３であり、および／または中性脂質は、ＤＳＰＣであり、および／またはヘルパー脂質は、コレステロールであり、および／またはステルス脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧである。任意に、ＬＮＰは、約５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、ＭＣ３、ＤＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＭＧを含む。
【００２０】
別の態様では、インビボでの動物またはエクスビボもしくはインビボでの動物細胞における標的遺伝子の発現を増加させるための方法が提供される。同様に、インビトロでの動物細胞における標的遺伝子の発現を増加させるための方法が提供される。いくつかのかかる方法は、（ａ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質を含む、キメラ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）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする核酸と、（ｂ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したアダプタータンパク質を含む、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸と、（ｃ）各ガイドＲＮＡが、キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる１つ以上のアダプター結合要素を含む、１つ以上のガイドＲＮＡまたは１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸であって、１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、Ｃａｓタンパク質と複合体を形成し、それを標的遺伝子内の標的配列に誘導することができ、それにより標的遺伝子の発現を増加させる、１つ以上のガイドＲＮＡまたは１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸と、を動物または細胞へ導入することを含み、（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）が、同じ脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）内で一緒に送達される。
【００２１】
いくつかのかかる方法では、マルチシストロン性またはバイシストロン性核酸は、（ａ）および（ｂ）を含む。任意に、（ａ）および（ｂ）は、マルチシストロン性またはバイシストロン性核酸における２Ａタンパク質コード配列によって連結される。いくつかのかかる方法では、（ａ）および（ｂ）は、別個の核酸である。いくつかのかかる方法では、（ａ）および（ｂ）は、各々メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の形態で導入される。任意に、ｍＲＮＡは、シュードウリジンで完全に置換されるように修飾される。任意に、ｍＲＮＡは、（ａ）および（ｂ）を含むマルチシストロン性またはバイシストロン性の核酸であり、ｍＲＮＡは、配列番号６１に記載の配列を含むか、または配列番号６１に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、もしくは１００％

同一の配列を含む（任意に、配列番号６１と同じタンパク質をコードする）。いくつかのかかる方法では、（ｃ）は、ＲＮＡの形態で導入される。任意に、１つ以上のガイドＲＮＡの各々は、５’末端および／または３’末端に１つ以上の安定化末端修飾を含むように修飾される。任意に、１つ以上のガイドＲＮＡの各々の５’末端および／または３’末端は、１つ以上のホスホロチオエート結合を含むように修飾される。任意に、１つ以上のガイドＲＮＡの各々の５’末端および／または３’末端は、１つ以上の２’－Ｏ－メチル修飾を含むように修飾される。

【００２２】

いくつかのかかる方法では、標的配列は、標的遺伝子内の制御性配列を含む。任意に、制御性配列は、プロモーターまたはエンハンサーを含む。いくつかのかかる方法では、標的配列は、標的遺伝子の転写開始部位の２００塩基対以内にある。任意に、標的配列は、転写開始部位の２００塩基対上流および転写開始部位の１塩基対下流の領域内にある。

【００２３】

いくつかのかかる方法では、１つまたはガイドＲＮＡの各々は、キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる２つのアダプター結合要素を含む。任意に、第１のアダプター結合要素は、１つ以上のガイドＲＮＡの各々の第１のループ内にあり、第２のアダプター結合要素は、１つ以上のガイドＲＮＡの各々の第２のループ内にある。任意に、１つ以上のガイドＲＮＡの各々は、トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）部分と融合されるＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）部分を含む、単一ガイドＲＮＡであり、第１のループは、配列番号１２、１４、５２、または５３の残基１３～１６に対応するテトラループであり、第２のループは、配列番号１２、１４、５２、または５３の残基５３～５６に対応するステムループ２である。

【００２４】

いくつかのかかる方法では、アダプター結合要素は、配列番号１６に記載の配列を含む。任意に、１つ以上のガイドＲＮＡの各々は、配列番号４０、４５、５６、または５７に記載の配列を含む。

【００２５】

いくつかのかかる方法では、１つ以上のガイドＲＮＡの少なくとも１つは、Ｔｔｒ遺伝子を標的とし、任意に、Ｔｔｒ標的化ガイドＲＮＡは、配列番号３４～３６のいずれか１つに記載の配列を含む配列を標的とするか、または任意に、Ｔｔｒ標的化ガイドＲＮＡは、配列番号３７～３９および５５のいずれか１つに記載の配列を含む。

【００２６】

いくつかのかかる方法では、１つ以上のガイドＲＮＡは、２つ以上の標的遺伝子を標的とする。いくつかのかかる方法では、１つ以上のガイドＲＮＡは、単一標的遺伝子を標的とする複数のガイドＲＮＡを含む。いくつかのかかる方法では、１つ以上のガイドＲＮＡは、単一標的遺伝子を標的とする少なくとも３つのガイドＲＮＡを含む。任意に、少なくとも３つのガイドＲＮＡは、マウスＴｔｒ遺伝子座を標的とし、第１のガイドＲＮＡが、配列番号３４を含む配列を標的とするか、または配列番号３７に記載の配列を含み、第２のガイドＲＮＡは、配列番号３５を含む配列を標的とするか、または配列番号３８に記載の配列を含み、第３のガイドＲＮＡが、配列番号３６を含む配列を標的とするか、または配列番号３９もしくは５５に記載の配列を含む。

【００２７】

いくつかのかかる方法では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質である。任意に、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ　Ｃａｓ９タンパク質、またはＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９タンパク質である。任意に、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質と最適に整列された場合に、Ｄ１０ＡおよびＮ８６３ＡまたはＤ１０ＡおよびＨ８４０Ａに対応する変異を含む。

【００２８】

いくつかのかかる方法では、Ｃａｓタンパク質をコードする配列は、動物における発現のためにコドン最適化される。

【００２９】

いくつかのかかる方法では、キメラＣａｓタンパク質における１つ以上の転写活性化因子ドメインが、ＶＰ１６、ＶＰ６４、ｐ６５、ＭｙｏＤ１、ＨＳＦ１、ＲＴＡ、ＳＥＴ７／９、およびそれらの組み合わせから選択される。任意に、キメラＣａｓタンパク質における１つ以上の転写活性化因子ドメインは、ＶＰ６４を含む。任意に、キメラＣａｓタンパク質は、Ｎ末端からＣ末端まで、触媒的に不活性なＣａｓタンパク質、核局在化シグナル、およびＶＰ６４転写活性化因子ドメインを含む。任意に、キメラＣａｓタンパク質は、配列番号１に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む。任意に、キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸は、配列番号２５に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む。

【００３０】

いくつかのかかる方法では、アダプタータンパク質は、キメラアダプタータンパク質のＮ末端にあり、１つ以上の転写活性化ドメインは、キメラアダプタータンパク質のＣ末端にある。いくつかのかかる方法では、アダプタータンパク質は、ＭＳ２コートタンパク質またはその機能的断片もしくはバリアントを含む。いくつかのかかる方法では、キメラアダプタータンパク質における１つ以上の転写活性化ドメインは、ＶＰ１６、ＶＰ６４、ｐ６５、ＭｙｏＤ１、ＨＳＦ１、ＲＴＡ、ＳＥＴ７／９、およびそれらの組み合わせから選択される。任意に、キメラＣａｓタンパク質における１つ以上の転写活性化ドメインは、ｐ６５およびＨＳＦ１を含む。任意に、キメラアダプタータンパク質は、Ｎ末端からＣ末端まで、ＭＳ２コートタンパク質、核局在化シグナル、ｐ６５転写活性化ドメイン、およびＨＳＦ１転写活性化ドメインを含む。任意に、キメラアダプタータンパク質は、配列番号６に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む。任意に、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸は、配列番号２７に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む。

【００３１】

いくつかのかかる方法では、動物は、非ヒト動物である。いくつかのそのような方法では、動物は、哺乳動物である。任意に、哺乳動物は、齧歯動物である。任意に、齧歯動物は、ラットまたはマウスである。任意に、齧歯動物は、マウスです。いくつかのかかる方法では、動物は、ヒトである。いくつかのかかる方法では、動物は、標的遺伝子の発現の増加を必要とする対象であり、標的遺伝子が、対象において過少発現されており、過少発現が、対象における疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはその原因となる。いくつかのかかる方法では、標的遺伝子は、肝臓で発現される遺伝子である。いくつかのかかる方法では、動物への１つ以上のガイドＲＮＡの投与経路は、静脈内注入、実質内注入、腹腔内注入、鼻腔内注入、または硝子体内注入である。

【００３２】

いくつかのかかる方法では、標的遺伝子は、疾患関連遺伝子である。いくつかのかかる方法では、標的遺伝子の発現または活性の減少は、疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはその原因となる。いくつかのかかる方法では、標的遺伝子は、ハプロ不全遺伝子であるか、またはＯＴＣ、ＨＢＧ１、またはＨＢＧ２である。任意に、ハプロ不全遺伝子は、ＫＣＮＱ４、ＰＩＮＫ１、ＴＰ７３、ＧＬＵＴ１、ＭＹＨ、ＡＢＣＡ４、ＬＲＨ－１、ＰＡＸ８、ＳＬＣ４０Ａ１、ＢＭＰＲ２、ＰＫＤ２、ＰＩＫ３Ｒ１、ＨＭＧＡ１、ＧＣＫ、ＥＬＮ、ＧＴＦ３、ＧＡＴＡ３、ＢＵＢ３、ＰＡＸ６、ＦＬＩ１、ＨＮＦ１Ａ、ＰＫＤ１、ＭＣ４Ｒ、ＤＭＰＫ、またはＭＹＨ９である。任意に、ハプロ不全遺伝子は、表２または表３内の遺伝子のうちのいずれかである。いくつかのかかる方法では、標的遺伝子の発現または活性の増加は、疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはその原因となる。

【００３３】
いくつかのかかる方法では、脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、およびステルス脂質を含む。任意に、カチオン性脂質はＭＣ３であり、および／または中性脂質は、ＤＳＰＣであり、および／またはヘルパー脂質は、コレステロールであり、および／またはステルス脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧである。任意に、脂質ナノ粒子は、約５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、ＭＣ３、ＤＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＭＧを含む。
【００３４】
いくつかのかかる方法では、標的遺伝子の発現の増加は、対照動物または細胞と比較して、少なくとも０．５倍、１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、または２０倍高い。いくつかのかかる方法では、標的遺伝子の発現の増加の持続時間は、少なくとも約１日、少なくとも約２日、少なくとも約３日、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約１週、少なくとも約２週、少なくとも約３週、少なくとも約４週、少なくとも約１ヶ月、または少なくとも約２ヶ月である。
【００３５】
いくつかのかかる方法では、（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）を含む脂質ナノ粒子は、２回以上連続して動物または細胞に導入される。いくつかのかかる方法では、（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）を含む脂質ナノ粒子は、３回以上連続して動物または細胞に導入される。任意に、標的遺伝子の発現は、脂質ナノ粒子の各連続導入後に、少なくとも同じレベルまで増加する。任意に、標的遺伝子の発現は、脂質ナノ粒子が一度だけ導入される方法よりも高いレベルに増加する。
【図面の簡単な説明】
【００３６】
【図１】（原寸に比例していない）ＴｔｒガイドＲＮＡアレイの概略図を示す。ガイドＲＮＡアレイ対立遺伝子は、５’から３’まで、第１のＵ６プロモーター、第１のガイドＲＮＡコード配列、第２のＵ６プロモーター、第２のガイドＲＮＡコード配列、第３のＵ６プロモーター、第３のガイドＲＮＡコード配列を含む。
【図２】（原寸に比例していない）Ｔｔｒの転写開始部位の上流を標的とする３つのガイドＲＮＡを設計するための概略図を示す。
【図３】テトラループとステムループ２がＭＳ２結合アプタマーに置き換えられ、転写活性化ドメインと融合したキメラＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）の動員を促進する、一般的なシングルガイドＲＮＡ（配列番号４５）の概略図を示す。
【図４】ＥＬＩＳＡでアッセイした際の未処理ｄＣａｓ９　ＳＡＭマウス、ＡＡＶ８－ＧＦＰで処理したｄＣａｓ９　ＳＡＭマウス、およびＴｔｒガイドＲＮＡアレイを含むＡＡＶ８で処理したｄＣａｓ９　ＳＡＭマウスにおけるＴＴＲの循環血清レベルを示す。注入後５日、１９日、２ヶ月、３ヶ月、４ヶ月、５ヶ月、６ヶ月、７ヶ月、および８ヶ月の結果が表示される。
【図５Ａ】ＥＬＩＳＡでアッセイした際の未処理ｄＣａｓ９　ＳＡＭマウスおよびＴｔｒガイドＲＮＡ（Ｒ－ＬＮＰ　２７７）を含むＬＮＰで処理したｄＣａｓ９　ＳＡＭマウスにおけるＴＴＲの循環血清レベル（図５Ａ）およびベースラインからのＴＴＲの循環血清レベルの変化率（図５Ｂ）を示す。注入後１、３、６、８、１０、１３、１７、２０、２７、３４、および６７日の結果が示される。
【図５Ｂ】ＥＬＩＳＡでアッセイした際の未処理ｄＣａｓ９　ＳＡＭマウスおよびＴｔｒガイドＲＮＡ（Ｒ－ＬＮＰ　２７７）を含むＬＮＰで処理したｄＣａｓ９　ＳＡＭマウスにおけるＴＴＲの循環血清レベル（図５Ａ）およびベースラインからのＴＴＲの循環血清レベルの変化率（図５Ｂ）を示す。注入後１、３、６、８、１０、１３、１７、２０、２７、３４、および６７日の結果が示される。
【図６】ＥＬＩＳＡでアッセイした際の未処理ｄＣａｓ９　ＳＡＭマウスおよびＴｔｒガイドＲＮＡ（Ｒ－ＬＮＰ　２７７）を含むＬＮＰで処理したｄＣａｓ９　ＳＡＭマウスのＴＴＲの循環レベルを示す。０．５ｍｐｋ、１ｍｐｋ、および２ｍｐｋの用量の結果が、

注入後１週、２週、３週、４週、５週、６週、および７週で示される。すべての値は、平均＋／－ＳＤとしてプロットされる。アスタリスクは有意性を示し、アスタリスクの数は小数点以下の０の数を示す（Ｔ検定）。

【図７Ａ】ｄＣａｓ９　ＳＡＭマウス（Ｒ２６$^{ＳＡＭ／ＳＡＭ}$）において４週でＬＮＰ^{ＴｔｒｇＡ２}を連続投与した後のＴＴＲの循環レベルを示す。ＬＮＰ粒子は、０．５ｍｐｋの合成Ｔｔｒ　ｇＡ２　ＳＡＭガイドで製剤化され、ホモ接合型ｄＣａｓ９　ＳＡＭマウス（Ｒ２６$^{ＳＡＭ／ＳＡＭ}$）（ｎ＝５）に０週および／または４週で導入された。タンパク質発現レベルは、毎週の採血を用いるＥＬＩＳＡによって決定された。すべての値は、平均＋／－ＳＤとしてプロットされる。アスタリスクは有意性を示し、アスタリスクの数は小数点以下の０の数を示す（Ｔ検定）。

【図７Ｂ】ｄＣａｓ９　ＳＡＭマウス（Ｒ２６$^{ＳＡＭ／ＳＡＭ}$）において２週でＬＮＰ^{ＴｔｒｇＡ２}を連続投与した後のＴＴＲの循環レベルを示す。ＬＮＰ粒子は、０．５ｍｐｋの合成Ｔｔｒ　ｇＡ２　ＳＡＭガイドで製剤化され、ホモ接合型ｄＣａｓ９　ＳＡＭマウス（Ｒ２６$^{ＳＡＭ／ＳＡＭ}$）（ｎ＝０．５）に０週および／または２週で導入された。タンパク質発現レベルは、毎週の採血を用いるＥＬＩＳＡによって決定された。すべての値は、平均＋／－ＳＤとしてプロットされる。アスタリスクは有意性を示し、アスタリスクの数は小数点以下の０の数を示す（Ｔ検定）。

【図８】ｄＣａｓ９　ＳＡＭマウス（Ｒ２６$^{ＳＡＭ／ＳＡＭ}$）において０週、２週、および４週でＬＮＰ^{ＴｔｒｇＡ２}を連続投与した後のＴＴＲの循環レベルを示す。ＬＮＰ粒子は、０．５ｍｐｋの合成Ｔｔｒ　ｇＡ２　ＳＡＭガイドで製剤化され、ホモ接合型ｄＣａｓ９　ＳＡＭマウス（Ｒ２６$^{ＳＡＭ／ＳＡＭ}$）（ｎ＝０．５）に０週、２週、４週、または０週間でのみ導入された。タンパク質発現レベルは、毎週の採血を用いるＥＬＩＳＡによって決定された。すべての値は、平均＋／－ＳＤとしてプロットされる。

【図９】合成Ｔｔｒ　ＳＡＭガイドおよびＳＡＭ　ｍＲＮＡ（シュードウリジン修飾または非修飾のいずれか）で製剤化されたＬＮＰ粒子を野生型マウスに投与した後のＴＴＲの循環レベルを示す。未処理マウスを陰性対照として使用した。タンパク質発現レベルは、示された時点での採血を用いるＥＬＩＳＡによって決定された。すべての値は、平均＋／－ＳＥＭとしてプロットされる。

【発明を実施するための形態】

【００３７】

定義

本明細書で互換的に使用される、「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」という用語は、コード化および非コード化アミノ酸ならびに化学的または生化学的に修飾または誘導体化したアミノ酸を含む、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を含む。これらの用語には、修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドなどの修飾されたポリマーも含まれる。「ドメイン」という用語は、特定の機能または構造を有するタンパク質またはポリペプチドの任意の部分を指す。

【００３８】

タンパク質は、「Ｎ末端」および「Ｃ末端」を有すると言われている。「Ｎ末端」という用語は、遊離アミン基（－ＮＨ２）を有するアミノ酸によって終端されたタンパク質またはポリペプチドの開始部に関する。「Ｃ末端」という用語は、遊離カルボキシル基（－ＣＯＯＨ）によって終端されたアミノ酸鎖（タンパク質またはポリペプチド）の末端部に関する。

【００３９】

本明細書で互換的に使用される、「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはそれらの類似体もしくは修飾バージョンを含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を含む。これらには、一本鎖、二本鎖、および多重鎖ＤＮＡもしくはＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、ならびにプリン塩基、ピリミジン塩基、または他の天然、化学的に修飾された、生化学的に修飾された、非天然、もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含む

ポリマーが含まれる。
【００４０】
１つのモノヌクレオチドペントース環の５’リン酸塩がホスホジエステル結合を介して一方向で、その隣の３’酸素に結合する手法でオリゴヌクレオチドを作製するように、モノヌクレオチドが反応するため、核酸は、「５’末端」および「３’末端」を有すると言われている。オリゴヌクレオチドの末端は、その５’リン酸塩がモノヌクレオチドペントース環の３’酸素に連結されていない場合、「５’末端」と呼ばれる。オリゴヌクレオチドの末端は、その３’酸素が別のモノヌクレオチドペントース環の５’リン酸塩に連結されていない場合、「３’末端」と呼ばれる。核酸配列は、より大きなオリゴヌクレオチドの内部に存在するとしても、５’および３’末端を有するとも言われ得る。線状または環状ＤＮＡ分子のいずれかにおいて、別個の要素は、「上流」または「下流」の５’もしくは３’要素であると呼ばれる。
【００４１】
「発現ベクター」または「発現構築物」または「発現カセット」という用語は、特定の宿主細胞または生命体における作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な適切な核酸配列に作動可能に連結された所望のコード配列を含む組換え核酸を指す。原核生物での発現に必要な核酸配列には、通常、プロモーター、オペレーター（任意）、リボソーム結合部位、およびその他の配列が含まれる。真核細胞は一般に、プロモーター、エンハンサー、終結およびポリアデニル化シグナルを利用することが知られており、必要な発現を犠牲にすることなく、一部の要素を削除したり、他の要素を追加したりできる。
【００４２】
「標的化ベクター」という用語は、相同組換え、非相同末端結合媒介ライゲーション、または細胞のゲノム中の標的位置への組換えの任意の他の手段によって導入され得る組換え核酸を指す。
【００４３】
タンパク質、核酸、および細胞に関して「単離された」という用語は、タンパク質、核酸、または細胞の実質的に純粋な調製物まで、通常はインサイチュに存在し得る他の細胞または生物成分に関して比較的精製されたタンパク質、核酸、細胞を含む。「単離された」という用語はまた、天然に存在する対応物を有さないタンパク質、および核酸、あるいは化学的に合成され、したがって他のタンパク質または核酸によって実質的に汚染されていないタンパク質または核酸を含む。「単離された」という用語はまた、それらが自然に付随する他のほとんどの細胞成分または生物成分（例えば、他の細胞タンパク質、核酸、または細胞または細胞外成分）から分離または精製されたタンパク質、核酸、または細胞を含む。
【００４４】
「野生型」という用語は、（変異型、病変した、改変したなどとは対照的に）正常な状態または文脈に見られるような構造および／または活性を有する実体を指す。野生型遺伝子およびポリペプチドは、多くの場合、複数の異なる形態（例えば、対立遺伝子）で存在する。
【００４５】
「内因性配列」という用語は、細胞または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）内で自然に発生する核酸配列を指す。例えば、非ヒト動物の内因性Ｔｔｒ配列は、非ヒト動物のＴｔｒ遺伝子座で天然に存在する天然のＴｔｒ配列を指す。
【００４６】
「外因性」分子または配列には、その形態の細胞には通常存在しない分子または配列が含まれる。通常の存在には、細胞の特定の発生段階および環境条件に関する存在が含まれる。外因性分子または配列には、例えば、内因性配列のヒト化バージョンなど、細胞内の対応する内因性配列の変異バージョンが含まれ得るか、または細胞内であるが、異なる形態の（すなわち、染色体内ではない）内因性配列に対応する配列が含まれ得る。対照的に

、内因性分子または配列は、その形態で、特定の細胞において、特定の発生段階で、特定の環境条件下で通常存在する分子または配列を含む。

【００４７】

核酸またはタンパク質の文脈で使用される場合の「異種」という用語は、核酸またはタンパク質が、同じ分子内で一緒に天然に存在しない少なくとも２つのセグメントを含むことを示す。例えば、「異種」という用語は、核酸のセグメントまたはタンパク質のセグメントに関して使用される場合、核酸またはタンパク質が、自然界で互いに同じ関係（例えば、一緒に結合）で見出されない２つ以上のサブ配列を含むことを示す。一例として、核酸ベクターの「異種」領域は、自然界で他の分子と関連して見出されない、別の核酸分子内の、または別の核酸分子に結合した核酸のセグメントである。例えば、核酸ベクターの異種領域は、自然界のコード配列に関連して見出されない配列に隣接するコード配列を含み得る。同様に、タンパク質の「異種」領域は、自然界の他のペプチド分子（例えば、融合タンパク質、またはタグ付きタンパク質）に関連して見出されない、別のペプチド分子内にあるか、またはそれに結合しているアミノ酸のセグメントである。同様に、核酸またはタンパク質は、異種標識または異種分泌または局在化配列を含み得る。

【００４８】

「コドン最適化」は、アミノ酸を指定する３塩基対のコドンの組み合わせの多様性によって示されるように、コドンの縮重を利用し、一般に、天然アミノ酸配列を維持しながら、天然配列の少なくとも１つのコドンを、宿主細胞の遺伝子においてより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンで置き換えることによって、特定の宿主細胞における発現の増強のために核酸配列を修飾するプロセスを含む。例えば、Ｃａｓ９タンパク質をコードする核酸は、天然に存在する核酸配列と比較して、細菌細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、齧歯動物細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、または他の任意の宿主細胞を含む、所与の原核細胞または真核細胞においてより頻度高く使用される代替コドンへと修飾することができる。コドン使用表は、例えば「コドン使用データベース」で容易に入手できる。これらの表は、様々な方法で適合させることができる。すべ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Ｎａｋａｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２８：２９２を参照されたい。特定の宿主における発現のための特定の配列のコドン最適化のためのコンピュータアルゴリズム（例えば、Ｇｅｎｅ　Ｆｏｒｇｅを参照のこと）もまた利用可能である。

【００４９】

「遺伝子座」という用語は、遺伝子（または重要な配列）、ＤＮＡ配列、ポリペプチドコード配列、または生物のゲノムの染色体上の位置（ｐｏｓｉｔｉｏｎ）の特定の位置（ｌｏｃａｔｉｏｎ）を指す。例えば、「Ｔｔｒ遺伝子座」は、Ｔｔｒ遺伝子、ＴｔｒＤＮＡ配列、ＴＴＲをコードする配列、またはそのような配列が常駐すると同定されている生物のゲノムの染色体上のＴｔｒの位置の特定の位置を指し得る。「Ｔｔｒ遺伝子座」は、例えば、エンハンサー、プロモーター、５’および／もしくは３’非翻訳領域（ＵＴＲ）、またはそれらの組み合わせを含む、Ｔｔｒ遺伝子の制御性要素を含み得る。

【００５０】

「遺伝子」という用語は、生成物（例えば、ＲＮＡ生成物および／またはポリペプチド生成物）をコードする染色体中のＤＮＡ配列を指し、遺伝子が完全長ｍＲＮＡ（５’および３’非翻訳配列を含む）に対応するように、５’および３’末端の両方で、非コードイントロンで中断されたコード領域およびコード領域に隣接して位置する配列を含む。「遺伝子」という用語はまた、制御性配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、および転写因子結合部位）、ポリアデニル化シグナル、内部リボソーム侵入部位、サイレンサー、絶縁配列、およびマトリックス結合領域を含む他の非コード配列を含む。これらの配列は、遺伝子のコード領域に近い場合（例えば、１０ｋｂ以内）または離れた部位にある場合があり、それらは遺伝子の転写および翻訳のレベルまたは速度に影響する。

【００５１】

「対立遺伝子」という用語は、遺伝子のバリアント形態を指す。いくつかの遺伝子は、

染色体上の同じ位置、または遺伝子座に位置する様々な異なる形態を有する。二倍体生物は、各遺伝子座に２つの対立遺伝子を有する。対立遺伝子の各対は、特定の遺伝子座の遺伝子型を表す。遺伝子型は、特定の遺伝子座に２つの同一の対立遺伝子がある場合はホモ接合として、および２つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合として記載されている。

【００５２】

「プロモーター」は、ＲＮＡポリメラーゼＩＩが特定のポリヌクレオチド配列のための適切な転写開始部位でＲＮＡ合成を開始することを指示することができるＴＡＴＡボックスを通常含むＤＮＡの調節領域である。プロモーターは、転写開始速度に影響を及ぼす他の領域をさらに含み得る。本明細書に開示されるプロモーター配列は、作動可能に連結されたポリヌクレオチドの転写を調節する。プロモーターは、本明細書に開示される１つ以上の細胞型（例えば、真核細胞、非ヒト哺乳動物細胞、ヒト細胞、齧歯動物細胞、多能性細胞、一細胞期胚、分化した細胞、またはそれらの組み合わせ）において活性であり得る。プロモーターは、例えば、構成的に活性なプロモーター、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、時間的に制限されたプロモーター（例えば、発生的に調節されたプロモーター）、または空間的に制限されたプロモーター（例えば、細胞特異的または組織特異的プロモーター）であり得る。プロモーターの例は、例えば、ＷＯ２０１３／１７６７７２において見出すことができ、すべ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。

【００５３】

構成的プロモーターは、すべての組織またはすべての発生段階の特定の組織で活性があるものである。構成的プロモーターの例には、ヒトサイトメガロウイルス最初期（ｈＣＭＶ）、マウスサイトメガロウイルス最初期（ｍＣＭＶ）、ヒト伸長因子１アルファ（ｈＥＦ１α）、マウス伸長因子１アルファ（ｍＥＦ１α）、マウスホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）、ニワトリベータアクチンハイブリッド（ＣＡＧまたはＣＢｈ）、ＳＶ４０初期、およびベータ２チューブリンプロモーターが含まれる。

【００５４】

誘導性プロモーターの例としては、例えば、化学的に制御されるプロモーターおよび物理的に制御されるプロモーターが含まれる。化学的に制御されるプロモーターには、例えば、アルコール制御プロモーター（例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ（ａｌｃＡ）遺伝子プロモーター）、テトラサイクリン制御プロモーター（例えば、テトラサイクリン応答性プロモーター、テトラサイクリンオペレーター配列（ｔｅｔＯ）、ｔｅｔ－Ｏｎプロモーター、もしくはｔｅｔ－Ｏｆｆプロモーター）、ステロイド制御プロモーター（例えば、ラットグルココルチコイド受容体、エストロゲン受容体のプロモーター、もしくはエクジソン受容体のプロモーター）、または金属制御プロモーター（例えば、金属タンパク質プロモーター）が含まれる。物理的に制御されるプロモーターには、例えば、温度制御プロモーター（例えば、熱ショックプロモーター）、および光制御プロモーター（例えば、光誘導性プロモーターまたは光抑制性プロモーター）が含まれる。

【００５５】

組織特異的プロモーターは、例えば、ニューロン特異的プロモーター、グリア特異的プロモーター、筋細胞特異的プロモーター、心臓細胞特異的プロモーター、腎臓細胞特異的プロモーター、骨細胞特異的プロモーター、内皮細胞特異的プロモーター、または免疫細胞特異的プロモーター（例えば、Ｂ細胞プロモーターまたはＴ細胞プロモーター）であり得る。

【００５６】

発生的に制御されるプロモーターには、例えば、発生の胚段階の間のみ、または成体細胞においてのみ活性なプロモーターが含まれる。

【００５７】

「作動可能な連結」または「作動可能に連結される」とは、その両方の成分が正常に機能し、かつ成分の少なくとも１つが他の成分のうちの少なくとも１つに及ぶ機能を媒介し得る可能性を許すような、２つ以上の成分（例えば、プロモーターおよび別の配列要素）

の並列を含む。例えば、プロモーターが、１つ以上の転写調節因子の存在または非存在に応じてコード配列の転写のレベルを制御する場合、そのプロモーターは、コード配列に作動可能に連結され得る。作動可能な連結は、そのような配列が相互に近接していること、またはトランスに作用する（例えば、制御性配列が、コード配列の転写を制御するために離れて作用し得る）ことを含み得る。

【００５８】

核酸の「相補性」とは、核酸の一方の鎖のヌクレオチド配列が、その核酸塩基群の配向のために、反対側の核酸鎖の別の配列と水素結合を形成することを意味する。ＤＮＡの相補的塩基は通常ＡとＴ、ＣとＧである。ＲＮＡでは通常ＣとＧ、ＵとＡである。相補性は完全または実質的／十分であり得る。２つの核酸間の完全な相補性は、２つの核酸が二重鎖を形成できることを意味し、二重鎖のすべての塩基がワトソン－クリック対形成によって相補的な塩基に結合する。「実質的」または「十分」に相補的とは、一方の鎖の配列が反対側の鎖の配列と完全におよび／または完全に相補的ではないが、２つの鎖の塩基間で十分な結合が起こり、ハイブリダイゼーション条件のセット（例えば、塩濃度と温度）で安定したハイブリッド複合体を形成することを意味する。このような条件は、配列と標準的な数学的計算を使用してハイブリダイズした鎖のＴｍ（融解温度）を予測するか、日常的な方法を使用してＴｍを経験的に決定することによって予測できる。Ｔｍは、２つの核酸鎖の間に形成されるハイブリダイゼーション複合体の集団が５０％変性する（すなわち、二本鎖核酸分子の集団が一本鎖に半分解離する）温度を含む。Ｔｍより低い温度では、ハイブリダイゼーション複合体の形成が有利であるが、Ｔｍより高い温度では、ハイブリダイゼーション複合体中の鎖の融解または分離が有利である。他の既知のＴｍ計算は核酸の構造的特徴を考慮するが、Ｔｍは、例えば、Ｔｍ＝８１．５＋０．４１（Ｇ＋Ｃ％）を使用することにより、１Ｍ　ＮａＣｌ水溶液中の既知のＧ＋Ｃ含有量を有する核酸について推定され得る。

【００５９】

「ハイブリダイゼーション条件」は、１つの核酸鎖が、ハイブリダイゼーション複合体を生み出すために、相補鎖相互作用および水素結合によって第２の核酸鎖に結合する、累積的な環境を含む。そのような条件には、核酸を含む水溶液または有機溶液の化学成分およびそれらの濃度（例えば、塩、キレート剤、ホルムアミド）、および混合物の温度が含まれる。インキュベーション時間の長さまたは反応チャンバの寸法などの他の要因が環境に寄与し得る。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２．ｓｕｐ．ｎｄ　ｅｄ．，ｐｐ．１．９０－１．９１，９．４７－９．５１，１１．４７－１１．５７（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９）を参照されたく、すべ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。

【００６０】

ハイブリダイゼーションは、２つの核酸が相補的な配列を含むことを要求するが、塩基間のミスマッチも可能である。２つの核酸間のハイブリダイゼーションに適切な条件は、核酸の長さおよび相補性の程度に依存し、これらは既知の変数である。２つのヌクレオチド配列間の相補性の程度が大きいほど、それらの配列を有する核酸のハイブリッドの融解温度（Ｔｍ）の値が大きくなる。短い区間の相補性（例えば、３５以下、３０以下、２５以下、２２以下、２０以下、または１８以下のヌクレオチドにわたる相補性）を有する核酸間のハイブリダイゼーションについて、ミスマッチの位置は、重要になる（上述のＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．の１１．７～１１．８を参照されたい）。典型的には、ハイブリダイズ可能な核酸の長さは少なくとも約１０ヌクレオチドである。ハイブリダイズ可能な核酸の例示的な最小の長さは、少なくとも約１５ヌクレオチド、少なくとも約２０ヌクレオチド、少なくとも約２２ヌクレオチド、少なくとも約２５ヌクレオチド、および少なくとも約３０ヌクレオチドを含む。さらに、温度および洗浄液の塩濃度は、相補性の領域の長さおよび相補性の程度などの要因に従って、必要に応じて調整することができる。

【００６１】
ポリヌクレオチドの配列は、特異的にハイブリダイズするために、その標的核酸の配列と１００％相補的である必要はない。さらに、ポリヌクレオチドは、介在または隣接するセグメントがハイブリダイゼーションイベント（例えば、ループ構造もしくはヘアピン構造）に関与しないように、１つ以上のセグメントにわたってハイブリダイズすることができる。ポリヌクレオチド（例えば、ｇＲＮＡ）は、それらが標的とする標的核酸配列内の標的領域に対して、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列相補性を含むことができる。例えば、２０ヌクレオチドのうち１８ヌクレオチドが標的領域に相補的であり、したがって特異的にハイブリダイズするｇＲＮＡは、９０％の相補性を表す。この例において、残りの非相補性ヌクレオチドは、相補性ヌクレオチドとクラスターを形成するか、散在していてもよく、互いに、または相補性ヌクレオチドと連続的である必要はない。

【００６２】
核酸内の核酸配列の特定のストレッチ間の相補性のパーセントは、ＢＬＡＳＴプログラム（基本的なローカルアラインメント検索ツール）およびＰｏｗｅｒＢＬＡＳＴプログラム（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５（３）：４０３－４１０、Ｚｈａｎｇ ａｎｄ Ｍａｄｄｅｎ（１９９７）Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．７（６）：６４９－６５６）またはＧａｐ ｐｒｏｇｒａｍ（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ８ ｆｏｒ Ｕｎｉｘ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｋ，Ｍａｄｉｓｏｎ Ｗｉｓ．）を使用して（デフォルト設定を使用し、これはＳｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ（１９８１）Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２（４）：４８２－４８９のアルゴリズムを使用する。

【００６３】
本明細書で提供される方法および組成物は、様々な異なる成分を使用する。記載全体の一部の構成要素は、活性バリアントおよびフラグメントを有することができる。このような構成要素には、例えば、Ｃａｓタンパク質、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ、ｔｒａｃｒＲＮＡ、およびガイドＲＮＡが含まれる。これらの構成要素のそれぞれの生物学的活性は、本明細書の他の場所に記載されている。「機能性」という用語は、生物学的活性または機能を示すタンパク質または核酸（またはその断片、もしくはバリアント）の生来の能力を指す。そのような生物学的活性または機能には、例えば、Ｃａｓタンパク質がガイドＲＮＡおよび標的ＤＮＡ配列に結合する能力が含まれ得る。機能的断片またはバリアントの生物学的機能は、元の分子と比較して同じであるか、または実際に変更され得る（例えば、それらの特異性または選択性または有効性に関して）が、分子の基本的な生物学的機能を保持する。

【００６４】
「バリアント」という用語は、集団で最も一般的な配列とは異なるヌクレオチド配列（例えば、１ヌクレオチド）、または集団で最も一般的な配列とは異なるタンパク質配列（例えば、１アミノ酸）を指す。

【００６５】
「断片」という用語は、タンパク質に言及する場合、完全長タンパク質よりも短いか、または少ないアミノ酸を有するタンパク質を意味する。「断片」という用語は、核酸に言及する場合、全長の核酸よりも短いか、または少ないヌクレオチドを有する核酸を意味する。断片は、例えば、Ｎ末端断片（すなわち、タンパク質のＣ末端の一部の除去）、Ｃ末端断片（すなわち、タンパク質のＮ末端の一部の除去）、または内部断片（すなわち、タンパク質のＮ末端とＣ末端の各々の一部の除去）であり得る。断片は、例えば、核酸断片を指す場合、５’断片（すなわち、核酸の３’末端の一部の除去）、３’断片（すなわち、核酸の５’末端の一部の除去）、または内部断片（すなわち、核酸の５’末端と３’末端の各々の一部の除去）であり得る。

【００６６】

２つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」または「同一性」は、特定の比較ウィンドウで最大の一致のためにアラインさせる場合、同じである２つの配列の残基を指す。タンパク質に関して、配列同一性のパーセンテージを使用する場合、同一ではない残基位置は多くの場合に、保存的アミノ酸置換によって異なり、その保存的アミノ酸置換では、アミノ酸残基は同様の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する他のアミノ酸残基で置換されており、したがって、分子の機能特性を変化させない。配列が保存的置換で異なる場合、配列同一性パーセントを、置換の保存的性質について補正するために、上方に調整してもよい。そのような保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有すると言われている。この調整を行う手段は、周知である。典型的には、これは、保存的置換を完全なミスマッチではなく部分的なミスマッチとしてスコアリングして、それによって、配列同一性パーセンテージを増加させることを含む。したがって、例えば、同一のアミノ酸が１のスコアを与えられ、非保存的置換が０のスコアを与えられる場合に、保存的置換は、０～１のスコアを与えられる。保存的置換のスコアリングは、例えば、プログラムＰＣ／ＧＥＮＥ（Ｉｎｔｅｌｌｉｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）で実行されるように計算される。

【００６７】

「配列同一性のパーセンテージ」は、比較ウィンドウにわたって２つの最適にアラインされた配列（完全にマッチする残基の数が最大）を比較することによって決定される値を含み、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列の部分は、２つの配列の最適アラインメントのための（付加また欠失を含まない）参照配列と比較した場合に、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでもよい。パーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列中に発生する位置の数を決定して一致した位置の数を得ること、一致した位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数で割ること、および結果に１００を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。別段の定めがない限り（例えば、短い方の配列が、連結された非相同配列を含む）、比較ウィンドウは、比較される２つの配列のうちの短い方の完全長である。

【００６８】

別段の記載がない限り、配列同一性／類似性の値は、次のパラメータ：５０のＧＡＰ重量および３の長さ重量、およびｎｗｓｇａｐｄｎａ．ｃｍｐスコアリングマトリックスを使用するヌクレオチド配列の同一性％および類似性％；８のＧＡＰ重量および２の長さ重量、およびＢＬＯＳＵＭ６２スコアリングマトリックスを使用するアミノ酸配列の同一性％および類似性％；またはその任意の同等のプログラムを使用し、ＧＡＰバージョン１０を使用して得られた値を含む。「同等のプログラム」は、問題の任意の２つの配列について、ＧＡＰバージョン１０によって生成された対応するアラインメントと比較した場合、同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の一致および同一のパーセント配列同一性を有するアラインメントを生成する任意の配列比較プログラムを含む。

【００６９】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、配列中に通常存在するアミノ酸の、類似のサイズ、電荷、または極性の、異なるアミノ酸との置換を指す。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、またはロイシンなどの非極性（疎水性）残基の、別の非極性残基との置換が含まれる。同様に、保存的置換の例には、アルギニンとリシンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間、またはグリシンとセリンとの間などの、１つの極性（親水性）残基の別のものとの置換が含まれる。加えて、リシン、アルギニン、もしくはヒスチジンなどの塩基性残基から別のものへの置換、またはアスパラギン酸もしくはグルタミン酸などのある酸性残基から別の酸性残基への置換は、保存的置換の追加の例である。非保存的置換の例には、非極性（疎水性）アミノ酸残基、例えば、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、またはメチオニンから極性（親水性）残基、例えば、システイン、グルタミン、グルタミン酸、またはリシンへの、および／または極性残基から非極性残基への置換が含まれる。典型的なアミノ酸の分類は、以下の表１に要約される。

【表１】

表１．アミノ酸の分類

アラニン	Ala	A	非極性	中性	1.8
アルギニン	Arg	R	極性	陽性	-4.5
アスパラギン	Asn	N	極性	中性	-3.5
アスパラギン酸	Asp	D	極性	陰性	-3.5
システイン	Cys	C	非極性	中性	2.5
グルタミン酸	Glu	E	極性	陰性	-3.5
グルタミン	Gln	Q	極性	中性	-3.5
グリシン	Gly	G	非極性	中性	-0.4
ヒスチジン	His	H	極性	陽性	-3.2
イソロイシン	Ile	I	非極性	中性	4.5
ロイシン	Leu	L	非極性	中性	3.8
リシン	Lys	K	極性	陽性	-3.9
メチオニン	Met	M	非極性	中性	1.9
フェニルアラニン	Phe	F	非極性	中性	2.8
プロリン	Pro	P	非極性	中性	-1.6
セリン	Ser	S	極性	中性	-0.8
スレオニン	Thr	T	極性	中性	-0.7
トリプトファン	Trp	W	非極性	中性	-0.9
チロシン	Tyr	Y	極性	中性	-1.3
バリン	Val	V	非極性	中性	4.2

【００７０】

「相同」配列（例えば、核酸配列）は、例えば、既知の参照配列と少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、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％、または１００％同一であるような、既知の参照配列と同一であるか、または実質的に同様である配列を含む。相同配列は、例えば、オルソログ配列およびパラロガス配列を含み得る。例えば、相同遺伝子は典型的には、種分化事象（オルソログ遺伝子）または遺伝子重複事象（パラロガス遺伝子）のいずれかを介して、共通の祖先ＤＮＡ配列に由来する。「オルソログ」遺伝子には、種分化によって共通の祖先遺伝子から進化した様々な種の遺伝子が含まれる。オルソログは典型的には、進化の過程で同じ機能を保持する。「パラロガス」遺伝子には、ゲノム内の重複によって関連する遺伝子が含まれる。パラログは、進化の過程で新しい機能を進化させることができる。

【００７１】

「インビトロ」という用語は、人工環境、および人工環境（例えば、試験管または単離された細胞もしくは細胞株）内で生じるプロセスまたは反応を含む。「インビボ」という用語は、天然環境（例えば、細胞または生物または身体）、および天然環境内で生じるプロセスまたは反応を含む。「エクスビボ」という用語は、個体の体から取り出された細胞、およびそのような細胞内で起こるプロセスまたは反応を含む。

【００７２】

「レポーター遺伝子」という用語は、内因性または異種プロモーターおよび／またはエンハンサー要素に作動可能に連結されたレポーター遺伝子配列を含む構築物がプロモーターおよび／またはエンハンサー要素の活性化に必要な因子を含む（または含むようにすることができる）細胞に導入される場合、容易かつ定量的にアッセイされる遺伝子産物（典型的には酵素）をコードする配列を有する核酸を指す。レポーター遺伝子の例としては、ベータガラクトシダーゼ（ｌａｃＺ）をコードする遺伝子、細菌のクロランフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ｃａｔ）遺伝子、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、ベータグルクロニダーゼ（ＧＵＳ）をコードする遺伝子、および蛍光タンパク質をコードする遺伝

子が挙げられるが、これらに限定されない。「レポータータンパク質」は、レポーター遺伝子によってコードされるタンパク質を指す。

【００７３】

本明細書で使用される「蛍光レポータータンパク質」という用語は、蛍光に基づいて検出可能なレポータータンパク質を意味し、蛍光は、レポータータンパク質から直接、レポータータンパク質の蛍光発生基質上の活性、または蛍光タグ付き化合物への結合に親和性のあるタンパク質のいずれかからのものであり得る。蛍光タンパク質の例には、緑色蛍光タンパク質（例えば、ＧＦＰ、ＧＦＰ－２、ｔａｇＧＦＰ、ｔｕｒｂｏＧＦＰ、ｅＧＦＰ、Ｅｍｅｒａｌｄ、Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、ＣｏｐＧＦＰ、ＡｃｅＧＦＰ、およびＺｓＧｒｅｅｎｌ）、黄色蛍光タンパク質（例えば、ＹＦＰ、ｅＹＦＰ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、ＰｈｉＹＦＰ、およびＺｓＹｅｌｌｏｗｌ）、青色蛍光タンパク質（例えば、ＢＦＰ、ｅＢＦＰ、ｅＢＦＰ２、Ａｚｕｒｉｔｅ、ｍＫａｌａｍａｌ、ＧＦＰｕｖ、Ｓａｐｐｈｉｒｅ、およびＴ－ｓａｐｐｈｉｒｅ）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ＣＦＰ、ｅＣＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ＣｙＰｅｔ、ＡｍＣｙａｎｌ、およびＭｉｄｏｒｉｉｓｈｉ－Ｃｙａｎ）、赤色蛍光タンパク質（例えば、ＲＦＰ、ｍＫａｔｅ、ｍＫａｔｅ２、ｍＰｌｕｍ、ＤｓＲｅｄ単量体、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲＦＰ１、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ＨｃＲｅｄ－Ｔａｎｄｅｍ、ＨｃＲｅｄｌ、ＡｓＲｅｄ２、ｅｑＦＰ６１１、ｍＲａｓｐｂｅｒｒｙ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、およびＪｒｅｄ）、オレンジ色蛍光タンパク質（例えば、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、およびｔｄＴｏｍａｔｏ）、およびフローサイトメトリー方法により細胞内の存在を検出することができる任意の他の好適な蛍光タンパク質が挙げられる。

【００７４】

１つ以上の列挙された要素を「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」または「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」組成物または方法は、具体的に列挙されていない他の要素を含み得る。例えば、タンパク質を「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」または「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」組成物は、タンパク質を単独で、または他の成分との組み合わせで含有し得る。「から本質的になる」という移行句は、請求項の範囲が、特許請求の範囲に記載された特定の要素、および特許請求された発明の基本的かつ新規の特性に実質的に影響をしない要素を包含すると解釈されることを意味する。したがって、本発明の請求項で使用される場合の「から本質的になる」という用語は、「含む」と同等であると解釈されることを意図するものではない。

【００７５】

「任意の」または「任意に」は、引き続いて記載された事象または状況が起こっても起こらなくてもよく、および説明が、当該事象または状況が起こる場合の例およびそれが起こらない場合の例を含むことを意味する。

【００７６】

値の範囲の指定は、その範囲内の、またはその範囲を定義するすべての整数、およびその範囲内の整数によって定義されるすべての部分範囲を含む。

【００７７】

文脈から別段に明確ではない限り、「約」という用語は、規定の値の測定の標準誤差（例えば、ＳＥＭ）内の値を包含する。

【００７８】

「および／または」という用語は、関連する列挙される項目のうちの１つ以上の任意およびすべての可能な組み合わせ、代替物（「または」）で解釈されるときの組み合わせの欠如を指し、これらを包含する。

【００７９】

「または」という用語は、特定のリストの任意の１つのメンバーを指し、そのリストのメンバーの任意の組み合わせも含む。

【００８０】
冠詞「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」の単数形は、文脈が別段に明確に規定していない限り、複数形の言及を含む。例えば、「タンパク質」または「少なくとも１つのタンパク質」という用語は、それらの混合物を含む複数のタンパク質を含むことができる。
【００８１】
別段の指定のない限り、統計的に有意なとは、ｐ≦０．０５を意味する。
（発明を実施するための形態）
【００８２】
Ｉ．概要
同じ脂質ナノ粒子内にＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ相乗的活性化メディエーターシステム構成要素を一緒に含む脂質ナノ粒子、ならびにかかる脂質ナノ粒子を使用して、インビボおよびエクスビボで標的遺伝子の発現を増加させ、インビボおよびエクスビボで標的遺伝子の発現を増加させる能力についてＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ相乗的活性化メディエーターシステムを評価する方法が提供される。
【００８３】
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９、ＲＮＡガイドＤＮＡエンドヌクレアーゼは、そのガイドＲＮＡの結合部位でＤＮＡの二本鎖切断の形成を触媒する。Ｃａｓ９では、ＲｕｖＣおよびＨＮＨドメインという２つの重要な触媒ドメインが特定されている。ＲｕｖＣドメインは、ガイドＲＮＡと相補的ではないＤＮＡ鎖の切断を開始し、ＨＮＨドメインは、ガイドＲＮＡと相補的なＤＮＡ鎖を切断する。いずれかのドメインを不活性化してＣａｓ９をニッカーゼにするか、または両方のドメインを変異させて触媒性死Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）を形成することがでる。ｄＣａｓ９は鎖切断を引き起こすことはできないが、触媒性死タンパク質を使用して、他のタンパク質を特定のゲノム領域にシャトルすることができる。これはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムの活性化および抑制バリアントの基礎である。
【００８４】
ｄＣａｓ９相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）システムでは、いくつかの活性化ドメインが相互作用して、任意の１つの因子のみによって誘導され得るよりも大きな遺伝子応答を引き起こす。このシステムの最初の反復では、３つのレンチウイルスを導入する必要があった。第１のレンチウイルスには、単純ヘルペスウイルスタンパク質１６の４つのタンデムコピーで構成される転写活性化因子であるＶＰ６４ドメインと直接融合されたｄＣａｓ９が含まれる。ＶＰ６４が転写開始部位の近くに結合するタンパク質と融合すると、それが強力な転写活性化因子として機能する。第２のレンチウイルスは、熱ショック因子１（ＨＳＦ１）および転写因子６５（ｐ６５）の２つの追加の活性化転写因子と融合されるＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）が取り込まれる。ＭＣＰは、ＭＳ２ステムループに自然に結合する。例示的なシステムでは、ＭＣＰは、ＣＲＩＳＰＲ関連ｓｇＲＮＡに操作されたＭＳ２ステムループと相互作用し、それによって結合した転写因子を適切なゲノム位置にシャトルする。第３のレンチウイルスは、ＭＳ２ループ含有ｓｇＲＮＡが導入される。３構成要素システムは、細胞培養においてある程度の柔軟性をもたらすが、この設定は動物モデルではあまり望ましくない。
【００８５】
アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、低い免疫原性を有し、高く予測可能な組み込み部位（１９番染色体上のＡＡＶＳ１）を有するため、一般に遺伝子治療に安全であると考えられている。しかしながら、遺伝子治療ベクターとしてのそれらの安全性を増加させるために、ＷＴ　ＡＡＶの組み込み能力が排除され、これらのベクターが宿主細胞核にエピソームとして残る。宿主に導入されると、ＡＡＶに対する免疫応答は一般に中和抗体に制限され、明確に定義される細胞傷害性応答を伴わない。細胞分裂では、ＡＡＶ　ＤＮＡは細胞分裂によって希釈されるため、治療応答を継続するには、より多くのウイルスを投与する必要がある。これらのその後の曝露は、ウイルスの急速な中和をもたらし、したがって、宿主応答の低下をもたらす可能性がある。これを回避するために、研究者らは連続感染に代替の血清型を使用するが、これは血清型の特異性によって妨げられる。ＡＡＶ系治療法

における別の懸念は、２つの逆方向末端反復間の４．６ｋｂという比較的小さなクローニング能力である。ｄＣａｓ９　ＳＡＭの完全なコード配列は約５．８ｋｂ（プロモーターを含まない）であるため、すべてのＳＡＭ構成要素が単一ＡＡＶから発現できない。

【００８６】

これを回避する１つの方法は、２つ以上のＡＡＶにまたがって要素を発現させ、それらの両方が同じ細胞に感染することを期待することである。しかしながら、これは治療の解決法としては望ましくない。これを念頭に置いて、臨床への橋渡しができるようにこのシステムを最適化することに着手した。

【００８７】

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、内因性エンドサイトーシス機構を利用してＬＤＬ受容体を介して分子を取り込むことにより、安全かつ効果的に核酸を細胞に送達するため、ＡＡＶの使用に代わる魅力的な選択肢となる。製剤の変動は、生物に一度導入されると粒子の安定性および指向性に影響を与え得る。さらに、様々なリガンドの抱合により、ＬＮＰの標的特異性をさらに増加されることができる。この送達方法の１つの注意点は、細胞に送達されたｍＲＮＡが細胞取り込みの４８時間以内に除去される場合があるため、宿主細胞への一時的な影響である。しかしながら、ＬＮＰ送達に対する免疫応答は存在せず、許容される連続投与が可能である。さらに、触媒的に活性なＣａｓ９において、触媒的に活性なＣａｓ９およびｓｇＲＮＡの送達は、物質が細胞から除去された後も継続して伝播することができる標的配列に永続的な変化をもたらす。しかしながら、触媒的に不活性なＣａｓ９（触媒性死Ｃａｓ９またはｄＣａｓ９）による転写活性化は、永続的な遺伝的変化を引き起こさない。加えて、安定化末端修飾を伴うｄＣａｓ９　ＳＡＭガイドＲＮＡの送達へのこの送達システムの適用は、ＲＮＡ合成技術の制限によって制限されてきた。これらの制限は、これらの分子が１１０ヌクレオチドのプラットフォームの最大値よりも大きいため、安定化末端修飾を伴うＳＡＭｓｇＲＮＡの生成が妨げられてきた。

【００８８】

ＬＮＰ製剤化ＳＡＭ　ｇＲＮＡの送達を介した標的遺伝子の上方制御は、著しく短い時間の持続であると予想されたが、驚くべきことに、予想よりもはるかに一時的ではないＬＮＰを介した送達を使用して有意な転写活性化を達成することができた。ＳＡＭ　ｓｇＲＮＡを他のすべてのＳＡＭ構成要素と一緒にＬＮＰ送達することは、（１）ｄＣａｓ９　ＳＡＭ転写産物およびＳＡＭ　ｓｇＲＮＡが同じ細胞に到達することを確認し、（２）製剤／リガンドの取り込みにより、組織特異性の増加を媒介し、（３）免疫応答の恐れを伴わずに生物体を再投与し、（４）より安定した発現レベルを生成できることから、治療用ｄＣａｓ９　ＳＡＭ適用を有意に増強する。要するに、この核酸送達の組み合わせは、安全かつ予想外に安定した様式で、潜在的なｄＣａｓ９適用を大幅に増強させた。

【００８９】

ＩＩ．標的遺伝子の転写または発現を増加させる方法、およびインビボまたはエクスビボで標的遺伝子の発現の転写を増加させるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓの能力を評価するための方法

本明細書に記載の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を使用して標的遺伝子の発現もしくは転写を増加または活性化するため、あるいはインビボもしくはエクスビボで標的遺伝子の発現または転写を増加／活性化する本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ　／　Ｃａｓ相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）システムの能力を評価するための様々な方法が提供される。方法および組成物は、真核生物のゲノム、細胞、もしくは生物における標的遺伝子の転写または発現を増加させるためのものであり得る。かかるＬＮＰは、相乗的活性化メディエーターシステムのすべての構成要素（１つ以上のガイドＲＮＡまたは核酸をコードする、キメラＣａｓタンパク質または核酸をコードする、およびキメラアダプタータンパク質または核酸をコードする）を同じＬＮＰ内に一緒に含む。例えば、かかる方法は、（ａ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質を含む、キメラ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）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする核酸と、（ｂ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したアダプ

タータンパク質を含む、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸と、（ｃ）各ガイドＲＮＡが、キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる１つ以上のアダプター結合要素を含む、１つ以上のガイドＲＮＡまたは１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸であって、１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、Ｃａｓタンパク質と複合体を形成し、それを標的遺伝子内の標的配列に誘導することができ、それにより標的遺伝子の発現を増加させる、１つ以上のガイドＲＮＡまたは１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸と、を細胞または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）へ導入することを含み得、３つの構成要素が、同じＬＮＰ内で一緒に送達される。一例では、キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質（本明細書ではＳＡＭカセットまたはＳＡＭ　ｍＲＮＡと呼ばれる）の両方をコードするマルチシストロン性またはバイシストロン性核酸（例えば、ＤＮＡまたはｍＲＮＡ）が導入される。例えば、キメラＣａｓタンパク質をコードする配列およびキメラアダプタータンパク質をコードする配列は、本明細書の他の場所でより詳細に記載されるように、２Ａタンパク質をコードする配列によって連結され得る。真核生物に導入するとは、構成要素を真核生物に送達して、それらが１つ以上の細胞およびそれらの細胞内の標的遺伝子（複数可）にアクセスできるようにするための任意の方法を指す。同様に、細胞に導入するとは、構成要素を細胞に送達して、それらが細胞内の標的遺伝子（複数可）にアクセスできるようにするための任意の方法を指す。好適なキメラＣａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、およびガイドＲＮＡは、本明細書の他の場所でより詳細に記載される。１つ以上のガイドＲＮＡは、キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質と複合体を形成し、それらを１つ以上の標的遺伝子内の標的配列に誘導し、それによって１つ以上の標的遺伝子の発現を増加させることができる。かかる方法は、１つ以上の標的遺伝子の発現または転写を評価することをさらに含むことができる。

【００９０】

標的遺伝子の発現もしくは転写を増加または活性化するため、あるいはインビボで標的遺伝子の発現または転写を増加／活性化するＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓＳＡＭシステムの能力を評価するために提供される様々な方法は、標的遺伝子の発現もしくは転写を増加または活性化するため、あるいは細胞におけるエクスビボで標的遺伝子の発現または転写を増加／活性化するＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓＳＡＭシステムの能力を評価するためにも使用できる。標的遺伝子の発現もしくは転写を増加または活性化するため、あるいはインビボで標的遺伝子の発現または転写を増加／活性化するＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓＳＡＭシステムの能力を評価するために提供される様々な方法は、標的遺伝子の発現もしくは転写を増加または活性化するため、あるいは細胞におけるインビトロで標的遺伝子の発現または転写を増加／活性化するＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓＳＡＭシステムの能力を評価するためにも使用できる。

【００９１】

いくつかの方法では、細胞または生物は、同じ脂質ナノ粒子を２回以上連続して再投与することができる。例えば、脂質ナノ粒子は、細胞または生物に少なくとも約２、少なくとも約３、少なくとも約４、少なくとも約５、少なくとも約６、少なくとも約７、少なくとも約８、少なくとも約９、または少なくとも約１０回連続して導入することができる。脂質ナノ粒子の投与間の間隔は、任意の好適な期間であり得る。例えば、間隔は、少なくとも約１日、少なくとも約２日、少なくとも約３日、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約７日、少なくとも約１週、少なくとも約２週、少なくとも約３週、少なくとも約４週、少なくとも約５週、少なくとも約６週、少なくとも約７週、少なくとも約８週、少なくとも約１ヶ月、少なくとも約２ヶ月、少なくとも約３ヶ月、または少なくとも約４ヶ月であり得る。例えば、脂質ナノ粒子の投与間の間隔は、少なくとも約１週（例えば、約１週）、少なくとも約２週（例えば、約２週）、少なくとも約４週（例えば、約４週）、約１週～約５週、約１週～約４週、約１週～約３週、約１週～約２週、約２週～約５週、約２週～約４週、約２週～約３週、約３週～約５週、約３週～約４週、または約４週～約５週であり得る。一例では、脂質ナノ粒子の投与間の間隔は

、約２週であり得る。

【００９２】

いくつかの方法では、標的遺伝子の発現は、脂質ナノ粒子の各連続導入後に、少なくともほぼ同じレベルまで増加する。いくつかの方法では、標的遺伝子の発現は、連続再投与によってほぼ同じレベルに維持される。いくつかの方法では、標的遺伝子の発現は、脂質ナノ粒子を再投与した後に、脂質ナノ粒子を単回投与した場合よりも高いレベルに増加する（例えば、脂質ナノ粒子の再投与による標的遺伝子の発現の増加は、再投与なしの標的遺伝子の発現の増加よりも高い）。

【００９３】

任意に、２つ以上のガイドＲＮＡを導入することができ、各々が、標的遺伝子内の異なるガイドＲＮＡ標的配列を標的とするように設計される。例えば、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上のガイドＲＮＡが、単一標的遺伝子を標的とするように設計することができる（例えば、２、３、４、または５つのガイドＲＮＡを使用でき、各々が同じ標的遺伝子内の異なるガイドＲＮＡ標的配列を標的とする）。代替的にまたは追加的に、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上のガイドＲＮＡを導入することができ、各々が、異なる標的遺伝子の異なるガイドＲＮＡ標的配列を標的とするように設計される（例えば、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上の異なる標的遺伝子）（すなわち、多重化）。例えば、２、３、４、または５つのガイドＲＮＡを使用でき、各々が異なる標的遺伝子を標的とする。

【００９４】

キメラＣａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、およびガイドＲＮＡは、本明細書の他の場所に開示されているように、任意の投与経路を介して任意の形態（ガイドＲＮＡの場合はＤＮＡまたはＲＮＡ、キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質の場合はＤＮＡ、ＲＮＡ、またはタンパク質）で細胞または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）に導入することができる。ガイドＲＮＡ、キメラＣａｓタンパク質、およびキメラアダプタータンパク質は、いくつかの方法で組織特異的に導入することができる（例えば、肝臓特異的な様式で導入することができる）。

【００９５】

キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質をコードするガイドＲＮＡならびにｍＲＮＡ（例えば、ＳＡＭ　ｍＲＮＡ）は、本明細書の他の場所でより詳細に記載されるように、５’末端および／または３’末端に１つ以上の安定化末端修飾を含み得る。一例として、ＲＮＡの５’末端および／または３’末端は、１つ以上のホスホロチオエート結合を含むことができる。例えば、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの５’または３’末端の２、３、または４つの末端ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含み得る。別の例として、ＲＮＡの５’末端および／または３’末端は、１つ以上の２’－Ｏ－メチル修飾を含むことができる。例えば、ＲＮＡは、最初の３つの５’および３’末端ＲＮＡ残基に２’－Ｏ－メチル類似体および３’ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、ＲＮＡは、ＲＮＡの５’および／または３’末端（例えば、５’末端）の２、３、または４つの末端ヌクレオチドに２’－Ｏ－メチル修飾を含み得る。例えば、ＷＯ２０１７／１７３０５４Ａ１およびＦｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ．２２（９）：２２２７－２２３５を参照されたく、それらの各々は、すべ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。別の例として、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）は５’末端でキャップすることができ（例えば、＋１リボヌクレオチドがリボースの２’Ｏ位置でメチル化されるキャップ１構造、ポリアデニル化することができ、任意にシュードウリジンで完全に置換するように修飾することもできる（すなわち、すべての標準的なウラシル残基は、ウラシルが窒素－炭素ではなく炭素－炭素結合で結合されるウリジン異性体であるシュードウリジンに置き換えられる）。ガイドＲＮＡおよびｍＲＮＡに対する他の可能な修飾は、本明細書の他の場所でより詳細に記載される。特定の例では、ＲＮＡは、最初の３つの５’および３’末端ＲＮＡ残基に２’－Ｏ－メチル類似体および

３’ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。かかる化学修飾は、例えば、エキソヌクレアーゼからＲＮＡへのより優れた安定性および保護を提供し、それらが修飾されていないＲＮＡよりも長く細胞内に持続することを可能にする。かかる化学修飾はまた、例えば、ＲＮＡを積極的に分解し得るかまたは細胞死につながる免疫カスケードを引き起こし得る自然細胞内免疫応答から保護することもできる。

【００９６】

ガイドＲＮＡは、標的遺伝子の転写を増加させるのに好適な標的遺伝子のいずれの場所も標的とすることができる。例えば、ガイドＲＮＡの標的配列は、プロモーターまたはエンハンサーなどの標的遺伝子内の制御性配列を含むことができる。同様に、標的配列は、遺伝子の転写開始部位に隣接することができる。例えば、標的配列は、転写開始部位の１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０、１２０、１１０、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０、１０、５、もしくは１塩基対以内、転写開始部位の１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０、１２０、１１０、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０、１０、５、もしくは１塩基対上流以内、または転写開始部位の１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０、１２０、１１０、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０、１０、５、もしくは１塩基対下流以内であり得る。特定の例として、標的配列は、標的遺伝子の転写開始部位の約２００塩基対以内、または転写開始部位の約２００塩基対上流以内、および転写開始部位の１塩基対下流以内であり得る。

【００９７】

本明細書に開示される方法は、標的遺伝子の発現を評価することをさらに含むことができる。発現または活性を測定する方法は、修飾される標的遺伝子に依存するであろう。標的遺伝子の転写または発現の増加を評価するための方法は周知である。

【００９８】

例えば、標的遺伝子がＲＮＡまたはタンパク質をコードする遺伝子を含む場合、発現を評価する方法は、コードＲＮＡおよび／またはタンパク質の発現または活性を測定することを含み得る。例えば、コードタンパク質が血清中に放出されたタンパク質である場合、コードタンパク質の血清レベルを測定することができる。ＲＮＡおよびタンパク質のレベルと活性を測定するためのアッセイは周知である。

【００９９】

真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）における標的遺伝子の発現を評価することは、任意の組織または器官由来の任意の細胞型においてであり得る。例えば、標的遺伝子の発現は、同じ組織もしくは器官からの複数の細胞型、または組織もしくは器官内の複数の場所からの細胞で評価することができる。これは、標的組織または臓器内のどの細胞型が標的化されているか、または組織または臓器のどのセクションがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓによって到達されているかについての情報を提供することができる。別の例として、標的遺伝子の発現は、複数の種類の組織または複数の器官で評価することができる。特定の組織または器官が標的にされる方法では、これは、その組織または器官がどれほど効果的に標的にされるか、および他の組織または器官にオフターゲット効果があるかどうかについての情報を提供することができる。

【０１００】

いくつかの方法では、肝臓細胞における標的遺伝子の発現は、例えば、肝臓細胞における標的ゲノム遺伝子座によって発現される分泌タンパク質の血清レベルを評価することによって評価される。標的遺伝子が特定の酵素活性を有するタンパク質をコードする場合、評価は、標的遺伝子の発現および／または標的遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を測定することを含み得る。代替的にまたは追加的に、評価は、真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）から単離された１つ以上の細胞に

おける発現を評価することを含み得る。評価は、真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）から標的器官または組織を単離すること、および標的器官または組織における標的遺伝子の発現を評価することを含み得る。評価はまた、標的器官または組織内の２つ以上の異なる細胞型における標的遺伝子の発現を評価することも含み得る。同様に、評価は、真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）から非標的器官または組織（例えば、２つ以上の非標的器官または組織）を単離すること、および非標的器官または組織における標的遺伝子の発現を評価することを含み得る。

【０１０１】

いくつかの方法では、標的遺伝子は、本明細書の他の場所に記載されているように、疾患関連遺伝子であり得る。一例として、疾患関連遺伝子は、非疾患対照の組織または細胞と比較して、疾患発症組織に由来する細胞において異常なレベルまたは異常な形態で転写または翻訳産物を産生する任意の遺伝子であり得る。それは、異常に高いレベルで発現されるようになる遺伝子であり得、そこでは、改変された発現は、疾患の発生および／または進行と相関する。それは、異常に低いレベルで発現されるようになる遺伝子であり得、そこでは、改変された発現は、疾患の発生および／または進行と相関する。疾患関連遺伝子はまた、疾患の病因に関与する変異または遺伝的バリエーションを所有する遺伝子を指す。転写または翻訳された産物は、既知または未知であり、正常または異常なレベルであり得る。例えば、標的遺伝子は、タンパク質凝集疾患または障害に関連する遺伝子であり得る。特定の例として、標的遺伝子は、タンパク質凝集疾患または障害に関連する遺伝子（例えば、Ｔｔｒ）であり得、方法は、タンパク質凝集疾患または障害をモデル化するためにその標的遺伝子の発現を増加させることを含み得る。いくつかの特定の方法では、標的遺伝子は、Ｔｔｒであり得る。任意に、Ｔｔｒ遺伝子は、病原性変異（例えば、アミロイドーシスを引き起こす変異）または病原性変異の組み合わせを含むことができる。かかる変異の例は、例えば、ＷＯ２０１８／００７８７１に提供されており、すべ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。

【０１０２】

いくつかの方法では、標的遺伝子は、遺伝子の増加した産生が対象において有益である任意の遺伝子（例えば、疾患関連遺伝子）であり得る。例えば、かかる標的遺伝子の低減した転写、かかる標的遺伝子からの遺伝子産物の低減した量、またはかかる標的遺伝子からの遺伝子産物の低減した活性は、標的遺伝子の転写または発現を増加させることが有益であるような疾患に関連し得るか、疾患を増悪し得るか、または疾患を引き起こし得る。かかる遺伝子の一例は、ＯＴＣ（Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ　５００９）である。ＯＴＣ欠乏症（オルニチントランスカルバミラーゼ欠乏症）は、血中の上昇したアンモニアを特徴とし、これは神経毒と見なされ、高タンパク食によってもたらされ得る。これはＸ連鎖性疾患であり、主に男性に影響を及ぼすが、女性はランダムなＸ不活性化によるより軽度な形態を発症し得る。いくつかの変異は、依然としていくつかの野生型ＯＴＣを作製することが可能なため、疾患の重症度の範囲につながる多くの変異が存在する。一例として、ＯＴＣにおける変異スプライス部位は、野生型対象と比較して、約５％のＯＴＣ酵素活性を伴う対象をもたらし得る。これらの患者は、症候性の女性とともに、野生型ＯＴＣの増加した発現が血中の過剰なアンモニアの除去を可能とするため、ＳＡＭ　ｍＲＮＡとＯＴＣのプロモーターを標的とするガイドＲＮＡの送達を通じてＯＴＣの増加した発現から恩恵を受けるであろう。遺伝子の増加した産生が対象において有益である遺伝子の他の例には、胎児ヘモグロビン発現を増加させるためのＨＢＧ１（Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ　３０４７）およびＨＢＧ２（Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ　３０４８）が含まれる。遺伝子の増加した産生が対象において有益である遺伝子の他の例には、ハプロ不全遺伝子が含まれる。ハプロ不全は、遺伝子の１つのコピーが不活性化または削除され、遺伝子の残りの機能的コピーが正常な機能を維持するために必要な遺伝子産物を生成するのに十分でない場合に発生する状況である。言い換えれば、いくつかの遺伝子では、二倍体ゲノムからの１つの機能的コピーの削除または不活性化は、生物の表現型を異常または疾患状態に変化させる。

これらの遺伝子の１つの正常なコピーが正常または野生型表現型を生成するには不十分であるため、これらの遺伝子はハプロ不全と呼ばれる。ハプロ不全遺伝子の１つの機能的コピーの喪失は、神経障害および精神遅滞などの疾患に関連しており、ハプロ不全遺伝子は、疾患および／または薬物療法の副作用に対する人の感受性にも影響を与え得る。ハプロ不全遺伝子および１つの機能的コピーの喪失に関連する、関連する疾患／障害／症候群の例が表２および３に提供される。Ｄａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．１６（１１）：１３５０－１３５７も参照されたく、すべ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。

【表２】

表２．表３からのハプロ不全遺伝子発現の例のサブセット。

遺伝子記号	Entrez 遺伝子ID	障害/症候群
KCNQ4	9132	聴覚消失、常染色体優性非症候性感音難聴２
PINK1	65018	散発的性早期発症パーキンソニズム
TP73	7161	前立腺肥大症および前立腺がん
GLUT1	6513	促進性グルコース輸送体タンパク質1型(GLUT1)欠乏症候群
MYH	4595	肝細胞がんおよび胆管がん
ABCA4	24	シュタルガルト病、網膜色素変性症-19、および加齢性黄斑変性症２
LRH-1	2494	炎症性腸疾患
PAX8	7849	先天性甲状腺機能低下症
SLC40A1	30061	フェロポルチン疾患
BMPR2	659	原発性肺高血圧症
PKD2	5311	常染色体優性多発性嚢胞腎
PIK3R1	5295	インスリン抵抗性
HMGA1	3159	インスリン抵抗性および糖尿病
GCK	2645	インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)、若年発症成人型糖尿病、2型(MODY2)、および新生児持続性高インスリン性低血糖症(PHHI)
ELN	2006	心血管疾患とおよび結合組織異常
GTF3	9569	異常な筋肉易疲労感
GATA3	2625	HDR(副甲状腺機能低下症、聴覚消失、腎異形成)症候群
BUB3	9184	老化に関連する特徴の早期発症に関連する短い寿命
PAX6	5080	眼疾患
FLI1	2313	Paris-Trousseau血小板減少症
HNF1A	6927	低減した血清アポリポタンパク質Mレベル
PKD1	5310	常染色体優性多発性嚢胞腎
MC4R	4160	増加した脂肪症および線形成長
DMPK	1760	筋緊張性ジストロフィーの心疾患
MYH9	4627	血液学的異常

【表３－１】

表３．ハプロ不全遺伝子発現の例。

遺伝子記号	Entrez 遺伝子 ID	障害/症候群	障害/症候群のカテゴリ
TP73	7161	前立腺肥大症および前立腺がん	がん/腫瘍形成
DFFB	1677	乏突起膠腫発達	がん/腫瘍形成
KCNAB2	8514	特徴的な頭蓋顔面奇形、精神遅滞、および 1p36 欠失症候群を伴うてんかん	精神遅滞
CHD5	26038	一染色体性 1p36 症候群	成長および精神遅滞
CAMTA1	23261	腫瘍発達	がん/腫瘍形成
PINK1	65018	散発的性早期発症パーキンソニズム	神経学的障害
SAM68	10657	乳房腫瘍発症および腫瘍多様性	がん/腫瘍形成
KCNQ4	9132	聴覚消失、常染色体優性非症候性感音難聴 2	他
GLUT1	6513	促進性グルコース輸送体タンパク質 1 型(GLUT1)欠乏症候群	他
MYH	4595	肝細胞がんおよび胆管がん	がん/腫瘍形成
FOXE3	2301	ペーテルス奇形に類似した前眼部発育不全	他
HUD	1996	予後不良	他

【表３－２】

遺伝子記号	Entrez 遺伝子 ID	障害/症候群	障害/症候群のカテゴリ
INK4C	1031	髄芽腫形成	がん/腫瘍形成
NFIA	4774	複雑性中枢神経系(CNS)奇形および尿路異常	精神遅滞
CCN1	3491	胚における心室中隔の形成の遅延および持続性一次孔欠損心房中隔欠損症	他
ABCA4	24	シュタルガルト病、網膜色素変性症-19、および加齢性黄斑変性症２	他
WNT2B	7482	精神遅滞、低身長、および眼欠損症	精神遅滞
ADAR	103	遺伝性対側性色素異常症	他
ATP1A2	477	家族性片麻痺性片頭痛２型	他
MPZ	4359	CHN、DSS、CMT1B を含む神経疾患	神経学的障害
MYOC	4653	遺伝性若年発症開放隅角緑内障	他
HRPT2	79577	骨化性線維腫(影響を受けた顎の進行性拡大)	他
LRH-1	2494	炎症性腸疾患	他
IRF6	3664	van der Woude 症候群および膝窩翼状片症候群	他
PROX1	5629	リンパ血管性欠陥、成人発症肥満	他
TP53BP2	7159	腫瘍成長の抑制なし	がん/腫瘍形成
NLRP3	114548	CINCA 症候群	他
ID2	3398	先天性水腎症	他
MYCN	4613	ファインゴールド症候群における低減した脳サイズおよび腸閉鎖	精神遅滞
GCKR	2646	若年発症成人型糖尿病の一形態	他
SPAST	6683	痙性対麻痺４	他
MSH6	2956	ミスマッチ修復の制限	他
FSHR	2492	中枢神経系の変性変化	神経学的障害
SPR	6697	ドパ反応性ジストニア	神経学的障害
PAX8	7849	先天性甲状腺機能低下症	他
SMADIP1	9839	症候群性ヒルシュスプルング病	他
RPRM	56475	腫瘍形成、腫瘍成長の抑制なし	がん/腫瘍形成
SCN1A	6323	乳児重症ミオクロニーてんかん(SMEI)またはドラベ症候群	他
HOXD13	3239	足形成異常	他
COL3A1	1281	エーラス・ダンロス症候群 IV 型、ならびに大動脈および動脈瘤	他
SLC40A1	30061	フェロポルチン疾患	他
SATB2	23314	頭蓋顔面異常形態、口蓋裂	他
SUMO1	7341	非症候性口唇口蓋裂	他
BMPR2	659	原発性肺高血圧症	他
XRCC5	7520	遅延した成長、増加した放射線感受性、上昇した p53 レベル、短縮したテロメア	成長遅滞
PAX3	5077	発達遅延および自閉	成長遅滞/精神遅滞
STK25	10494	オルブライト遺伝性骨ジストロフィー様表現型を伴う軽度から中等度の精神遅滞	精神遅滞
CHL1	10752	3p 欠失(3p-)症候群	不明
SRGAP3	9901	重度の精神遅滞	精神遅滞
VHL	7428	増加した肺がん感受性	がん/腫瘍形成
GHRL	51738	グレリン多形性	他
PPARG	5468	乳房、卵巣、および皮膚の発がんに対する感受性	がん/腫瘍形成
SRG3	6599	プロテアソーム分解	他

【表３－３】

遺伝子記号	Entrez 遺伝子 ID	障害/症候群	障害/症候群のカテゴリ
RASSF1A	11186	様々ながんの病因、腫瘍成長の抑制なし	がん/腫瘍形成
TKT	7086	低減した脂肪組織および女性受精能	他
MITF	4286	ワールデンブルグ症候群２型	他
FOXP1	27086	腫瘍発達	がん/腫瘍形成
ROBO1	6091	失読症に対する素因	精神遅滞
DIRC2	84925	腫瘍成長の発症	がん/腫瘍形成
ATP2C1	27032	オルソ疾患、皮膚障害	他
FOXL2	668	卵巣機能障害に関連する瞼裂狭小症候群	他
ATR	545	ミスマッチ修復欠損	他
SI	6476	スクラーゼ-イソマルターゼ欠乏症、先天性	他
TERC	7012	常染色体優性先天性角化異常症(AD DC)、希少遺伝性骨髄不全症候群	他
SOX2	6657	海馬形成異常およびてんかん	神経学的障害
OPA1	4976	視神経萎縮	他
TFRC	7037	ストレス性赤血球形成および神経学的異常	神経学的障害
FGFR3	2261	低身長症の最も一般的な遺伝的形態である軟骨無形成症を含む、様々な骨格異形成	他
LETM1	3954	ウォルフ・ヒルショルン症候群	精神遅滞
SH3BP2	6452	ウォルフ・ヒルショルン症候群	精神遅滞
MSX1	4487	部分性無歯症	他
RBPJ	3516	胚性致死および動静脈形成異常の形成	他
PHOX2B	8929	ヒルシュスプルング病に対する素因	神経学的障害
ENAM	10117	遺伝性エナメル質形成不全症(歯のエナメル質形成の遺伝的欠陥)	他
MAPK10	5602	レノックス・ガストー型のてんかん性脳症	神経学的障害
PKD2	5311	常染色体優性多発性嚢胞腎	他
SNCA	6622	家族性パーキンソン病	神経学的障害
RIEG	5308	眼の前眼部の形成異常、退行する臍周囲皮膚の不全、および歯の形成不全を特徴とするリーガー症候群(RIEG)	他
ANK2	287	不整脈	他
MAD2L1	4085	最適な造血	他
PLK4	10733	有糸分裂不良および発がん	がん/腫瘍形成
FBXW7	55294	がん(乳房、卵巣)腫瘍発達	がん/腫瘍形成
TERT	7015	先天性角化異常症	他
SEMA5A	9037	異常な脳発達	精神遅滞
GDNF	2668	複雑性ヒト疾患(ヒルシュスプルング病様腸閉塞および早期発症致死)	他
FGF10	2255	頭蓋顔面発達および発達障害	発達異常
PIK3R1	5295	インスリン抵抗性	他
APC	324	家族性大腸腺腫症	がん/腫瘍形成
RAD50	10111	ゲノム不安定性に関連する遺伝性乳がん感受性	がん/腫瘍形成
SMAD5	4090	二次性骨髄形成異常および急性骨髄性白血病	がん/腫瘍形成
EGR1	1958	骨髄性疾患の発達	他
TCOF1	6949	神経堤細胞前駆体の枯渇、トリーチャーコリンズ症候群	発達異常
NPM1	4869	骨髄形成異常および白血病	がん/腫瘍形成
NKX2-5	1482	小頭症および先天性心疾患	他
MSX2	4488	骨成長および外胚葉器官形成における多面発現性異常	他
NSD1	64324	ソトス症候群	精神遅滞
FOXC1	2296	眼球前部房のアクセンフェルト・リーガー異常	他

【表３－４】

遺伝子記号	Entrez 遺伝子 ID	障害/症候群	障害/症候群のカテゴリ
DSP	1832	皮膚脆弱性/毛髪症候群;組織構造の破壊、ケラチノサイト増殖の完全性および変化	他
EEF1E1	9521	腫瘍成長の抑制なし	がん/腫瘍形成
TNXA	7146	エーラス・ダンロス症候群	他
TNX	7148	過剰可動性型エーラス・ダンロス症候群における弾性線維異常	他
HMGA1	3159	インスリン抵抗性および糖尿病	他
RUNX2	860	鎖骨頭蓋異形成	発達異常
CD2AP	23607	糸球体疾患感受性	他
ELOVL4	6785	欠損性皮膚透過性バリア機能および新生児致死	他
NT5E	4907	神経障害標的エステラーゼ欠乏	神経学的障害
SIM1	6492	メラノコルチン媒介性食欲不振および室傍核ニューロンの活性化の障害	他
COL10A1	1300	シュミット型骨幹端軟骨異形成症および日本型脊椎骨幹端異形成	他
PARK2	5071	パーキンソン病 2	神経学的障害
TWIST1	7291	冠状骨癒合症	発達異常
GLI3	2737	グレイグ尖頭多合指症候群およびパリスター・ホール症候群	発達異常
GCK	2645	インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)、若年発症成人型糖尿病、2 型(MODY2)、および新生児持続性高インスリン性低血糖症(PHHI)	他
FKBP6	8468	ウィリアムズ・ビューレン症候群	精神遅滞
ELN	2006	心血管疾患とおよび結合組織異常	他
LIMK1	3984	ウィリアムズ症候群(WS)、神経発達障害	精神遅滞
RFC2	5982	ウィリアムズ症候群における成長障害および発達障害	成長遅滞
GTF3	9569	異常な筋肉易疲労感	他
GTF2I	2969	ウィリアムズ・ビューレン症候群	精神遅滞
NCF1	653361	常染色体性劣性慢性肉芽腫症	他
KRIT1	889	大脳性海綿状形成異常(異常に拡大した毛細血管を特徴とする血管形成異常)	他
COL1A2	1278	再発性関節亜脱臼または部分性無歯症などのわずかな症状	他
SHFM1	7979	重度の精神遅滞、低身長、小頭症、聴覚消失	精神遅滞
RELN	5649	認知性障害および海馬シナプス機能の改変	他
FOXP2	93986	発話および言語障害ならびに口腔統合運動障害	精神遅滞
CAV1	857	17β-エストラジオール刺激性乳房腫瘍形成	がん/腫瘍形成
ST7	7982	腫瘍成長の抑制なし	がん/腫瘍形成
BRAF	673	心臓・顔・皮膚(CFC)症候群	成長および精神遅滞
SHH	6469	全前脳症、仙骨異常、および内臓疑形	他
HLXB9	3110	仙骨前腫瘤、仙椎無形成、および肛門直腸形成異常を含む仙骨無発生症候群	他
GATA4	2626	先天性心疾患	他
NKX3-1	4824	前立腺がん	がん/腫瘍形成
FGFR1	2260	ファイファー症候群、ジャクソン-ワイス症候群、アントレー-ビクスラー症候群、骨空洞性骨異形成症、および常染色体優性カルマン症候群 2	他
CHD7	55636	チャージ症候群	成長遅滞
CSN5	10987	TRC8 遺伝性腎臓がん	がん/腫瘍形成

【表３－５】

遺伝子記号	Entrez 遺伝子 ID	障害/症候群	障害/症候群のカテゴリ
EYA1	2138	鰓弓耳腎異形成症候群、鰓耳腎症候群、ならびに先天性白内障および眼性前側異常の散発的な症例	他
TRPS1	7227	優性遺伝性毛髪鼻指骨(TRP)症候群	成長遅滞
DMRT1	1761	男性の精巣発達および女性の女性化の失敗	他
DMRT2	10655	核型男性における精巣形成の欠陥および核型女性における卵巣機能の障害	他
MLLT3	4300	神経運動発達遅延、小脳性運動失調、およびてんかん	神経学的障害
ARF	1029	急性骨髄性白血病	がん/腫瘍形成
CDKN2B	1030	皮膚悪性黒色腫および神経系腫瘍の症候群	がん/腫瘍形成
BAG1	573	肺腫瘍形成	腫瘍形成
PAX5	5079	リンパ球性リンパ腫の病因	がん/腫瘍形成
GCNT1	2650	細胞死に耐性のあるTリンパ腫細胞	他
ROR2	4920	基底細胞母斑症候群(BCNS)	がん/腫瘍形成
PTCH1	5727	原始神経外胚葉性腫瘍形成	がん/腫瘍形成
NR5A1	2516	障害性精巣発達、性転換、および副腎不全	他
LMX1B	4010	爪膝蓋骨症候群	発達異常
ENG	2022	遺伝性出血性毛細血管拡張症1型	発達異常
TSC1	7248	膀胱の移行上皮がん	がん/腫瘍形成
COL5A1	1289	角膜および眼瞼の構造異常	発達異常
NOTCH1	4851	大動脈弁疾患(心臓形成異常および大動脈弁石灰化)	他
EHMT1	79813	9q34サブテロメア欠失症候群	精神遅滞
KLF6	1316	細胞成長調節不全および腫瘍形成	がん/腫瘍形成
GATA3	2625	HDR(副甲状腺機能低下症、聴覚消失、腎異形成)症候群	他
ANX7	310	腫瘍形成	がん/腫瘍形成
PTEN	5728	前立腺がん高悪性度前立腺上皮内腫瘍	がん/腫瘍形成
PAX2	5076	腎臓性-コロボーマ症候群	他
FGF8	2253	いくつかのヒト頭蓋顔面障害	他
BUB3	9184	老化に関連する特徴の早期発症に関連する短い寿命	他
CDKN1C	1028	ベックウィズ・ウィーデマン症候群	がん/腫瘍形成
NUP98	4928	有糸分裂におけるセキュリンの破壊	他
PAX6	5080	眼疾患	他
WT1	7490	先天性泌尿生殖器(GU)異常ならびに/または両側性疾患および腫瘍形成	がん/腫瘍形成
EXT2	2132	複数の外骨腫のII型形態	発達異常
ALX4	60529	脛骨形成不全、下肢鏡像多指症、指短縮、頭蓋顔面異形症、および生殖器形成不全	他
FEN1	2237	神経筋および神経変性疾患	精神遅滞
SF1	7536	軽度の生殖腺形成不全および障害性アンドロゲン化	他
FGF3	2248	耳歯症候群	他
FZD4	8322	成長遅滞、顔面異常、滲出性硝子体網膜症(EVR)、口蓋裂、軽度の手指異常を含む、複数の異常を伴う複雑性染色体再編成	成長遅滞
ATM	472	がんの高い発生率	がん/腫瘍形成
H2AX	3014	ゲノム不安定性、様々な腫瘍の早期発症	がん/腫瘍形成
FLI1	2313	Paris-Trousseau血小板減少症	他
NFRKB	4798	細胞性免疫不全、汎血球減少症、形成異常	他
PHB2	11331	増強されたエストロゲン受容体機能	他
ETV6	2120	小児性プレB急性リンパ芽球性白血病	がん/腫瘍形成
CDKN1B	1027	ErbB2誘導性乳房腫瘍成長	がん/腫瘍形成

【表３－６】

遺伝子記号	Entrez 遺伝子 ID	障害/症候群	障害/症候群のカテゴリ
COL2A1	1280	スティックラー症候群	他
KRT5	3852	単純性表皮水疱症	他
MYF6	4618	ミオパチーおよびベッカー型筋ジストロフィーの重症経過	他
IGF1	3479	子宮内および出生後成長のわずかな阻害	他
SERCA2	488	結腸および肺がん	がん/腫瘍形成
TBX5	6910	ホルト・オーラム症候群における伝導系形態および機能の成熟障害	他
TBX3	6926	尺骨・乳房症候群	他
HNF1A	6927	低減した血清アポリポタンパク質 M レベル	他
BRCA2	675	乳がん、卵巣がん、膵臓がん、および他のがんに対する素因	がん/腫瘍形成
FKHR	2308	肺胞性横紋筋肉腫	他
RB1	5925	中期細胞遺伝学的異常	他
ZIC2	7546	神経障害、行動性異常	精神遅滞
LIG4	3981	LIG4 症候群、非リンパ性腫瘍形成	がん/腫瘍形成
COCH	1690	不明	不明
NPAS3	64067	統合失調症	神経学的障害
NKX2-1	7080	舞踏アテトーゼ、甲状腺機能低下症、肺性変化、神経学的表現型および続発性高チロトロピン血症、ならびに転写因子欠陥による疾患	神経学的障害
PAX9	5083	後歯非形成	他
BMP4	652	無眼球症、下垂体低形成、および耳異常を含む、隣接遺伝子症候群	他
GCH1	2643	悪性高フェニルアラニン血症およびドパ反応性ジストニア	他
SIX6	4990	両側性無眼球症および下垂体異常	他
RAD51B	5890	中心体断片化および異数性	他
BCL11B	64919	リンパ腫形成および胸腺細胞発達の抑制	他
SPRED1	161742	神経線維腫症 1 型様症候群	がん/腫瘍形成
BUBR1	701	増強された腫瘍発達	がん/腫瘍形成
DLL4	54567	動脈性および血管性発達における主要な欠損による胚性致死	他
FBN1	2200	マルファン症候群、単離性水晶体転位、常染色体優性ヴァイユ・マルケザーニ症候群、MASS 症候群、およびシュプリンツェン・ゴールドバーグ頭蓋骨癒合症症候群	他
ALDH1A2	8854	促進性後部器官発達、および二分脊椎を阻止する	他
TPM1	7168	３型家族性肥大型心筋症	他
P450SCC	1583	46、XY 性転換、および副腎不全	他
BLM	641	常染色体劣性疾患ブルーム症候群	精神遅滞
COUP-TFII	7026	いくつかの形成異常、出生前および出生後成長遅滞および発達	成長遅滞
SOX8	30812	ATR-16 症候群に見られる精神遅滞	精神遅滞
TSC2	7249	差異性がん感受性	がん/腫瘍形成
PKD1	5310	常染色体優性多発性嚢胞腎	他
CBP	1387	ルビンシュタイン・テイビ症候群	精神遅滞
SOCS1	8651	重度の肝臓線維症および肝炎誘導性発がん	がん/腫瘍形成
PRM2	5620	不妊	他
PRM1	5619	不妊	他
ABCC6	368	弾性線維性仮性黄色腫	他

【表３－７】

遺伝子記号	Entrez 遺伝子 ID	障害/症候群	障害/症候群のカテゴリ
ERAF	51327	わずかな赤血球表現型	他
SALL1	6299	タウンズブロックス症候群	発達異常/精神遅滞
CBFB	865	遅延した頭蓋骨化、口蓋裂、先天性心異常、および摂食障害	他
CTCF	10664	ウィルムス腫瘍におけるインスリン様成長因子 II のインプリンティング消失	がん/腫瘍形成
WWOX	51741	腫瘍発達の開始	がん/腫瘍形成
FOXF1	2294	一次肺芽の形成および分岐の欠損	他
FOXC2	2303	リンパ性／眼性障害リンパ浮腫-睫毛重生	他
YWHAE	7531	小細胞肺がんの病因	がん/腫瘍形成
HIC1	3090	ミラー・ディッカー症候群	成長および精神遅滞
LIS1	5048	成人歯状回における異常な細胞増殖、遊走、および分化	がん/腫瘍形成
P53	7157	男性口腔扁平上皮がん	がん/腫瘍形成
PMP22	5376	圧力麻痺の傾向を伴う遺伝性ニューロパチー	神経学的障害
COPS3	8533	スミス・マゲニス症候群におけるメラトニンの概日リズム異常	他
RAI1	10743	スミス・マゲニス症候群	精神遅滞
TOP3A	7156	スミス・マゲニス症候群	精神遅滞
SHMT1	6470	スミス・マゲニス症候群	精神遅滞
RNF135	84282	異常増殖を含む表現型異常	他
NF1	4763	神経線維腫症 1 型	精神遅滞
SUZ12	23512	体質性 NF1 微小欠失における精神障害	精神遅滞
MEL-18	7703	乳房発がん	がん/腫瘍形成
KLHL10	317719	破壊された精子完成	他
STAT5B	6777	IL-7 誘導性死亡および疾患発達の著しい回復	他
STAT5A	6776	IL-7 誘導性死亡および疾患発達の著しい回復	他
BECN1	8678	オートファジー機能、および腫瘍抑制機能	がん/腫瘍形成
BRCA1	672	短縮した寿命および卵巣腫瘍形成	がん/腫瘍形成
PGRN	2896	神経変性	精神遅滞
MAPT	4137	神経細胞死、アルツハイマー病、ピック病、前頭側頭型認知症、皮質基底変性、進行性核上性麻痺などの神経変性疾患	神経学的障害
CSH1	1442	シルバーラッセル症候群	他
POLG2	11232	mtDNA 欠失は、筋線維の COX 欠損を引き起こし、臨床表現型をもたらす	他
PRKAR1A	5573	カーニー複合、家族性多発性内分泌症候群	がん/腫瘍形成
SOX9	6662	骨格異形成	がん/腫瘍形成
NHERF1	9368	乳房腫瘍	がん/腫瘍形成
FSCN2	25794	光受容体変性、常染色体優性網膜色素変性症	他
DSG1	1828	表皮完全性の疾患	他
DSG2	1829	不整脈源性右室異形成	他
TCF4	6925	ピット・ホプキンス症候群、症候群性精神障害	精神遅滞
FECH	2235	プロトポルフィリン症	他
MC4R	4160	増加した脂肪症および線形成長	他
GALR1	2587	非制御性増殖および腫瘍性形質転換	他
SALL3	27164	18q 欠失症候群	他
LKB1	6794	ポイツ・ジェガーズ症候群	がん/腫瘍形成

【表３－８】

遺伝子記号	Entrez 遺伝子 ID	障害/症候群	障害/症候群のカテゴリ
PNPLA6	10908	有機リン誘導多動性および毒性	他
RYR1	6261	悪性高熱症感受性、中枢性コア疾患、および外眼筋麻痺を伴うミニコアミオパチー	他
TGFB1	7040	侵襲性膵管腺がん	がん/腫瘍形成
RPS19	6223	ダイアモンド・ブラックファン貧血	他
DMPK	1760	筋緊張性ジストロフィーの心疾患	他
CRX	1406	光受容体変性、レーバー先天性黒内障 III 型、および常染色体優性錐体桿体ジストロフィー2	他
PRPF31	26121	低減した浸透度を伴う網膜色素変性	他
JAG1	182	アラジール症候群	精神遅滞
PAX1	5075	クリッペル・ファイル症候群	他
GDF5	8200	多発性骨癒合症候群	精神遅滞
HNF4A	3172	単一遺伝子常染色体優性インスリン非依存性糖尿病 I 型	他
SALL4	57167	オキヒロ症候群	発達異常
MC3R	4159	肥満への感受性	他
RAE1	8480	姉妹染色分体の時期早期分離、重度の異数性およびセキュリンの尚早な分解	他
GNAS	2778	上皮組織における下流標的の低減した活性化	他
EDN3	1908	ヒルシュスプルング病	他
KCNQ2	3785	てんかん感受性	神経学的障害
SOX18	54345	精神遅滞	精神遅滞
SLC5A3	6526	脳イノシトール欠乏	他
RUNX1	861	8p11 骨髄増殖症候群	他
DYRK1A	1859	神経学的欠損、発達遅延	成長遅滞/精神遅滞
COL6A1	1291	常染色体優性障害、ベツレムミオパチー	神経学的障害
PRODH	5625	22q11 削除症候群	精神遅滞
DGCR2	9993	ディジョージ症候群	精神遅滞
HIRA	7290	ディジョージ症候群(頭蓋顔面、心臓性および胸腺性形成異常)	精神遅滞
TBX1	6899	22q11 欠失症候群および統合失調症	精神遅滞
COMT	1312	22q11.2 欠失症候群	精神遅滞
RTN4R	65078	統合失調症感受性(統合失調感情性障害は、ディジョージ/口蓋心臓顔面症候群を有する患者における一般的な特徴である)	他
PCQAP	51586	ディジョージ症候群	他
LZTR1	8216	ディジョージ症候群	精神遅滞
INI1	6598	下垂体腫瘍形成	がん/腫瘍形成
MYH9	4627	血液学的異常	他
SOX10	6663	ワールデンブルグ/ヒルシュスプルング病の病因	他
FBLN1	2192	肢形成異常	他
PPARA	5465	前立腺がん	がん/腫瘍形成
PROSAP2	85358	重度の表出性言語発達遅滞、軽度の精神遅滞、筋緊張低下、関節弛緩、長頭症、および軽度の顔面異形症を特徴とする終末 22q13.3 欠失症候群	精神遅滞
SHOX	6473	先天性形態の成長不全、「特発性」低身長の病因、ならびにレリーワイル、ランガー、ターナー症候群における成長障害および骨格異常	成長遅滞
P2RY8	286530	精神性遅滞型男性	精神遅滞
NLGN4X	57502	自閉症およびアスペルガー症候群	神経学的障害

【表３－９】

遺伝子記号	Entrez 遺伝子 ID	障害/症候群	障害/症候群のカテゴリ
TRAPPC2	6399	脊椎骨端異形成	がん/腫瘍形成
RPS4X	6191	不明	不明
CSF2RA	1438	成長不全	成長遅滞

【０１０３】

標的遺伝子の発現の任意の統計的に有意な増加が達成され得る。例えば、標的遺伝子の

発現の増加は、対照の真核生物のゲノム、細胞、または生物と比較して、少なくとも約０．５倍、少なくとも約１倍、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、または少なくとも約２０倍高くなり得る（例えば、ＲＮＡレベルまたはタンパク質レベルで測定される場合）。同様に、標的遺伝子の発現の増加の持続時間は、任意の好適な時間であり得る。例えば、標的遺伝子の発現の増加の持続時間は、少なくとも約１日、少なくとも約２日、少なくとも約３日、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約１週、少なくとも約２週、少なくとも約３週、少なくとも約４週、少なくとも約１ヶ月、または少なくとも約２ヶ月であり得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）システムの導入後１日、２日、３日、４日、５日、６日、１週、２週、３週、４週、または１ヶ月での標的遺伝子の発現の増加は、対照の真核生物のゲノム、細胞、または生物と比較して、少なくとも約０．５倍、少なくとも約１倍、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、または少なくとも約２０倍高くなり得る。一例では、増加は、０．５ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは１ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは２ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰの用量で、１、２、または３週後に少なくとも約２倍である。別の例では、増加は、０．５ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは１ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは２ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰの用量で、１、２、または３週後に少なくとも約３倍である。別の例では、増加は、０．５ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは１ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは２ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰの用量で、１、２、または３週後に少なくとも約４倍である。別の例では、増加は、０．５ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは１ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは２ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰの用量で、１、２、または３週後に少なくとも約５倍である。別の例では、増加は、０．５ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは１ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは２ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰの用量で、１、２、または３週後に少なくとも約６倍である。別の例では、増加は、０．５ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは１ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは２ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰの用量で、１、２、または３週後に少なくとも約７倍である。別の例では、増加は、０．５ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは１ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは２ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰの用量で、１、２、または３週後に少なくとも約８倍である。別の例では、増加は、０．５ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは１ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは２ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰの用量で、１、２、または３週後に少なくとも約９倍である。別の例では、増加は、０．５ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは１ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰまたは２ｍｇ／ｋｇ　ＬＮＰの用量で、１、２、または３週後に少なくとも約１０倍である。標的遺伝子の発現の増加は、少なくとも約１日、少なくとも約２日、少なくとも約３日、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約１週、少なくとも約２週、少なくとも約３週、少なくとも約４週、またはそれ以上、ほぼ一定のレベルで（すなわち、時間とともに減少するパターンを示さずに）持続することができる。

【０１０４】

方法は、真核生物のゲノム、細胞、もしくは生物における標的遺伝子の転写または発現を増加させるためのものであり得る。ゲノム、細胞、または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）は、オスまたはメスであり得る。いくつかの方法では、標的遺伝子の転写または発現は、それを必要とする対象（例えば、生物または動物または哺乳動物、例えばヒト）において増加する。例えば、それを必要とする対象は、標的遺伝子の転写または発現を増加させること、標的遺伝子の遺伝子産物の量を増加させること、または標的遺伝子の遺伝子産物の活性を増加させることが有益であるような、標的遺伝子の低減した転写または発現、標的遺伝子の遺伝子産物の低減した量、または標的遺伝子による遺伝子産物の低減した活性に関連する、それによって増悪する、もしくはそれによって引き起こされる疾患、障害、または症候群を有する対象であり得る。標的遺伝子は、疾患、障害、または症候群を有しない対照対象と比較して、対象において過少発現または低レベルで発現され得る。例えば、標的遺伝子の転写または発現を増加させること、標的遺伝子の遺伝子産物の量を増加させること、または標的遺伝子の遺伝子産物の

活性を増加させることは、対象の疾患、障害、または症候群を治療することができる。かかる疾患、障害、または症候群の例には、ハプロ不全に関連する疾患、障害、または症候群が含まれる。ハプロ不全遺伝子および転写または発現の増加が有益である他の遺伝子の例は、表２および３ならびに本明細書の他の場所に提供される。

【０１０５】

本明細書で提供される真核生物のゲノム、細胞、または生物は、例えば、多細胞真核生物、非ヒト真核生物、動物、非ヒト動物、哺乳動物、非ヒト哺乳動物、ヒト、非ヒト、齧歯動物、マウス、もしくはラットのゲノム、細胞、または生物であり得る。真核細胞には、例えば、真菌細胞（例えば、酵母）、植物細胞、動物細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、およびヒト細胞が含まれる。「動物」という用語には、哺乳動物、魚類、鳥類が含まれる。哺乳動物には、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、サル、類人猿、ネコ、イヌ、ウマ、雄ウシ、シカ、バイソン、ヒツジ、ウサギ、齧歯動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、およびモルモット）、および家畜（例えば、ウシおよび去勢牛などのウシ種、ヒツジおよびヤギなどのヒツジ種、ならびにブタおよびイノシシなどのブタ種）が含まれる。鳥類には、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、ダチョウ、ガチョウ、およびアヒルが含まれる。家畜および農業用動物も含まれる。「非ヒト動物」という用語は、ヒトを除外する。

【０１０６】

細胞はまた、任意の型の未分化または分化状態であり得る。例えば、細胞は、全能性細胞、多能性細胞（例えば、ヒト多能性細胞、またはマウス胚性幹（ＥＳ）細胞またはラットＥＳ細胞などの非ヒト多能性細胞）、または非多能性細胞であり得る。全能性細胞には、任意の細胞型を生じさせることができる未分化細胞が含まれ、多能性細胞には、複数の分化細胞型に発達する能力を有する未分化細胞が含まれる。かかる多能性および／または全能性細胞は、例えば、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞などのＥＳ細胞またはＥＳ様細胞であり得る。ＥＳ細胞には、胚への導入時に発達中の胚の任意の組織に寄与することができる胚由来の全能性または多能性細胞が含まれる。ＥＳ細胞は、胚盤胞の内部細胞塊に由来するものであり得、３つの脊椎動物胚葉（内胚葉、外胚葉、および中胚葉）のうちのいずれかの細胞に分化することができる。

【０１０７】

ヒト多能性細胞の例には、ヒトＥＳ細胞、ヒト成体幹細胞、発達制限されたヒト前駆細胞、ならびにプライム型ヒトｉＰＳ細胞およびナイーブ型ヒトｉＰＳ細胞などのヒト人工多能性幹（ｉＰＳ）細胞が含まれる。人工多能性幹細胞には、分化した成人細胞から直接誘導することができる多能性幹細胞が含まれる。ヒトｉＰＳ細胞は、例えば、Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘファミリー転写因子（例えば、Ｓｏｘ１、Ｓｏｘ２、Ｓｏｘ３、Ｓｏｘ１５）、Ｍｙｃファミリー転写因子（例えば、ｃ－Ｍｙｃ、ｌ－Ｍｙｃ、ｎ－Ｍｙｃ）、クルッペル様ファミリー（ＫＬＦ）転写因子（例えば、ＫＬＦ１、ＫＬＦ２、ＫＬＦ４、ＫＬＦ５）、ならびに／またはＮＡＮＯＧ、ＬＩＮ２８、および／もしくはＧｌｉｓ１などの関連転写因子を含んでもよい、リプログラミング因子の特定の一群を細胞に導入することによって発生させることができる。ヒトｉＰＳ細胞は、例えば、ｍｉＲＮＡ、転写因子の作用を模倣する小分子、または系統指定子を使用して生成することもできる。ヒトｉＰＳ細胞は、３種類の脊椎動物胚葉、例えば、内胚葉、外胚葉、または内胚葉のうちいずれかの細胞に分化する能力によって特徴付けられる。ヒトｉＰＳ細胞はまた、好適なインビトロ培養条件下で無限に増殖する能力によっても特徴付けられる。例えば、Ｔａｋａｈａｓｈｉ ａｎｄ Ｙａｍａｎａｋａ（２００６）Ｃｅｌｌ １２６：６６３－６７６を参照されたく、すべ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。プライム型ヒトＥＳ細胞およびプライム型ヒトｉＰＳ細胞は、着床後胚盤葉上層細胞の特徴に類似した特徴を発現し、系統仕様および分化に関与する細胞を含む。ナイーブ型ヒトＥＳ細胞およびナイーブ型ヒトｉＰＳ細胞は、着床前胚の内部細胞塊のＥＳ細胞の特徴に類似した特徴を発現し、系統仕様に関与しない細胞を含む。例えば、Ｎｉｃｈｏｌｓ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ（２００９）Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ４：４８７－４９２を参照された

く、すべ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。

【０１０８】

本明細書で提供される細胞はまた、生殖細胞（例えば、精子または卵母細胞）であり得る。細胞は、有糸分裂能力のある細胞または有糸分裂的に不活性な細胞、減数分裂能力のある細胞または減数分裂的に不活性な細胞であり得る。同様に、細胞はまた、初代体細胞または初代体細胞ではない細胞であり得る。体細胞には、配偶子、生殖細胞、配偶子細胞、または未分化幹細胞ではない任意の細胞が含まれる。例えば、細胞は、肝細胞、腎臓細胞、造血細胞、内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞、間葉系細胞、ケラチノサイト、血液細胞、メラノサイト、単球、単核細胞、単球前駆細胞、Ｂ細胞、赤芽球－巨核球細胞、好酸球、マクロファージ、Ｔ細胞、膵島ベータ細胞、外分泌細胞、膵臓前駆細胞、内分泌前駆細胞、脂肪細胞、前脂肪細胞、ニューロン、グリア細胞、神経幹細胞、ニューロン、肝芽細胞、肝細胞、心筋細胞、骨格筋芽細胞、平滑筋細胞、管細胞、腺房細胞、アルファ細胞、ベータ細胞、デルタ細胞、ＰＰ細胞、胆管細胞、白色または褐色脂肪細胞、または眼細胞（例えば、小柱網目細胞、網膜色素上皮細胞、網膜微小血管内皮細胞、網膜周囲細胞、結膜上皮細胞、結膜線維芽細胞、虹彩色素上皮細胞、角膜細胞、水晶体上皮細胞、非色素繊毛上皮細胞、眼脈絡膜線維芽細胞、光受容細胞、神経節細胞、双極細胞、水平細胞、またはアマクリン細胞）であり得る。例えば、細胞は、肝芽細胞または肝細胞などの肝細胞であり得る。

【０１０９】

本明細書で提供される好適な細胞には、初代細胞も含まれる。初代細胞には、生物、器官、または組織から直接単離された細胞または細胞の培養物が含まれる。初代細胞には、形質転換も不死化もされていない細胞が含まれる。それらには、以前に組織培養で継代されていなかったか、もしくは以前に組織培養で継代されていたが、組織培養で無期限に継代することができない生物、臓器、または組織から得られた細胞が含まれる。そのような細胞は、従来の技術によって単離することができ、例えば、体細胞、造血細胞、内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞、間葉系細胞、ケラチノサイト、メラノサイト、単球、単核細胞、脂肪細胞、脂肪前駆細胞、ニューロン、グリア細胞、肝細胞、骨格筋芽細胞、および平滑筋細胞が含まれる。例えば、初代細胞は、結合組織、筋肉組織、神経系組織、または上皮組織に由来し得る。かかる細胞は、従来の技術によって単離することができ、例えば、肝細胞を含む。

【０１１０】

本明細書で提供される他の好適な細胞には、不死化細胞が含まれる。不死化細胞には、通常は無限に増殖することはないが、変異または改変に起因して、正常な細胞老化を回避し、代わりに分裂を続けることができる多細胞生物からの細胞も含まれる。そのような変異または改変は、自然に発生し得るか、または意図的に誘導され得る。不死化細胞の例には、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ヒト胎児腎臓細胞（例えば、ＨＥＫ２９３細胞または２９３Ｔ細胞）、およびマウス胎児線維芽細胞（例えば、３Ｔ３細胞）が含まれる。不死化細胞株の特定の例は、ＨｅｐＧ２ヒト肝がん細胞株である。多くの種類の不死化細胞が周知である。不死化細胞または初代細胞には、典型的には、培養または組換えの遺伝子またはタンパク質の発現に使用される細胞が含まれる。

【０１１１】

本明細書で提供される細胞はまた、１細胞期胚（すなわち、受精卵母細胞または接合子）を含む。かかる１細胞期胚（例えば、齧歯動物１細胞期胚）は、任意の遺伝的背景（例えば、マウスの場合は、ＢＡＬＢ／ｃ、Ｃ５７ＢＬ／６、１２９、またはそれらの組み合わせ）に由来することができ、新鮮または凍結することができ、自然交配または体外受精に由来することができる。

【０１１２】

本明細書で提供される細胞は、正常で健康な細胞であってよいか、または罹患した細胞または変異を有する細胞であってよい。

【０１１３】

真核生物のゲノム、細胞、または生物は、任意の遺伝的背景に由来し得る。例えば、好適なマウスは、１２９系統、Ｃ５７ＢＬ／６系統、１２９とＣ５７ＢＬ／６の雑種、ＢＡＬＢ／ｃ系統、またはスイスウェブスター系統からのものであり得る。１２９系統の例には、１２９Ｐ１、１２９Ｐ２、１２９Ｐ３、１２９Ｘ１、１２９Ｓ１（例えば、１２９Ｓ１／ＳＶ、１２９Ｓ１／Ｓｖｌｍ）、１２９Ｓ２、１２９Ｓ４、１２９Ｓ５、１２９Ｓ９／ＳｖＥｖＨ、１２９Ｓ６（１２９／ＳｖＥｖＴａｃ）、１２９Ｓ７、１２９Ｓ８、１２９Ｔ１、および１２９Ｔ２が含まれる。例えば、すべ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、Ｆｅｓｔｉｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｍａｍｍ．Ｇｅｎｏｍｅ １０（８）：８３６を参照されたい。Ｃ５７ＢＬ系統の例には、Ｃ５７ＢＬ／Ａ、Ｃ５７ＢＬ／Ａｎ、Ｃ５７ＢＬ／ＧｒＦａ、Ｃ５７ＢＬ／Ｋａｌ＿ｗＮ、Ｃ５７ＢＬ／６、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ、Ｃ５７ＢＬ／６ＢｙＪ、Ｃ５７ＢＬ／６ＮＪ、Ｃ５７ＢＬ／１０、Ｃ５７ＢＬ／１０ＳｃＳｎ、Ｃ５７ＢＬ／１０Ｃｒ、およびＣ５７ＢＬ／Ｏｌａが含まれる。好適なマウスはまた、前述の１２９系統と前述のＣ５７ＢＬ／６系統の雑種（例えば、５０％１２９と５０％Ｃ５７ＢＬ／６）からのものであり得る。同様に、好適なマウスは、前述の１２９系統の雑種または前述のＢＬ／６系統の雑種（例えば、１２９Ｓ６（１２９／ＳｖＥｖＴａｃ）系統）からのものであり得る。

【０１１４】

同様に、ラットは、例えば、ＡＣＩラット系統、Ｄａｒｋ Ａｇｏｕｔｉ（ＤＡ）ラット系統、Ｗｉｓｔａｒラット系統、ＬＥＡラット系統、Ｓｐｒａｇｕｅ Ｄａｗｌｅｙ（ＳＤ）ラット系統、またはフィッシャーＦ３４４もしくはフィッシャーＦ６などのフィッシャーラット系統からのものであり得る。ラットはまた、上述の２つ以上の系統の雑種に由来する系統から得ることができる。例えば、好適なラットは、ＤＡ系統またはＡＣＩ系統からのものであり得る。ＡＣＩラット系統は、白い腹および足、ならびにＲＴ１^{av1}ハプロタイプを有する黒いアグーチを持っていることを特徴としている。このような系統は、Ｈａｒｌａｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓを含む様々な供給源から入手できる。Ｄａｒｋ Ａｇｏｕｔｉ（ＤＡ）ラット系統は、アグーチコートおよびＲＴ１^{av1}ハプロタイプを有することを特徴としている。かかるラットは、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒおよびハーラン Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓを含む様々な供給源から入手できる。いくつかの事例では、好適なラットは近交系ラット系統に由来し得る。例えば、すべ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ＵＳ２０１４／０２３５９３３を参照されたい。

【０１１５】

細胞または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）へのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＳＡＭシステムの送達を最適化するため、またはインビボもしくはエクスビボでＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ転写活性化活性を最適化するための様々な方法も提供される。かかる方法は、例えば、（ａ）第１の真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）または第１の細胞において、上記のような標的遺伝子の転写または発現を増加させるためのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＳＡＭシステムの能力を試験する方法を１回目に実行することと、（ｂ）可変要素を変更し、第２の真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物、すなわち、同じ種のもの）または第２の細胞において変更された可変要素を用いて方法を２回目に実行することと、（ｃ）ステップ（ａ）での標的遺伝子の発現／転写をステップ（ｂ）での標的遺伝子の発現／転写と比較し、標的遺伝子の最適な発現／転写をもたらす方法を選択することと、を含む。

【０１１６】

代替的または追加的に、最適な有効性、最適な一貫性、または最適な特異性をもたらす方法が選択され得る。より高い有効性は、標的遺伝子のより高いレベルの発現／転写を指す（例えば、より高い割合の細胞が、特定の標的細胞型内、特定の標的組織内、または特定の標的器官内で標的化される）。より高い一貫性とは、１つを超える細胞、組織、または器官が標的とされる場合、異なる型の標的細胞、組織、または器官の間での標的遺伝子

の発現／転写のより一貫した増加を指す（例えば、標的器官内のより多くの細胞型の発現／転写の増加）。特定の器官が標的とされる場合、より高い一貫性は、器官内のすべてのすべての場所全体でより一貫性のある発現／転写の増加を指すこともできる。より高い特異性は、標的とされる標的遺伝子座もしくは複数の遺伝子に関するより高い特異性、標的とされる細胞型に関するより高い特異性、標的とされる組織型に関するより高い特異性、または標的とされる器官に関するより高い特異性を指すことができる。例えば、標的特異性の増加は、他の遺伝子に対するオフターゲット効果が少ないことを意味する（例えば、標的遺伝子の増加した転写の代わりに、またはそれに加えて、意図しないオフターゲットゲノム遺伝子座（例えば、隣接するゲノム遺伝子座）で増加した転写を有する標的細胞の割合が低い）。同様に、細胞型、組織、または器官型の特異性の増加は、特定の細胞型、組織型、または器官型が標的にされている場合、オフターゲットの細胞型、組織型、または器官型での影響（すなわち、増加した発現／転写）が少ないことを指す（例えば、特定の器官（例えば、肝臓）が標的とされる場合、意図された標的ではない器官または組織の細胞における影響（すなわち、増加した発現／転写）がより少ない）。

【０１１７】

変更される可変要素は、任意のパラメータにすることができる。一例として、変更される可変要素は、細胞または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）へのＳＡＭ構成要素（キメラＣａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、およびガイドＲＮＡ（複数可））の導入のための投与経路であり得る。静脈内、硝子体内、実質内、および鼻腔内注入（ｎａｓａｌ　ｉｎｓｔｉｌｌａｔｉｏｎ）などの投与経路の例は、本明細書の他の場所に開示されている。

【０１１８】

別の例として、変更される可変要素は、導入されるＳＡＭ構成要素の濃度または量であり得る。別の例として、変更される可変要素は、ＳＡＭ構成要素が導入される回数または頻度（すなわち、ＬＮＰが導入される回数または頻度）であり得る。別の例として、変更される可変要素は、ＳＡＭ構成要素が導入される形態であり得る。例えば、ガイドＲＮＡは、ＤＮＡの形態またはＲＮＡの形態で導入することができ、キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはタンパク質の形態で導入することができる。同様に、ガイドＲＮＡまたはキメラＣａｓタンパク質またはキメラアダプタータンパク質（またはかかる構成要素をコードする核酸）は、安定性であり、オフターゲット効果を低減し、送達を容易にするなどのための修飾の様々な組み合わせを含むことができる。別の例として、変更される可変要素は、導入されるガイドＲＮＡの配列であり得る（例えば、異なる配列を有する異なるガイドＲＮＡを導入するか、または異なるガイドＲＮＡ標的配列を標的とする）。

【０１１９】

標的遺伝子の発現もしくは転写を増加または活性化するために、特に過剰発現が疾患に関連するかまたは疾患の原因となる標的遺伝子について、本明細書に開示される方法によって生成される真核細胞または生物を使用するための方法も提供される。過剰発現が疾患に関連するかまたは疾患の原因となる標的遺伝子の増加した発現を有するかかる真核細胞または生物は、例えば、疾患に対する治療効果または予防効果について、または標的遺伝子の発現を低減させる効果について化合物をスクリーニングするために使用することができる。かかる方法は、例えば、本明細書の他の場所に記載されるような真核細胞または生物における標的遺伝子の転写を増加または活性化し、真核細胞または生物に試薬または化合物を導入し、次いで試薬または化合物の活性を評価することを含み得る（例えば、試薬または化合物で処理されていない対照真核細胞または生物と比較した、試薬または化合物で処理された真核細胞または生物において）。評価は、例えば、標的遺伝子の発現を評価することを含むことができ（例えば、ｍＲＮＡレベルまたはタンパク質レベルで）、標的遺伝子の発現の低減は、治療的または予防的効果を示し得る。代替的または追加的に、評価は、標的遺伝子の過剰発現に関連する、またはそれによって引き起こされる疾患の１つ以上の徴候または症状を評価することを含むことができ、徴候もしくは症状の存在または

改善の低減は、治療的または予防的効果を示し得る。次に、スクリーニングされた試薬または化合物は、それが治療または予防効果を示す場合、候補の治療または予防試薬または化合物として選択することができる。

【０１２０】

標的遺伝子の発現または転写を増加または活性化することを必要とする対象においてそれを実施する方法も提供され、標的遺伝子の発現または活性の低減は、疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはその原因となる。例えば、かかる方法は、標的遺伝子の発現もしくは転写を増加または活性化するため、特に、その過小発現が疾患もしくは状態に関連するかまたはその原因となる、あるいは疾患もしくは状態もしくは薬物の副作用に対する感受性に関連するかまたはその原因となる標的遺伝子に対するものであり得る。例えば、標的遺伝子は、対象において過少発現または低レベルで発現されるものであり得、過少発現または低レベルの発現が、疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはそれらの原因となる。かかる標的遺伝子の低減した転写、かかる標的遺伝子からの遺伝子産物の低減した量、またはかかる標的遺伝子からの遺伝子産物の低減した活性は、標的遺伝子の転写または発現を増加させることが有益であるような疾患に関連し得るか、疾患を増悪し得るか、または疾患を引き起こし得る。かかる遺伝子の一例は、ＯＴＣ（Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ　５００９）である。かかる遺伝子の他の例は、ＨＢＧ１（Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ　３０４７）およびＨＢＧ２（Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ　３０４８）である。かかる遺伝子の他の例には、表２および３にあるようなハプロ不全遺伝子が含まれる。対象は、例えば、ハプロ不全に関連する疾患、障害、または症候群を有する対象など、標的遺伝子の低減した発現または活性を有する対象であり得る。

【０１２１】

ＩＩＩ．ＣＲＩＳＰＲ／相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）システム

本明細書に開示される方法および組成物（例えば、脂質ナノ粒子）は、インビボまたはエクスビボで標的遺伝子の転写を活性化する方法で使用するために、およびインビボまたはエクスビボで標的ゲノム遺伝子座の転写を活性化するＳＡＭシステムまたはかかるシステムの構成要素（例えば、ガイドＲＮＡ）の能力を評価するために、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）／ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）系相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）システムを利用する。本明細書に記載のＳＡＭシステム構成要素は、同じ脂質ナノ粒子内ですべて一緒に送達され、標的遺伝子の転写を活性化するための本明細書の他の場所に記載されるような、キメラＣａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、およびガイドＲＮＡを含む。キメラＣａｓタンパク質（例えば、キメラＣａｓタンパク質、例えば、キメラＣａｓ９タンパク質、例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質、キメラＣａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ　Ｃａｓ９タンパク質、またはＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９タンパク質（例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ　Ｃａｓ９タンパク質、またはＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９タンパク質に由来するキメラＣａｓ９タンパク質）、およびキメラアダプタータンパク質（例えば、ガイドＲＮＡ内のアダプター結合要素および１つ以上の異種転写活性化ドメインと特異的に結合するアダプタータンパク質を含む）は、本明細書の他の場所でさらに詳細に記載される。一例では、キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質は、単一のマルチシストロン性またはバイシストロン性核酸（例えば、ＤＮＡまたはｍＲＮＡ）（ＳＡＭカセットまたはＳＡＭ　ｍＲＮＡと呼ばれる）で送達される。例えば、キメラＣａｓタンパク質をコードする配列およびキメラアダプタータンパク質をコードする配列は、本明細書の他の場所でより詳細に記載されるように、２Ａタンパク質をコードする配列によって連結され得る。特定の例では、キメラＣａｓタンパク質（例えば、５’ＮＬＳが単節型であり、３’ＮＬＳが双節型であるＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＮＬＳ－ＶＰ６４）は、キメラアダプタータンパク質（例えば、ＭＳ２（ＭＣＰ）－ＮＬＳ－ｐ６５－ＨＳＦ１）もコードするマルチシストロン性またはバイシストロン性ｍＲＮＡ（例えば、インビトロで転写された

ｍＲＮＡ）として提供され得る。キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質をコードする核酸は、２Ａタンパク質をコードする核酸によって連結され得る。一例として、ｍＲＮＡは、５’から３’：ＮＬＳ－Ｃａｓ９－ＮＬＳ－ＶＰ６４－２Ａ－ＭＳ２（ＭＣＰ）－ＮＬＳ－ｐ６５－ＨＳＦ１を含み得る。ｍＲＮＡは、５’末端でキャップすることができ（例えば、＋１リボヌクレオチドがリボースの２’Ｏ位置でメチル化されるキャップ１構造）、ポリアデニル化することができ（ポリ（Ａ）テイル）、任意に、シュードウリジンで完全に置換されるようにさらに修飾される。

【０１２２】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系には、Ｃａｓ遺伝子の発現に関与する、またはその活性を指示する転写産物および他の要素が含まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、例えば、タイプＩ、タイプＩＩ、タイプＩＩＩシステム、またはタイプＶ系（例えば、サブタイプＶ－Ａまたはサブタイプ Ｖ－Ｂ）であり得る。本明細書に開示される組成物および方法で使用されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、天然に存在しなくてもよい。「天然に存在しない」系は、系の１つ以上の構成要素が、それらの天然に存在する状態から改変または変異されている、それらが天然に関連する少なくとも１つの他の構成要素を少なくとも実質的に含まない、またはそれらが天然に関連しない少なくとも１つの他の構成要素と関連するなど、人の手の関与を示す任意のものを含む。例えば、一部のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、天然に発生しないｇＲＮＡおよびＣａｓタンパク質を一緒に含む非天然発生型ＣＲＩＳＰＲ複合体を用いるか、天然に発生しないＣａｓタンパク質を用いるか、または天然に発生しないｇＲＮＡを用いる。

【０１２３】

本明細書に開示される方法および組成物は、インビボで標的ゲノム遺伝子座の転写活性化を誘導するためのＣＲＩＳＰＲ複合体（キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質と複合されるガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む）の能力を使用または試験することにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムを利用する。

【０１２４】

Ａ．キメラＣａｓタンパク質

本明細書の他の場所に開示されているガイドＲＮＡと結合して標的遺伝子の転写を活性化することができるキメラＣａｓタンパク質が提供される。かかるキメラＣａｓタンパク質は、（ａ）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）関連（Ｃａｓ）タンパク質またはガイドＲＮＡと複合体を形成して標的配列と結合することができるその機能的断片またはバリアントであるＤＮＡ結合ドメインと、（ｂ）１つ以上の転写活性化ドメインまたはその機能的断片もしくはバリアントと、を含む。例えば、かかる融合タンパク質は、１、２、３、４、５、またはそれ以上の転写活性化ドメイン（例えば、２つ以上の異種転写活性化ドメインまたは３つ以上の異種転写活性化ドメイン）を含み得る。一例では、キメラＣａｓタンパク質は、触媒的に不活性なＣａｓタンパク質（例えば、ｄＣａｓ９）およびＶＰ６４転写活性化ドメインまたはその機能的断片もしくはバリアントを含み得る。例えば、かかるキメラＣａｓタンパク質は、配列番号１に記載されるｄＣａｓ９－ＶＰ６４キメラＣａｓタンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。しかしながら、転写活性化ドメインが他の転写活性化ドメインまたはその機能的断片もしくはバリアントを含む、および／またはＣａｓタンパク質が他のＣａｓタンパク質（例えば、触媒的に不活性なＣａｓタンパク質）を含むキメラＣａｓタンパク質もまた提供される。他の好適な転写活性化ドメインの例は、本明細書の他の場所に提供される。

【０１２５】

転写活性化ドメイン（複数可）は、Ｎ末端、Ｃ末端、またはＣａｓタンパク質内の任意の場所に位置することができる。例えば、転写活性化ドメインは、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質と最適に整列された場合に、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質のＲｅｃ１ドメイン、Ｒｅｃ２ドメイン、ＨＮＨドメイン

、もしくはＰＩドメイン、またはオルソロガスＣａｓ９タンパク質またはホモログまたはオルソロガスＣａｓタンパク質の任意の対応する領域と結合することができる。例えば、転写活性化ドメインは、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質の５５３位のＲｅｃ１ドメイン、５７５位のＲｅｃ１ドメイン、１７５～３０６位内の任意の位置のＲｅｃ２ドメインと結合するか、または１７５～３０６位内の領域の一部もしくは全体、７１５～９０１位内の任意の位置のＨＮＨドメインを置き換えるか、または７１５～９０１位内の領域の一部もしくは全体、または１１５３位のＰＩドメインを置き換えることができる。例えば、ＷＯ２０１６／０４９２５８を参照されたく、すべ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。転写活性化ドメインは、本明細書の他の場所に記載されるように、片側または両側に１つ以上のリンカーが隣接し得る。

【０１２６】

キメラＣａｓタンパク質はまた、追加の異種ポリペプチドに作動可能に連結または融合され得る。融合または連結された異種ポリペプチドは、Ｎ末端、Ｃ末端、またはキメラＣａｓタンパク質の内部の任意の場所に位置し得る。例えば、キメラＣａｓ－タンパク質は、核局在化シグナルをさらに含み得る。Ｃａｓタンパク質に対する好適な核局在化シグナルおよび他の修飾の例は、本明細書の他の場所でさらに詳細に記載される。

【０１２７】

キメラＣａｓタンパク質は、任意の形態で提供され得る。例えば、キメラＣａｓタンパク質は、ｇＲＮＡと複合体を形成したキメラＣａｓタンパク質などのタンパク質の形態で提供してもよい。代替的に、キメラＣａｓタンパク質は、ＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））またはＤＮＡなどの、キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸の形態で提供してもよい。特定の例では、キメラＣａｓタンパク質は、キメラアダプタータンパク質もコードするマルチシストロン性またはバイシストロン性ｍＲＮＡなどのｍＲＮＡ（例えば、インビトロで転写されたｍＲＮＡ）として提供することができる。任意に、キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞または生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化することができる。例えば、キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸は、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、真核細胞、非ヒト真核細胞、動物細胞、非ヒト動物細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、齧歯動物細胞、マウス細胞、ラット細胞、または任意の他の目的の宿主細胞においてより頻度高く使用される代替コドンへと修飾することができる。キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸が細胞に導入されると、キメラＣａｓタンパク質は、一時的、条件付き、または構成的に細胞内で発現され得る。

【０１２８】

キメラｍＲＮＡとして提供されるＣａｓタンパク質は、安定性および／または免疫原性の特性を改善するために修飾することができる。修飾は、ｍＲＮＡ内の１つ以上のヌクレオシドに対して行われ得る。ｍＲＮＡ核酸塩基への化学修飾の例には、シュードウリジン、１－メチル－シュードウリジン、および５－メチル－シチジンが含まれる。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡもキャップすることができる。キャップは、例えば、＋１リボヌクレオチドがリボースの２’Ｏ位置でメチル化されているキャップ１構造であり得る。キャッピングは、例えば、インビボで優れた活性を与えることができ（例えば、天然のキャップを模倣することによって）、宿主の自然免疫系の刺激を低減する自然な構造をもたらすことができる（例えば、自然免疫系のパターン認識受容体の活性化を減少させることができる）。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、ポリアデニル化することもできる（ポリ（Ａ）テイルを構成するため）。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンを含むように修飾することもできる（例えば、シュードウリジンで完全に置換することができる）。例えば、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むキャップされポリアデニル化されたキメラＣａｓ　ｍＲＮＡを使用することができる。同様に、キメラＣａｓ　ｍＲＮＡは、同義コドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。他の可能な修飾は、本明細書の他の場所でより詳細に記載される。

【０１２９】
ｍＲＮＡとして提供されるＣａｓタンパク質は、安定性および／または免疫原性の特性を改善するために修飾することができる。修飾は、ｍＲＮＡ内の１つ以上のヌクレオシドに対して行われ得る。ｍＲＮＡ核酸塩基への化学修飾の例には、シュードウリジン、１－メチル－シュードウリジン、および５－メチル－シチジンが含まれる。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡもキャップすることができる。キャップは、例えば、＋１リボヌクレオチドがリボースの２’Ｏ位置でメチル化されているキャップ１構造であり得る。キャッピングは、例えば、インビボで優れた活性を与えることができ（例えば、天然のキャップを模倣することによって）、宿主の自然免疫系の刺激を低減する自然な構造をもたらすことができる（例えば、自然免疫系のパターン認識受容体の活性化を減少させることができる）。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、ポリアデニル化することもできる（ポリ（Ａ）テイルを構成するため）。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンを含むように修飾することもできる（例えば、シュードウリジンで完全に置換することができる）。例えば、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むキャップされポリアデニル化されたキメラＣａｓ　ｍＲＮＡを使用することができる。同様に、キメラＣａｓ　ｍＲＮＡは、同義コドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。

【０１３０】
キメラＣａｓ　ｍＲＮＡは、少なくとも１つ、複数、またはすべてのウリジン位置で修飾されたウリジンを含むことができる。修飾されたウリジンは、５位で修飾されたウリジンであり得る（例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで）。修飾されたウリジンは、１位で修飾されたシュードウリジンであり得る（例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで）。修飾されたウリジンは、例えば、シュードウリジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン、５－メトキシウリジン、５－ヨードウリジン、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、５－メトキシウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、５－ヨードウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、Ｎ１－メチル－シュードウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンおよび５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチルシュードウリジンおよび５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、５－ヨードウリジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンおよび５－ヨードウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンおよび５－メトキシウリジンの組み合わせである。

【０１３１】
本明細書に開示されるキメラＣａｓ　ｍＲＮＡはまた、Ｃａｐ０、Ｃａｐｌ、またはＣａｐ２などの５’キャップを含み得る。５’キャップは通常、ｍＲＮＡの５’から３’鎖の第１のヌクレオチドの５’位置（すなわち、第１のキャップ近位ヌクレオチド）と５’－トリホスフェートを介して連結した７－メチルグアニンリボヌクレオチド（例えば、ＡＲＣＡに関してさらに修飾され得る）である。Ｃａｐ０では、ｍＲＮＡの第１および第２のキャップ近位ヌクレオチドのリボースの両方が、２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐｌでは、ｍＲＮＡの第１および第２の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ２’－メトキシおよび２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐ２では、ｍＲＮＡの第１および第２のキャップ近位ヌクレオチドのリボースの両方が、２’－メトキシを含む。例えば、Ｋａｔｉｂａｈ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１１（３３）：１２０２５－３０、およびＡｂｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１４（１１）：Ｅ２１０６－Ｅ２１１５を参照されたく、それらの各々は、すべ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。ヒトｍＲＮＡなどの哺乳動物ｍＲＮＡを含む大部分の内因性高等真核生物ｍＲＮＡは、ＣａｐｌまたはＣａｐ２を含む。ＣａｐｌおよびＣａｐ２とは異なるＣａｐ０および他のキャップ構造は、ＩＦＩＴ－１およびＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の構成要素によって非自己として認識されるため、ヒトなどの哺乳動物では免疫原性であり得、これはＩ型インターフェロンを含む上昇したサイトカインレベルをもたらし得る。ＩＦＩＴ－１およびＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の構成要素もまた、ｍＲＮＡとＣａｐｌまたはＣａｐ２以外のキャップとの結合についてｅＩＦ４Ｅと競合し得、ｍＲＮＡの翻訳を阻害する可能性がある。

【０１３２】

キャップは、共転写性を含み得る。例えば、ＡＲＣＡ（抗逆転キャップ類似体；Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＡＭ８０４５）は、開始時に転写物にインビトロで組み込むことができる、グアニンリボヌクレオチドの５’位置と連結した７－メチルグアニン３’－メトキシ－５’－トリホスフェートを含むキャップ類似体である。ＡＲＣＡは、第１のキャップ近位ヌクレオチドの２’位置がヒドロキシルであるＣａｐ０キャップをもたらす。例えば、Ｓｔｅｐｉｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．（２００１）ＲＮＡ ７：１４８６－１４９５を参照されたく、すべ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。

【０１３３】

ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；ＴｒｉＬｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｎ－７１１３）またはＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧ；ＴｒｉＬｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｎ－７１３３）は、共転写性Ｃａｐｌ構造を提供するために使用され得る。ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧおよびＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧの３’－Ｏ－メチル化バージョンは、ＴｒｉＬｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｎ－７４１３およびＮ－７４３３でそれぞれ入手可能である。

【０１３４】

代替的に、キャップは、転写後にＲＮＡに追加することもできる。例えば、ワクシニアキャッピング酵素は市販されており（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｍ２０８０Ｓ）、そのＤ１サブユニットによって提供されるＲＮＡトリホスファターゼおよびグアニリルトランスフェラーゼ活性と、そのＤ１２サブユニットによって提供されるグアニンメチルトランスフェラーゼと、を有する。そのため、Ｓ－アデノシルメチオニンおよびＧＴＰの存在下で、ＲＮＡに７－メチルグアニンを付加してＣａｐ０を付与することができる。例えば、Ｇｕｏ ａｎｄ Ｍｏｓｓ（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８７：４０２３－４０２７、およびＭａｏ ａｎｄ Ｓｈｕｍａｎ（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：２４４７２－２４４７９を参照されたく、それらの各々は、すべ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。

【０１３５】

キメラＣａｓ ｍＲＮＡは、ポリアデニル化（ポリＡ）テイルをさらに含むことができる。ポリＡテイルは、例えば、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、または少なくとも１００のアデニン、任意に、最大３００のアデニンを含むことができる。例えば、ポリＡテイルは、９５、９６、９７、９８、９９、または１００のアデニンヌクレオチドを含むことができる。

【０１３６】

キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸は、細胞のゲノムに安定して組み込まれ、細胞内で活性なプロモーターと作動可能に連結され得る。代替的に、キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸は、発現構築物中のプロモーターに作動可能に連結され得る。発現構築物は、遺伝子または他の目的の核酸配列（例えば、キメラＣａｓ遺伝子）の発現を指示

することができ、かつそのような目的の核酸配列を標的細胞に移すことができる任意の核酸構築物を含む。例えば、キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸は、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡを含むベクター内に存在し得る。代替的に、それは、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡを含むベクターとは別のベクターまたはプラスミドであり得る。発現構築物において使用することができるプロモーターには、例えば、真核細胞、非ヒト真核細胞、動物細胞、非ヒト動物細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、齧歯動物細胞、マウス細胞、ラット細胞、多能性細胞、胚性幹（ＥＳ）細胞、成体幹細胞、発生が制限された前駆細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、または１細胞期胚のうちの１つ以上において活性なプロモーターが含まれる。かかるプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターであり得る。任意に、プロモーターは、一方向のキメラＣａｓタンパク質と他の方向のガイドＲＮＡの両方の発現を駆動する双方向プロモーターであり得る。かかる双方向プロモーターは、（１）遠位配列要素（ＤＳＥ）、近位配列要素（ＰＳＥ）、およびＴＡＴＡボックスの３つの外部制御要素を含む完全な従来の一方向Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター、ならびに（２）ＤＳＥの５’末端に逆方向に融合されたＰＳＥおよびＴＡＴＡボックスを含む第２の基本的なＰｏｌ　ＩＩＩプロモーターで構成され得る。例えば、Ｈ１プロモーターでは、ＤＳＥはＰＳＥとＴＡＴＡボックスに隣接しており、プロモーターは、Ｕ６プロモーターに由来するＰＳＥおよびＴＡＴＡボックスを追加することによって逆方向の転写が制御されるハイブリッドプロモーターを作製することにより、双方向にすることができる。例えば、ＵＳ２０１６／００７４５３５を参照されたく、すべ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。双方向プロモーターを使用してキメラＣａｓタンパク質およびガイドＲＮＡをコードする遺伝子を同時に発現させることにより、コンパクトな発現カセットを生成して送達を容易にすることができる。

【０１３７】

（１）Ｃａｓタンパク質

Ｃａｓタンパク質は一般に、ガイドＲＮＡと相互作用できる少なくとも１つのＲＮＡ認識または結合ドメインを含む。Ｃａｓタンパク質の機能的断片または機能的バリアントは、ガイドＲＮＡと複合体を形成し、標的遺伝子の標的配列と結合する能力（例えば、標的遺伝子の転写を活性化する）を保持するものである。

【０１３８】

本明細書の他の場所に記載される転写活性化ドメインに加えて、Ｃａｓタンパク質はまた、ヌクレアーゼドメイン（例えば、ＤＮａｓｅドメインまたはＲＮａｓｅドメイン）、ＤＮＡ結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質－タンパク質相互作用ドメイン、二量体化ドメイン、および他のドメインを含むことができる。いくつかのそのようなドメイン（例えば、ＤＮａｓｅドメイン）は、天然のＣａｓタンパク質に由来し得る。他のかかるドメインを追加して、修飾されたＣａｓタンパク質を作製することができる。ヌクレアーゼドメインは、核酸分子の共有結合の切断を含む、核酸切断に対する触媒活性を有する。切断は、平滑末端または千鳥状の末端を生成することができ、それは一本鎖または二本鎖であり得る。例えば、野生型のＣａｓ９タンパク質は、通常、平滑端切断産物を生成する。代替的に、野生型Ｃｐｆ１タンパク質（例えば、ＦｎＣｐｆ１）は、非標的鎖のＰＡＭ配列から１８番目の塩基対の後および標的鎖の２３番目の塩基の後に切断が生じる、５－ヌクレオチドの５’オーバーハングを有する切断産物をもたらし得る。Ｃａｓタンパク質は、完全な切断活性を有し、標的ゲノム遺伝子座で二本鎖切断を作成することができるか（例えば、平滑末端を含む二本鎖切断）、またはそれは標的ゲノム遺伝子座で一本鎖切断を作成するニッカーゼであり得る。一例では、本明細書に開示されるキメラＣａｓタンパク質のＣａｓタンパク質部分は、減少したヌクレアーゼ活性を有するように（例えば、ヌクレアーゼ活性が、野生型Ｃａｓタンパク質と比較して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％低減される）、または実質的にすべてのヌクレアーゼ活性を欠くように（すなわち、ヌクレアーゼ活性が、野生型Ｃａｓタンパク質と比較して、少なくとも９０％、９５％、９

７％、９８％、９９％、もしくは１００％低減するか、または野生型Ｃａｓタンパク質のヌクレアーゼ活性の約０％、１％、２％、３％、５％、もしくは１０％以下を有する）修飾される。ヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質は、その触媒（すなわち、ヌクレアーゼ）ドメインに不活性化変異であることが知られている変異を有するか（例えば、Ｃｐｆ１タンパク質のＲｕｖＣ様エンドヌクレアーゼドメインの変異を不活性化するか、またはＣａｓ９のＨＮＨエンドヌクレアーゼドメインおよびＲｕｖＣ様エンドヌクレアーゼドメインの両方の変異を不活性化する）、またはＣａｓタンパク質が、野生型Ｃａｓタンパク質と比較して少なくとも約９７％、９８％、９９％、または１００％減少したヌクレアーゼ活性を有するＣａｓタンパク質である。ヌクレアーゼ活性を低減または実質的に排除するための異なるＣａｓタンパク質変異の例が以下に開示される。

【０１３９】

Ｃａｓタンパク質の例には、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ５ｅ（ＣａｓＤ）、Ｃａｓ６、Ｃａｓ６ｅ、Ｃａｓ６ｆ、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８ａ１、Ｃａｓ８ａ２、Ｃａｓ８ｂ、Ｃａｓ８ｃ、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１またはＣｓｘ１２）、Ｃａｓ１０、Ｃａｓ１０ｄ、ＣａｓＦ、ＣａｓＧ、ＣａｓＨ、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、およびＣｕ１９６６、ならびにそれらの相同性または改変バージョンが含まれる。

【０１４０】

例示的なＣａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質またはＣａｓ９タンパク質に由来するタンパク質である。Ｃａｓ９タンパク質は、タイプＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に由来するものであり、典型的には、保存されたアーキテクチャを有する４つの重要なモチーフを共有する。モチーフ１、２、および４はＲｕｖＣ様モチーフであり、モチーフ３はＨＮＨモチーフである。例示的なＣａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ種、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、Ｎｏｃａｒｄｉｏｐｓｉｓ ｄａｓｓｏｎｖｉｌｌｅｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｐｒｉｓｔｉｎａｅ ｓｐｉｒａｌｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ ａｃｉｄｏｃａｌｄａｒｉｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｓｅｕｄｏｍｙｃｏｉｄｅｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｅｌｅｎｉｔｉｒｅｄｕｃｅｎｓ、Ｅｘｉｇｕｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｉｂｉｒｉｃｕｍ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓａｌｉｖａｒｉｕｓ、Ｍｉｃｒｏｓｃｉｌｌａ ｍａｒｉｎａ、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａｌｅｓ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ ｎａｐｈｔｈａｌｅｎｉｖｏｒａｎｓ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ種、Ｃｒｏｃｏｓｐｈａｅｒａ ｗａｔｓｏｎｉｉ、Ｃｙａｎｏｔｈｅｃｅ種、Ｍｉｃｒｏｃｙｓｔｉｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ種、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種、Ｎｉｔｒｏｓｏｃｏｃｃｕｓ ｈａｌｏｐｈｉｌｕｓ、Ｎｉｔｒｏｓｏｃｏｃｃｕｓ ｗａｔｓｏｎｉ、Ｐｓｅ

ｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ ｈａｌｏｐｌａｎｋｔｉｓ、Ｋｔｅｄｏｎｏｂａｃｔｅｒ ｒａｃｅｍｉｆｅｒ、Ｍｅｔｈａｎｏｈａｌｏｂｉｕｍ ｅｖｅｓｔｉｇａｔｕｍ、Ａｎａｂａｅｎａ ｖａｒｉａｂｉｌｉｓ、Ｎｏｄｕｌａｒｉａ ｓｐｕｍｉｇｅｎａ、Ｎｏｓｔｏｃ種、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｍａｘｉｍａ、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｐｌａｔｅｎｓｉｓ、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ種、Ｌｙｎｇｂｙａ種、Ｍｉｃｒｏｃｏｌｅｕｓ ｃｈｔｈｏｎｏｐｌａｓｔｅｓ、Ｏｓｃｉｌｌａｔｏｒｉａ種、Ｐｅｔｒｏｔｏｇａ ｍｏｂｉｌｉｓ、Ｔｈｅｒｍｏｓｉｐｈｏ ａｆｒｉｃａｎｕｓ、Ａｃａｒｙｏｃｈｌｏｒｉｓ ｍａｒｉｎａ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、またはＣａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉに由来する。Ｃａｓ９ファミリーメンバーの追加の例は、ＷＯ２０１４／１３１８３３に記載されており、すべ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。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ（ＳｐＣａｓ９）由来のＣａｓ９（ＳｗｉｓｓＰｒｏｔアクセッション番号Ｑ９９ＺＷ２が割り当てられている）は、例示的なＣａｓ９タンパク質である。Ｓ．ａｕｒｅｕｓ（ＳａＣａｓ９）由来のＣａｓ９（ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｊ７ＲＵＡ５が割り当てられている）は、別の例示的なＣａｓ９タンパク質である。Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ（ＣｊＣａｓ９）由来のＣａｓ９（ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｑ０Ｐ８９７が割り当てられている）は、別の例示的なＣａｓ９タンパク質である。例えば、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，（２０１７）Ｎａｔ．Ｃｏｍｍ．８：１４５００を参照されたく、すべ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。ＳａＣａｓ９はＳｐＣａｓ９よりも小さく、ＣｊＣａｓ９はＳａＣａｓ９およびＳｐＣａｓ９の両方よりも小さい。Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ由来のＣａｓ９（Ｎｍｅ２Ｃａｓ９）は、別の例示的なＣａｓ９タンパク質である。例えば、Ｅｄｒａｋｉ ｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ ７３（４）：７１４－７２６を参照されたく、すべ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。Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来のＣａｓ９タンパク質（例えば、ＣＲＩＳＰＲ１遺伝子座（Ｓｔ１Ｃａｓ９）によってコードされるＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ ＬＭＤ－９ Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ３遺伝子座（Ｓｔ３Ｃａｓ９）由来のＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ Ｃａｓ９）は、他の例示的なＣａｓ９タンパク質である。Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ由来のＣａｓ９（ＦｎＣａｓ９）または代替ＰＡＭを認識するＲＨＡ Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｃａｓ９バリアント（Ｅ１３６９Ｒ／Ｅ１４４９Ｈ／Ｒ１５５６Ａ置換）は、他の例示的なＣａｓ９タンパク質である。これらおよび他の例示的なＣａｓ９タンパク質は、例えば、Ｃｅｂｒｉａｎ－Ｓｅｒｒａｎｏ ａｎｄ Ｄａｖｉｅｓ（２０１７）Ｍａｍｍ．Ｇｅｎｏｍｅ ２８（７）：２４７－２６１で概説されており、すべ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。Ｃａｓ９コード配列、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ、およびＣａｓ９タンパク質配列の例が、ＷＯ２０１３／１７６７７２、ＷＯ２０１４／０６５５９６、ＷＯ２０１６／１０６１２１、およびＷＯ２０１９／０６７９１０に提供され、それらの各々は、すべ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。ＯＲＦおよびＣａｓ９アミノ酸配列の特定の例が、ＷＯ２０１９／０６７９１０の段落［０４４９］の表３０に提供され、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡおよびＯＲＦの特定の例が、ＷＯ２０１９／０６７９１０の段落［０２１４］～［０２３４］に提供される。

【０１４１】

Ｃａｓタンパク質の別の例は、Ｃｐｆ１（ＰｒｅｖｏｔｅｌｌａおよびＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ １のＣＲＩＳＰＲ）タンパク質である。Ｃｐｆ１は、Ｃａｓ９の対応するドメインに相同なＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインを、Ｃａｓ９の特徴的なアルギニンに富むクラスターの対応物と共に含む大きなタンパク質（約１３００アミノ酸）である。しかしながら、Ｃｐｆ１は、Ｃａｓ９タンパク質に存在するＨＮＨヌクレアーゼドメインを欠いており、ＨＮＨドメインを含む長い挿入を含むＣａｓ９とは対照的に、ＲｕｖＣ様ドメインは、Ｃｐｆ１配列において隣接している。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ １６３（３）：７５９－７７１を参照されたく、すべての目的のため

にその全体が参照により本明細書に組み込まれる。例示的なＣｐｆ１タンパク質は、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ １、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｎｏｖｉｃｉｄａ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｌｂｅｎｓｉｓ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＣ２０１７ １、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３３＿１０、Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７、Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ ｓｐ．ＳＣＡＤＣ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎａｄａｉ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ ３、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ、およびＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅに由来する。Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｕ１１２由来のＣｐｆ１（ＦｎＣｐｆ１；ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ａ０Ｑ７Ｑ２が割り当てられている）は、例示的なＣｐｆ１タンパク質である。

【０１４２】

Ｃａｓタンパク質は、野生型タンパク質（すなわち、本質的に発生するもの）、修飾Ｃａｓタンパク質（すなわち、Ｃａｓタンパク質バリアント）、または野生型もしくは修飾Ｃａｓタンパク質の断片であり得る。Ｃａｓタンパク質はまた、野生型または改変されたＣａｓタンパク質の触媒活性に関して、活性なバリアントまたは断片であり得る。触媒活性に関する活性なバリアントまたは断片は、野生型または修飾されたＣａｓタンパク質またはその一部に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上の配列同一性を含み得、活性なバリアントは、所望の切断部位で切断する能力を保持し、したがってニック誘導または二本鎖切断誘導活性を保持する。ニック誘導または二本鎖切断誘導活性のアッセイは知られており、一般に、切断部位を含むＤＮＡ基質上のＣａｓタンパク質の全体的な活性および特異性を測定する。

【０１４３】

修飾Ｃａｓタンパク質の一例は、修飾ＳｐＣａｓ９－ＨＦ１タンパク質であり、これは、非特異的ＤＮＡ接触を低減するように設計された改変を内包するＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９の忠実度の高いバリアント（Ｎ４９７Ａ／Ｒ６６１Ａ／Ｑ６９５Ａ／Ｑ９２６Ａ）である。例えば、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｎａｔｕｒｅ ５２９（７５８７）：４９０－４９５を参照されたく、すべ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。修飾Ｃａｓタンパク質の別の例は、オフターゲット効果を低減するように設計された修飾ｅＳｐＣａｓ９バリアント（Ｋ８４８Ａ／Ｋ１００３Ａ／Ｒ１０６０Ａ）である。例えば、Ｓｌａｙｍａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３５１（６２６８）：８４－８８を参照されたく、すべ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。他のＳｐＣａｓ９バリアントには、Ｋ８５５ＡおよびＫ８１０Ａ／Ｋ１００３Ａ／Ｒ１０６０Ａが含まれる。これらおよび他の修飾Ｃａｓタンパク質は、例えば、Ｃｅｂｒｉａｎ－Ｓｅｒｒａｎｏ ａｎｄ Ｄａｖｉｅｓ（２０１７）Ｍａｍｍ．Ｇｅｎｏｍｅ ２８（７）：２４７－２６１に概説され、すべ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。修飾Ｃａｓ９タンパク質の別の例は、ｘＣａｓ９であり、これは拡大された範囲のＰＡＭ配列を認識することができるＳｐＣａｓ９バリアントである。例えば、Ｈｕ ｅｔ ａｌ．（２０１８）Ｎａｔｕｒｅ ５５６：５７－６３を参照されたく、すべ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。

【０１４４】

Ｃａｓタンパク質は、核酸結合親和性、核酸結合特異性、および酵素活性のうちの１つ

以上を増加または減少させるように修飾され得る。Ｃａｓタンパク質は、安定性など、タンパク質の他の活性または特性を変更するように修飾することもできる。例えば、Ｃａｓタンパク質の１つまたは複数のヌクレアーゼドメインを改変、欠失、または不活化することができ、あるいはＣａｓタンパク質を切断して、タンパク質の機能に必須ではないドメインを除去するか、あるいはＣａｓタンパク質の活性または特性を最適化（例えば、増強または低減）することができる。

【０１４５】

Ｃａｓタンパク質は、ＤＮａｓｅドメインなどの少なくとも１つのヌクレアーゼドメインを含み得る。例えば、野生型Ｃｐｆ１タンパク質は、一般に、おそらく二量体立体配座で、標的ＤＮＡの両方の鎖を切断するＲｕｖＣ様ドメインを含む。Ｃａｓタンパク質はまた、ＤＮａｓｅドメインなどの少なくとも２つのヌクレアーゼドメインを含み得る。例えば、野生型Ｃａｓ９タンパク質は、一般に、ＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインおよびＨＮＨ様ヌクレアーゼドメインを含む。ＲｕｖＣドメインおよびＨＮＨドメインは各々、二本鎖ＤＮＡの異なる鎖を切断して、ＤＮＡに二本鎖切断を生成することができる。例えば、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３７（６０９６）：８１６－８２１を参照されたく、すべ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。

【０１４６】

ヌクレアーゼドメインの１つ以上またはすべてを欠失または変異させることで、それらがもはや機能しなくさせるか、またはヌクレアーゼ活性が低下させすことができる。例えば、Ｃａｓ９タンパク質でヌクレアーゼドメインの１つが削除または変異された場合、得られたＣａｓ９タンパク質はニッカーゼと称され、二本鎖標的ＤＮＡ内で一本鎖切断を生成することができるが、二本鎖切断では生成することができない（すなわち、相補鎖または非相補鎖を切断することができるが、両方を切断することはできない）。ヌクレアーゼドメインの両方が削除または変異された場合、得られたＣａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９）は、二本鎖ＤＮＡの両方の鎖（例えば、ヌクレアーゼヌルまたはヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質、または触媒活性を伴わないＣａｓタンパク質（ｄＣａｓ））を切断する能力が低減される。Ｃａｓ９をニッカーゼに変換する変異の例は、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９のＲｕｖＣドメインにおけるＤ１０Ａ（Ｃａｓ９の１０位でのアスパラギン酸塩からアラニンへ）変異である。同様に、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９のＨＮＨドメインにあるＨ９３９Ａ（アミノ酸８３９位でのヒスチジンからアラニンへ）、Ｈ８４０Ａ（アミノ酸８４０位でのヒスチジンからアラニンへ）、またはＮ８６３Ａ（アミノ酸Ｎ８６３位でのアスパラギンからアラニンへ）は、Ｃａｓ９をニッカーゼに変換し得る。Ｃａｓ９をニッカーゼに変換する変異の他の例には、Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来のＣａｓ９への対応する変異が含まれる。例えば、Ｓａｐｒａｎａｕｓｋａｓ ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３９（２１）：９２７５－９２８２およびＷＯ２０１３／１４１６８０を参照されたく、それらの各々は、すべ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。そのような変異は、部位特異的変異導入、ＰＣＲを介した変異導入、または全遺伝子合成などの方法を使用して生成され得る。ニッカーゼを生成する他の変異の例は、例えば、ＷＯ２０１３／１７６７７２およびＷＯ２０１３／１４２５７８において見出すことができ、それらの各々は、すべ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。ヌクレアーゼドメインのすべてがＣａｓタンパク質で削除または変異された場合（例えば、ヌクレアーゼドメインの両方がＣａｓ９タンパク質で削除または変異された場合）、得られたＣａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９）は、二本鎖ＤＮＡの両方の鎖（例えば、ヌクレアーゼヌルまたはヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質）を切断する能力が低減される。１つの特定の例は、Ｄ１０Ａ／Ｈ８４０Ａ Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９二重変異体、またはＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９と最適に整列された場合の別の種からのＣａｓ９の対応する二重変異体である。別の特定の例は、Ｄ１０Ａ／Ｎ８６３Ａ Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９二重変異体、またはＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９と最適に整列された場合の別の

種からのＣａｓ９の対応する二重変異体である。触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質（ｄＣａｓ９）の一例は、配列番号２に記載のｄＣａｓ９タンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。

【０１４７】

ｘＣａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例は、ＳｐＣａｓ９について前述したものと同じである。Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓのＣａｓ９タンパク質の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も知られている。例えば、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓのＣａｓ９酵素（ＳａＣａｓ９）は、位置Ｎ５８０での置換（例えば、Ｎ５８０Ａ置換）および位置Ｄ１０での置換（例えば、Ｄ１０Ａ置換）を含み得、ヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質をもたらす。例えば、ＷＯ２０１６／１０６２３６を参照されたく、すべ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。Ｎｍｅ２Ｃａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、Ｄ１６ＡおよびＨ５８８Ａの組み合わせ）。Ｓｔ１Ｃａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、Ｄ９Ａ、Ｄ５９８Ａ、Ｈ５９９Ａ、およびＮ６２２Ａの組み合わせ）。Ｓｔ３Ｃａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、Ｄ１０ＡおよびＮ８７０Ａの組み合わせ）。ＣｊＣａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、Ｄ８ＡおよびＨ５５９Ａの組み合わせ）。ＦｎＣａｓ９およびＲＨＡ ＦｎＣａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も既知である（例えば、Ｎ９９５Ａ）。

【０１４８】

Ｃｐｆ１タンパク質の触媒ドメインにおける不活化変異の例も既知である。Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｕ１１２（ＦｎＣｐｆ１）、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６（ＡｓＣｐｆ１）、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６（ＬｂＣｐｆ１）、およびＭｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７（ＭｂＣｐｆ１ Ｃｐｆ１）由来のＣｐｆ１タンパク質に関して、かかる変異には、ＡｓＣｐｆ１の９０８、９９３、もしくは１２６３位またはＣｐｆ１オルソログの対応する位置、あるいはＬｂＣｐｆ１の８３２、９２５、９４７、もしくは１１８０位またはＣｐｆ１オルソログの対応する位置での変異が含まれ得る。かかる変異は、例えば、ＡｓＣｐｆ１の変異Ｄ９０８Ａ、Ｅ９９３Ａ、およびＤ１２６３ＡもしくはＣｐｆ１オルソログの対応する変異、またはＬｂＣｐｆ１のＤ８３２Ａ、Ｅ９２５Ａ、Ｄ９４７Ａ、およびＤ１１８０ＡもしくはＣｐｆ１オルソログの対応する変異のうちの１つ以上を含み得る。例えば、ＵＳ２０１６／０２０８２４３を参照されたく、すべ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。

【０１４９】

Ｃａｓタンパク質はまた、融合タンパク質として異種ポリペプチドに作動可能に連結され得る。例えば、転写活性化ドメインに加えて、Ｃａｓタンパク質は切断ドメインまたはエピジェネティック修飾ドメインに融合させることができる。ＷＯ２０１４／０８９２９０を参照されたく、すべ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。Ｃａｓタンパク質は、安定性の増加または減少を提供する異種ポリペプチドに融合することもできる。融合ドメインまたは異種ポリペプチドは、Ｎ末端、Ｃ末端、またはＣａｓタンパク質の内部に位置し得る。

【０１５０】

一例として、Ｃａｓタンパク質は、細胞内局在化を提供する１つ以上の異種ポリペプチドに融合され得る。そのような異種ポリペプチドには、例えば、核を標的とするための単節型（ｍｏｎｏｐａｒｔｉｔｅ）ＳＶ４０ ＮＬＳおよび／または双節型（ｂｉｐａｒｔｉｔｅ）アルファーインポーチンＮＬＳなどの１つ以上の核局在化シグナル（ＮＬＳ）、ミトコンドリアを標的とするためのミトコンドリア局在化シグナル、ＥＲ保持シグナルなどが含まれ得る。例えば、Ｌａｎｇｅ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅ

ｍ．２８２（８）：５１０１－５１０５を参照されたく、すべ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。かかる細胞内局在化シグナルは、Ｎ末端、Ｃ末端、またはＣａｓタンパク質内の任意の場所に位置し得る。ＮＬＳは、一続きの塩基性アミノ酸を含むことができ、単節型配列または双節型配列であり得る。任意選択で、Ｃａｓタンパク質は、Ｎ末端にＮＬＳ（例えば、アルファ－インポーチンＮＬＳまたは単節型ＮＬＳ）およびＣ末端にＮＬＳ（例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳまたは双節型ＮＬＳ）を含む２つ以上のＮＬＳを含むことができる。Ｃａｓタンパク質はまた、Ｎ末端に２つ以上のＮＬＳおよび／またはＣ末端に２つ以上のＮＬＳを含み得る。

【０１５１】

一例では、Ｃａｓタンパク質は、１～１０個のＮＬＳ、１～５個のＮＬＳ、または１つのＮＬＳと融合させることができる。１つのＮＬＳが使用される場合、ＮＬＳは、Ｃａｓ配列のＮ末端またはＣ末端で連結され得る。また、Ｃａｓ配列内に内部的に挿入することもできる。他の例では、Ｃａｓタンパク質は、１つを超えるＮＬＳと融合させることができる。例えば、Ｃａｓタンパク質は、２、３、４、または５つのＮＬＳと融合させるか、２つのＮＬＳと融合させることができる。特定の状況では、２つのＮＬＳが、同じ（例えば、２つのＳＶ４０　ＮＬＳ）であるか、または異なり得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、カルボキシ末端で連結される２つのＳＶ４０　ＮＬＳ配列と融合され得る。別の例では、Ｃａｓタンパク質は、２つのＮＬＳと融合させることができ、一方はＮ末端、もう一方はＣ末端で連結される。別の例では、Ｃａｓタンパク質は、３つのＮＬＳと融合させることができる。別の例では、Ｃａｓタンパク質は、ＮＬＳを伴わずに融合させることができる。いくつかの例では、ＮＬＳは、例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号５８）またはＰＫＫＫＲＲＶ（配列番号５９）などの単節型配列であり得る。いくつかの例では、ＮＬＳは、ヌクレオプラスミンのＮＬＳ、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫ（配列番号６０）などの双節型配列であり得る。特定の例では、単一ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号５８）ＮＬＳは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤のＣ末端で連結され得る。１つ以上のリンカーは、任意に融合部位に含まれる。

【０１５２】

Ｃａｓタンパク質はまた、細胞透過性ドメインまたはタンパク質導入ドメインに作動可能に連結され得る。例えば、細胞透過性ドメインは、ＨＩＶ－１　ＴＡＴタンパク質、ヒトＢ型肝炎ウイルスからのＴＬＭ細胞透過性モチーフ、ＭＰＧ、Ｐｅｐ－１、ＶＰ２２、単純ヘルペスウイルスからの細胞透過性ペプチド、またはポリアルギニンペプチド配列に由来し得る。例えば、ＷＯ２０１４／０８９２９０およびＷＯ２０１３／１７６７７２を参照されたく、それらの各々は、すべ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。細胞透過性ドメインは、Ｎ末端、Ｃ末端、またはＣａｓタンパク質内の任意の場所に位置し得る。

【０１５３】

Ｃａｓタンパク質はまた、追跡または精製を容易にするために、蛍光タンパク質、精製タグ、またはエピトープタグなどの異種ポリペプチドに作動可能に連結され得る。蛍光タンパク質の例には、緑色蛍光タンパク質（例えば、ＧＦＰ、ＧＦＰ－２、ｔａｇＧＦＰ、ｔｕｒｂｏＧＦＰ、ｅＧＦＰ、Ｅｍｅｒａｌｄ、Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、ＣｏｐＧＦＰ、ＡｃｅＧＦＰ、ＺｓＧｒｅｅｎｌ）、黄色蛍光タンパク質（例えば、ＹＦＰ、ｅＹＦＰ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、ＰｈｉＹＦＰ、ＺｓＹｅｌｌｏｗｌ）、青色蛍光タンパク質（例えば、ｅＢＦＰ、ｅＢＦＰ２、Ａｚｕｒｉｔｅ、ｍＫａｌａｍａｌ、ＧＦＰｕｖ、Ｓａｐｐｈｉｒｅ、Ｔ－ｓａｐｐｈｉｒｅ）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ｅＣＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ＣｙＰｅｔ、ＡｍＣｙａｎｌ、Ｍｉｄｏｒｉｉｓｈｉ－Ｃｙａｎ）、赤色蛍光タンパク質（例えば、ｍＫａｔｅ、ｍＫａｔｅ２、ｍＰｌｕｍ、ＤｓＲｅｄ単量体、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲＦＰ１、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ＨｃＲｅｄ－Ｔａｎｄｅｍ、ＨｃＲｅｄｌ、ＡｓＲｅｄ２、ｅｑＦＰ６１１、ｍＲａｓｐｂｅｒｒｙ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊｒｅｄ）、オレンジ色蛍光タンパク質（例えば

、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ｔｄＴｏｍａｔｏ）、および任意の他の好適な蛍光タンパク質が含まれる。タグの例には、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、キチン結合タンパク質（ＣＢＰ）、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン（ＴＲＸ）、ポリ（ＮＡＮＰ）、タンデムアフィニティー精製（ＴＡＰ）タグ、ｍｙｃ、ＡｃＶ５、ＡＵ１、ＡＵ５、Ｅ、ＥＣＳ、Ｅ２、ＦＬＡＧ、ヘマグルチニン（ＨＡ）、ｎｕｓ、Ｓｏｆｔａｇ １、Ｓｏｆｔａｇ ３、Ｓｔｒｅｐ、ＳＢＰ、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ、ＨＳＶ、ＫＴ３、Ｓ、Ｓ１、Ｔ７、Ｖ５、ＶＳＶ－Ｇ、ヒスチジン（Ｈｉｓ）、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（ＢＣＣＰ）、およびカルモジュリンが含まれる。

【０１５４】

Ｃａｓタンパク質は、標識された核酸に係留され得る。かかる係留（すなわち、物理的結合）は、共有相互作用または非共有相互作用を介して達成することができ、係留は、直接（例えば、タンパク質またはインテイン修飾上のシステインまたはリジン残基の修飾によって達成することができる直接融合または化学的結合を介して）、またはストレプトアビジンまたはアプタマーなどの１つ以上の介在するリンカーまたはアダプター分子を介して達成することができる。例えば、Ｐｉｅｒｃｅ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｍｉｎｉ Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．５（１）：４１－５５、Ｄｕｃｋｗｏｒｔｈ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．４６（４６）：８８１９－８８２２、Ｓｃｈａｅｆｆｅｒ ａｎｄ Ｄｉｘｏｎ（２００９）Ａｕｓｔｒａｌｉａｎ Ｊ．Ｃｈｅｍ．６２（１０）：１３２８－１３３２、Ｇｏｏｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２００９）Ｃｈｅｍｂｉｏｃｈｅｍ．１０（９）：１５５１－１５５７、およびＫｈａｔｗａｎｉ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２０（１４）：４５３２－４５３９を参照されたい。タンパク質－核酸コンジュゲートを合成するための非共有戦略には、ビオチン－ストレプトアビジンおよびニッケル－ヒスチジン法が含まれる。共有結合タンパク質－核酸複合体は、様々な化学物質を使用して適切に機能化された核酸とタンパク質を接続することによって合成できる。これらの化学物質のいくつかは、タンパク質表面のアミノ酸残基（例えば、リジンアミンまたはシステインチオール）へのオリゴヌクレオチドの直接結合を含むが、他のより複雑なスキームは、タンパク質の翻訳後修飾または触媒もしくは反応性タンパク質ドメインの関与を必要とする。タンパク質の核酸への共有結合の方法には、例えば、オリゴヌクレオチドのタンパク質リジンまたはシステイン残基への化学的架橋、発現されたタンパク質ライゲーション、化学酵素的方法、および光アプタマーの使用が含まれ得る。標識された核酸は、ＣａｓタンパクのＣ末端、Ｎ末端、または内部領域に係留され得る。一例では、標識された核酸は、ＣａｓタンパクのＣ末端またはＮ末端に係留される。同様に、Ｃａｓタンパク質は、標識された核酸の５’末端、３’末端、または内部領域に係留され得る。すなわち、標識された核酸は、任意の方向および極性で係留され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、標識された核酸の５’末端または３’末端に係留され得る。

【０１５５】

（２）転写活性化ドメイン

本明細書に開示されるキメラＣａｓタンパク質は、１つ以上の転写活性化ドメインを含むことができる。転写活性化ドメインには、ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、ガイドＲＮＡと複合される触媒的に不活性なＣａｓタンパク質）と組み合わせて、転写機構に直接またはコアクチベーターなどの他のタンパク質を介して接触することにより、プロモーターからの転写を活性化できる天然に存在する転写因子の領域が含まれる。転写活性化ドメインには、転写因子のかかる領域の機能的断片またはバリアント、および天然に存在する転写活性化ドメインに由来する、または標的遺伝子の転写を活性化するために人工的に作製もしくは合成される、操作された転写活性化ドメインも含まれる。機能的断片は、好適なＤＮＡ結合ドメインと作動可能に結合した場合に標的遺伝子の転写を活性化することができる断片である。機能的バリアントは、好適なＤＮＡ結合ドメインと作動可能に結合した場

合に標的遺伝子の転写を活性化することができるバリアントである。

【０１５６】

本明細書に開示されるキメラＣａｓタンパク質で使用するための特定の転写活性化ドメインは、ＶＰ６４転写活性化ドメインまたはその機能的断片もしくはバリアントを含む。ＶＰ６４は、単純ヘルペスＶＰ１６活性化ドメインからの最小活性化ドメインの四量体リピートである。例えば、転写活性化ドメインは、配列番号３に記載のＶＰ６４転写活性化ドメインタンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる。

【０１５７】

転写活性化ドメインの他の例には、単純ヘルペスウイルスＶＰ１６トランス活性化ドメイン、ＶＰ６４（単純ヘルペスウイルスＶＰ１６の４重タンデムリピート）、ＮＦ－κＢｐ６５（ＮＦ－κＢトランス活性化サブユニットｐ６５）活性化ドメイン、ＭｙｏＤ１トランス活性化ドメイン、ＨＳＦ１トランス活性化ドメイン（ヒト熱ショック因子１からのトランス活性化ドメイン）、ＲＴＡ（Ｅｐｓｔｅｉｎ　Ｂａｒｒウイルストランス活性化ドメイン）、ＳＥＴ７　／　９トランス活性化ドメイン、ｐ５３活性化ドメイン１、ｐ５３活性化ドメイン、２ａ　ＣＲＥＢ（ｃＡＭＰ応答要素結合タンパク質）活性化ドメイン、Ｅ２Ａ活性化ドメイン、ＮＦＡＴ（活性化Ｔ細胞の核因子）活性化ドメイン、ならびにそれらの機能的断片およびバリアントが含まれる。例えば、ＵＳ２０１６／０２９８１２５、ＵＳ２０１６／０２８１０７２、およびＷＯ２０１６／０４９２５８を参照されたく、それらの各々は、すべ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。転写活性化ドメインの他の例には、Ｇｃｎ４、ＭＬＬ、Ｒｔｇ３、Ｇｌｎ３、Ｏａｆ１、Ｐｉｐ２、Ｐｄｒ１、Ｐｄｒ３、Ｐｈｏ４、Ｌｅｕ３、ならびにそれらの機能的断片およびバリアントが含まれる。例えば、ＵＳ２０１６／０２９８１２５を参照されたく、すべ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。転写活性化ドメインのさらに他の例には、Ｓｐｌ、Ｖａｘ、ＧＡＴＡ４、ならびにそれらの機能的断片およびバリアントが含まれる。例えば、ＷＯ２０１６／１４９４８４を参照されたく、すべ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。他の例には、Ｏｃｔ１、Ｏｃｔ－２Ａ、ＡＰ－２、ＣＴＦ１、Ｐ３００、ＣＢＰ、ＰＣＡＦ、ＳＲＣ１、ＰｖＡＬＦ、ＥＲＦ－２、ＯｓＧＡＩ、ＨＡＬＦ－１、Ｃ１、ＡＰ１、ＡＲＦ－５、ＡＲＦ－６、ＡＲＦ－７、ＡＲＦ－８、ＣＰＲＦ１、ＣＰＲＦ４、ＭＹＣ－ＲＰ／ＧＰ、およびＴＲＡＢ１ＰＣ４からの活性化ドメイン、ならびにそれらの機能的断片およびバリアントが含まれる。例えば、ＵＳ２０１６／０２３７４５６、ＥＰ３０４５５３７、およびＷＯ２０１１／１４６１２１を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。追加の好適な転写活性化ドメインも即知である。例えば、ＷＯ２０１１／１４６１２１を参照されたく、すべ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。

【０１５８】

Ｂ．キメラアダプタータンパク質

本明細書の他の場所に開示されるガイドＲＮＡと結合することができるキメラアダプタータンパク質も提供される。本明細書に開示されるキメラアダプタータンパク質は、標的遺伝子の転写を活性化するために標的遺伝子内の標的配列に指向する転写活性化ドメインの数および多様性を増加させるために、ｄＣａｓ－相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）様システムで有用である。

【０１５９】

かかるキメラアダプタータンパク質は、（ａ）ガイドＲＮＡ内のアダプター結合要素に特異的に結合するアダプター（すなわち、アダプタードメインまたはアダプタータンパク質）、および（ｂ）１つ以上の異種転写活性化ドメインを含む。例えば、かかる融合タンパク質は、１、２、３、４、５、またはそれ以上の転写活性化ドメイン（例えば、２つ以上の異種転写活性化ドメインまたは３つ以上の異種転写活性化ドメイン）を含み得る。一

例では、かかるキメラアダプタータンパク質は、（ａ）ガイドＲＮＡのアダプター結合要素に特異的に結合するアダプター（すなわち、アダプタードメインまたはアダプタータンパク質）、および（ｂ）２つ以上の転写活性化ドメインを含み得る。例えば、キメラアダプタータンパク質は、（ａ）ガイドＲＮＡの１つ以上のＭＳ２アプタマー（例えば、ガイドＲＮＡの別々の位置にある２つのＭＳ２アプタマー）に特異的に結合するＭＳ２コートタンパク質アダプター、および（ｂ）１つ以上（例えば、２つ以上の転写活性化ドメイン）を含み得る。例えば、２つの転写活性化ドメインは、ｐ６５およびＨＳＦ１転写活性化ドメインまたはそれらの機能的断片もしくはバリアントであり得る。しかしながら、転写活性化ドメインが他の転写活性化ドメインまたはその機能的断片もしくはバリアントを含むキメラアダプタータンパク質もまた提供される。

【０１６０】

１つ以上の転写活性化ドメインは、アダプターに直接融合され得る。代替的に、１つ以上の転写活性化ドメインは、リンカーもしくはリンカーの組み合わせを介して、または１つ以上の追加のドメインを介してアダプターに連結され得る。同様に、２つ以上の転写活性化ドメインが存在する場合、それらは互いに直接融合され得るか、またはリンカーもしくはリンカーの組み合わせを介して、または１つ以上の追加のドメインを介して互いに連結され得る。これらの融合タンパク質で使用され得るリンカーには、融合タンパク質の機能を干渉しない任意の配列を含み得る。例示的なリンカーは短く（例えば、２～２０アミノ酸）、典型的には、柔軟である（例えば、グリシン、アラニン、およびセリンなどの自由度の高いアミノ酸を含む）。リンカーのいくつかの特定の例は、ＧＧＧＳ（配列番号４）またはＧＧＧＧＳ（配列番号５）からなる１つ以上のユニット、例えば、任意の組み合わせでのＧＧＧＳ（配列番号４）またはＧＧＧＧＳ（配列番号５）の２、３、４、またはそれ以上の繰り返しを含む。他のリンカー配列も使用できる。

【０１６１】

１つ以上の転写活性化ドメインおよびアダプターは、キメラアダプタータンパク質内で任意の順序であり得る。１つの選択肢として、１つ以上の転写活性化ドメインは、アダプターのＣ末端であり得、アダプターは、１つ以上の転写活性化ドメインのＮ末端であり得る。例えば、１つ以上の転写活性化ドメインは、キメラアダプタータンパク質のＣ末端にあり得、アダプターは、キメラアダプタータンパク質のＮ末端にあり得る。しかしながら、１つ以上の転写活性化ドメインは、キメラアダプタータンパク質のＣ末端になくても、アダプターのＣ末端であり得る（例えば、核局在化シグナルがキメラアダプタータンパク質のＣ末端にある場合）。同様に、アダプターは、キメラアダプタータンパク質のＮ末端になくても、１つ以上の転写活性化ドメインのＮ末端であり得る（例えば、核局在化シグナルがキメラアダプタータンパク質のＮ末端にある場合）。別の選択肢として、１つ以上の転写活性化ドメインは、アダプターのＮ末端であり得、アダプターは、１つ以上の転写活性化ドメインのＣ末端であり得る。例えば、１つ以上の転写活性化ドメインは、キメラアダプタータンパク質のＮ末端にあり得、アダプターは、キメラアダプタータンパク質のＣ末端にあり得る。さらに別の選択肢として、キメラアダプタータンパク質が２つ以上の転写活性化ドメインを含む場合、２つ以上の転写活性化ドメインは、アダプターに隣接し得る。

【０１６２】

キメラアダプタータンパク質はまた、追加の異種ポリペプチドに作動可能に連結または融合され得る。融合または連結された異種ポリペプチドは、Ｎ末端、Ｃ末端、またはキメラアダプタータンパク質の内部の任意の場所に位置し得る。例えば、キメラアダプタータンパク質は、核局在化シグナルをさらに含み得る。そのようなタンパク質の特定の例は、ＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）のｐ６５転写活性化ドメインのＣ末端、およびｐ６５転写活性化ドメインのＨＳＦ１転写活性化ドメインのＣ末端に（直接またはＮＬＳを介してのいずれかで）連結されたＭＳ２コートタンパク質（アダプター）を含む。かかるタンパク質は、Ｎ末端からＣ末端に、ＭＣＰ、核局在化シグナル、ｐ６５転写活性化ドメイン、およびＨＳＦ１転写活性化ドメインを含み得る。例えば、キメラアダプタータンパク質

は、配列番号６に示されるＭＣＰ－ｐ６５－ＨＳＦ１キメラアダプタータンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。

【０１６３】

キメラアダプタータンパク質はまた、細胞内局在化を提供する１つ以上の異種ポリペプチドに融合または連結することができる。かかる異種ポリペプチドには、例えば、核を標的とするためのＳＶ４０　ＮＬＳおよび／またはアルファ－インポーチンＮＬＳなどの１つ以上の核局在化シグナル（ＮＬＳ）、ミトコンドリアを標的とするためのミトコンドリア局在化シグナル、ＥＲ保持シグナルなどが含まれ得る。例えば、Ｌａｎｇｅ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８２（８）：５１０１－５１０５を参照されたく、すべ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。かかる細胞内局在化シグナルは、Ｎ末端、Ｃ末端、またはＣａｓタンパク質内の任意の場所に位置し得る（例えば、キメラアダプタータンパク質のアダプタータンパク質構成要素のＣ末端もしくはＮ末端、またはキメラアダプタータンパク質の転写活性化因子ドメイン構成要素のＣ末端もしくはＮ末端）ＮＬＳは、例えば、一続きの塩基性アミノ酸を含むことができ、単節型配列または双節型配列であり得る。任意に、キメラアダプタータンパク質は、Ｎ末端にＮＬＳ（例えば、アルファインポーチンＮＬＳ）および／またはＣ末端にＮＬＳ（例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ）を含む２つ以上のＮＬＳを含む。キメラアダプタータンパク質はまた、Ｎ末端に２つ以上のＮＬＳおよび／またはＣ末端に２つ以上のＮＬＳを含み得る。

【０１６４】

一例では、キメラアダプタータンパク質は、１～１０個のＮＬＳ、１～５個のＮＬＳ、または１個のＮＬＳと融合させることができる。１つのＮＬＳが使用される場合、ＮＬＳは、キメラアダプタータンパク質配列のＮ末端またはＣ末端で連結され得る。また、キメラアダプタータンパク質配列の内部に挿入することもできる。他の例では、キメラアダプタータンパク質は、１つを超えるＮＬＳと融合させることができる。例えば、キメラアダプタータンパク質は、２、３、４、または５つのＮＬＳと融合させるか、２つのＮＬＳと融合させることができる。特定の状況では、２つのＮＬＳが、同じ（例えば、２つのＳＶ４０　ＮＬＳ）であるか、または異なり得る。例えば、キメラアダプタータンパク質は、カルボキシ末端で連結される２つのＳＶ４０　ＮＬＳ配列と融合され得る。別の例では、キメラアダプタータンパク質は、２つのＮＬＳと融合させることができ、一方はＮ末端、もう一方はＣ末端で連結される。別の例では、キメラアダプタータンパク質は、３つのＮＬＳと融合させることができる。別の例では、キメラアダプタータンパク質は、ＮＬＳを伴わずに融合させることができる。いくつかの例では、ＮＬＳは、例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号５８）またはＰＫＫＫＲＲＶ（配列番号５９）などの単節型配列であり得る。いくつかの例では、ＮＬＳは、ヌクレオプラスミンのＮＬＳ、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号６０）などの双節型配列であり得る。特定の例では、単一ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号５８）ＮＬＳは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤のＣ末端で連結され得る。１つ以上のリンカーは、任意に融合部位に含まれる。

【０１６５】

キメラアダプタータンパク質はまた、細胞透過性ドメインまたはタンパク質導入ドメインに作動可能に連結され得る。例えば、細胞透過性ドメインは、ＨＩＶ－１　ＴＡＴタンパク質、ヒトＢ型肝炎ウイルスからのＴＬＭ細胞透過性モチーフ、ＭＰＧ、Ｐｅｐ－１、ＶＰ２２、単純ヘルペスウイルスからの細胞透過性ペプチド、またはポリアルギニンペプチド配列に由来し得る。例えば、ＷＯ２０１４／０８９２９０およびＷＯ２０１３／１７６７７２を参照されたく、それらの各々は、すべ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。別の例として、キメラアダプタータンパク質を異種ポリペプチド融合または連結して、安定性の増加または減少を提供することができる。

【０１６６】

キメラアダプタータンパク質はまた、追跡または精製を容易にするために、蛍光タンパク質、精製タグ、またはエピトープタグなどの異種ポリペプチドに作動可能に連結され得る。蛍光タンパク質の例には、緑色蛍光タンパク質（例えば、ＧＦＰ、ＧＦＰ－２、ｔａｇＧＦＰ、ｔｕｒｂｏＧＦＰ、ｅＧＦＰ、Ｅｍｅｒａｌｄ、Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ａｚａｍｉ　Ｇｒｅｅｎ、ＣｏｐＧＦＰ、ＡｃｅＧＦＰ、ＺｓＧｒｅｅｎｌ）、黄色蛍光タンパク質（例えば、ＹＦＰ、ｅＹＦＰ、Ｃｉｔｒｉｎｅ、Ｖｅｎｕｓ、ＹＰｅｔ、ＰｈｉＹＦＰ、ＺｓＹｅｌｌｏｗｌ）、青色蛍光タンパク質（例えば、ｅＢＦＰ、ｅＢＦＰ２、Ａｚｕｒｉｔｅ、ｍＫａｌａｍａｌ、ＧＦＰｕｖ、Ｓａｐｐｈｉｒｅ、Ｔ－ｓａｐｐｈｉｒｅ）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ｅＣＦＰ、Ｃｅｒｕｌｅａｎ、ＣｙＰｅｔ、ＡｍＣｙａｎｌ、Ｍｉｄｏｒｉｉｓｈｉ－Ｃｙａｎ）、赤色蛍光タンパク質（例えば、ｍＫａｔｅ、ｍＫａｔｅ２、ｍＰｌｕｍ、ＤｓＲｅｄ単量体、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲＦＰ１、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ＨｃＲｅｄ－Ｔａｎｄｅｍ、ＨｃＲｅｄｌ、ＡｓＲｅｄ２、ｅｑＦＰ６１１、ｍＲａｓｐｂｅｒｒｙ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊｒｅｄ）、オレンジ色蛍光タンパク質（例えば、ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ｔｄＴｏｍａｔｏ）、および任意の他の好適な蛍光タンパク質が含まれる。タグの例には、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、キチン結合タンパク質（ＣＢＰ）、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン（ＴＲＸ）、ポリ（ＮＡＮＰ）、タンデムアフィニティー精製（ＴＡＰ）タグ、ｍｙｃ、ＡｃＶ５、ＡＵ１、ＡＵ５、Ｅ、ＥＣＳ、Ｅ２、ＦＬＡＧ、ヘマグルチニン（ＨＡ）、ｎｕｓ、Ｓｏｆｔａｇ　１、Ｓｏｆｔａｇ　３、Ｓｔｒｅｐ、ＳＢＰ、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ、ＨＳＶ、ＫＴ３、Ｓ、Ｓ１、Ｔ７、Ｖ５、ＶＳＶ－Ｇ、ヒスチジン（Ｈｉｓ）、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（ＢＣＣＰ）、およびカルモジュリンが含まれる。

【０１６７】

キメラアダプタータンパク質は、標識された核酸に係留され得る。かかる係留（すなわち、物理的結合）は、共有相互作用または非共有相互作用を介して達成することができ、係留は、直接（例えば、タンパク質またはインテイン修飾上のシステインまたはリジン残基の修飾によって達成することができる直接融合または化学的結合を介して）、またはストレプトアビジンまたはアプタマーなどの１つ以上の介在するリンカーまたはアダプター分子を介して達成することができる。例えば、Ｐｉｅｒｃｅ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ｍｉｎｉ　Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．５（１）：４１－５５、Ｄｕｃｋｗｏｒｔｈ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．４６（４６）：８８１９－８８２２、Ｓｃｈａｅｆｆｅｒ　ａｎｄ　Ｄｉｘｏｎ（２００９）Ａｕｓｔｒａｌｉａｎ　Ｊ．Ｃｈｅｍ．６２（１０）：１３２８－１３３２、Ｇｏｏｄｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００９）Ｃｈｅｍｂｉｏｃｈｅｍ．１０（９）：１５５１－１５５７、およびＫｈａｔｗａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２０（１４）：４５３２－４５３９を参照されたく、すべての目的のためにそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。タンパク質－核酸コンジュゲートを合成するための非共有戦略には、ビオチン－ストレプトアビジンおよびニッケル－ヒスチジン法が含まれる。共有結合タンパク質－核酸コンジュゲートは、様々な化学物質を使用して適切に機能化された核酸とタンパク質を接続することによって合成できる。これらの化学物質のいくつかは、タンパク質表面のアミノ酸残基（例えば、リジンアミンまたはシステインチオール）へのオリゴヌクレオチドの直接結合を含むが、他のより複雑なスキームは、タンパク質の翻訳後修飾または触媒もしくは反応性タンパク質ドメインの関与を必要とする。タンパク質の核酸への共有結合の方法には、例えば、オリゴヌクレオチドのタンパク質リジンまたはシステイン残基への化学的架橋、発現されたタンパク質ライゲーション、化学酵素的方法、および光アプタマーの使用が含まれ得る。標識された核酸は、キメラアダプタータンパク質のＣ末端、Ｎ末端、または内部領域に係留され得る。同様に、キメラアダプタータンパク質は、標識された核酸の５’末端、３’末端、または内部領域に係留され得る

。すなわち、標識された核酸は、任意の方向および極性で係留され得る。

【０１６８】

キメラアダプタータンパク質は、任意の形態で提供され得る。例えば、キメラアダプタータンパク質は、ｇＲＮＡと複合体を形成したキメラアダプタータンパク質などのタンパク質の形態で提供され得る。代替的に、キメラアダプタータンパク質は、ＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））またはＤＮＡなどの、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸の形態で提供され得る。特定の例では、キメラアダプタータンパク質は、キメラＣａｓタンパク質もコードするマルチシストロン性またはバイシストロン性ｍＲＮＡなどのｍＲＮＡ（例えば、インビトロで転写されたｍＲＮＡ）として提供することができる。任意に、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸は、特定の細胞または生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化することができる。例えば、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸は、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、真核細胞、非ヒト真核細胞、動物細胞、非ヒト動物細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、齧歯動物細胞、マウス細胞、ラット細胞、または任意の他の目的の宿主細胞においてより頻度高く使用される代替コドンへと修飾することができる。キメラアダプタータンパク質をコードする核酸が細胞に導入されると、キメラアダプタータンパク質は、一時的、条件付き、または構成的に細胞内で発現され得る。

【０１６９】

キメラｍＲＮＡとして提供されるアダプタータンパク質は、安定性および／または免疫原性の特性を改善するために修飾することができる。修飾は、ｍＲＮＡ内の１つ以上のヌクレオシドに対して行われ得る。ｍＲＮＡ核酸塩基への化学修飾の例には、シュードウリジン、１－メチル－シュードウリジン、および５－メチル－シチジンが含まれる。キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡもキャップすることができる。キャップは、例えば、＋１リボヌクレオチドがリボースの２’Ｏ位置でメチル化されているキャップ１構造であり得る。キャッピングは、例えば、インビボで優れた活性を与えることができ（例えば、天然のキャップを模倣することによって）、宿主の自然免疫系の刺激を低減する自然な構造をもたらすことができる（例えば、自然免疫系のパターン認識受容体の活性化を減少させることができる）。キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡは、ポリアデニル化することもできる（ポリ（Ａ）テイルを構成するため）。キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンを含むように修飾することもできる（例えば、シュードウリジンで完全に置換することができる）。例えば、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むキャップされポリアデニル化されたキメラアダプターｍＲＮＡを使用することができる。同様に、キメラアダプターｍＲＮＡは、同義コドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。他の可能な修飾は、本明細書の他の場所でより詳細に記載される。

【０１７０】

キメラｍＲＮＡとして提供されるアダプタータンパク質は、安定性および／または免疫原性の特性を改善するために修飾することができる。修飾は、ｍＲＮＡ内の１つ以上のヌクレオシドに対して行われ得る。ｍＲＮＡ核酸塩基への化学修飾の例には、シュードウリジン、１－メチル－シュードウリジン、および５－メチル－シチジンが含まれる。キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡもキャップすることができる。キャップは、例えば、＋１リボヌクレオチドがリボースの２’Ｏ位置でメチル化されているキャップ１構造であり得る。キャッピングは、例えば、インビボで優れた活性を与えることができ（例えば、天然のキャップを模倣することによって）、宿主の自然免疫系の刺激を低減する自然な構造をもたらすことができる（例えば、自然免疫系のパターン認識受容体の活性化を減少させることができる）。キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡは、ポリアデニル化することもできる（ポリ（Ａ）テイルを構成するため）。キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡは、シュードウリジンを含むように修飾することもできる（例えば、シュードウリジンで完全に置換することができる）。例えば、Ｎ１－メチル

シュードウリジンを含むキャップされポリアデニル化されたキメラアダプターｍＲＮＡを使用することができる。同様に、キメラアダプターｍＲＮＡは、同義コドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。

【０１７１】

キメラアダプターｍＲＮＡは、少なくとも１つ、複数、またはすべてのウリジン位置で修飾されたウリジンを含むことができる。修飾されたウリジンは、５位で修飾されたウリジンであり得る（例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで）。修飾されたウリジンは、１位で修飾されたシュードウリジンであり得る（例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで）。修飾されたウリジンは、例えば、シュードウリジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン、５－メトキシウリジン、５－ヨードウリジン、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、５－メトキシウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、５－ヨードウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、Ｎ１－メチル－シュードウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンおよび５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチルシュードウリジンおよび５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、５－ヨードウリジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンおよび５－ヨードウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンおよび５－メトキシウリジンの組み合わせである。

【０１７２】

本明細書に開示されるキメラアダプターｍＲＮＡはまた、Ｃａｐ０、Ｃａｐｌ、またはＣａｐ２などの５’キャップを含み得る。５’キャップは通常、ｍＲＮＡの５’から３’鎖の第１のヌクレオチドの５’位置（すなわち、第１のキャップ近位ヌクレオチド）と５’－トリホスフェートを介して連結した７－メチルグアニンリボヌクレオチド（例えば、ＡＲＣＡに関してさらに修飾され得る）である。Ｃａｐ０では、ｍＲＮＡの第１および第２のキャップ近位ヌクレオチドのリボースの両方が、２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐｌでは、ｍＲＮＡの第１および第２の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ２’－メトキシおよび２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐ２では、ｍＲＮＡの第１および第２のキャップ近位ヌクレオチドのリボースの両方が、２’－メトキシを含む。例えば、Ｋａｔｉｂａｈ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１１（３３）：１２０２５－３０、およびＡｂｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１４（１１）：Ｅ２１０６－Ｅ２１１５を参照されたく、それらの各々は、すべ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。ヒトｍＲＮＡなどの哺乳動物ｍＲＮＡを含む大部分の内因性高等真核生物ｍＲＮＡは、ＣａｐｌまたはＣａｐ２を含む。ＣａｐｌおよびＣａｐ２とは異なるＣａｐ０および他のキャップ構造は、ＩＦＩＴ－１およびＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の構成要素によって非自己として認識されるため、ヒトなどの哺乳動物では免疫原性であり得、これはＩ型インターフェロンを含む上昇したサイトカインレベルをもたらし得る。ＩＦＩＴ－１およびＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の構成要素もまた、ｍＲＮＡとＣａｐｌまたはＣａｐ２以外のキャップとの結合についてｅＩＦ４Ｅと競合し得、ｍＲＮＡの翻訳を阻害する可能性がある。

【０１７３】

キャップは、共転写性を含み得る。例えば、ＡＲＣＡ（抗逆転キャップ類似体；Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＡＭ８０４５）は、開始時に転写物にインビトロで組み込むことができる、グアニンリボヌクレオチドの５’位置と連結した７－メチルグアニン３’－メトキシ－５’－トリホスフェートを含むキャップ類似体である。ＡＲＣＡは、第１のキャップ近位ヌクレオチドの２’位置がヒドロキシルであ

るＣａｐ０キャップをもたらす。例えば、Ｓｔｅｐｉｎｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）ＲＮＡ　７：１４８６－１４９５を参照されたく、すべ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。

【０１７４】

ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｎ－７１１３）またはＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧ；ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｎ－７１３３）は、共転写性Ｃａｐｌ構造を提供するために使用され得る。ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧおよびＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧの３’－Ｏ－メチル化バージョンは、ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｎ－７４１３およびＮ－７４３３でそれぞれ入手可能である。

【０１７５】

代替的に、キャップは、転写後にＲＮＡに追加することもできる。例えば、ワクシニアキャッピング酵素は市販されており（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｍ２０８０Ｓ）、そのＤ１サブユニットによって提供されるＲＮＡトリホスファターゼおよびグアニリルトランスフェラーゼ活性と、そのＤ１２サブユニットによって提供されるグアニンメチルトランスフェラーゼと、を有する。そのため、Ｓ－アデノシルメチオニンおよびＧＴＰの存在下で、ＲＮＡに７－メチルグアニンを付加してＣａｐ０を付与することができる。例えば、Ｇｕｏ　ａｎｄ　Ｍｏｓｓ（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８７：４０２３－４０２７、およびＭａｏ　ａｎｄ　Ｓｈｕｍａｎ（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：２４４７２－２４４７９を参照されたく、それらの各々は、すべ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。

【０１７６】

キメラアダプターｍＲＮＡは、ポリアデニル化（ポリＡ）テイルをさらに含むことができる。ポリＡテイルは、例えば、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、または少なくとも１００のアデニン、任意に、最大３００のアデニンを含むことができる。例えば、ポリＡテイルは、９５、９６、９７、９８、９９、または１００のアデニンヌクレオチドを含むことができる。

【０１７７】

キメラアダプタータンパク質をコードする核酸は、細胞のゲノムにおいて安定して組み込まれ、細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結され得る。代替的に、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸は、発現構築物中のプロモーターに作動可能に連結され得る。発現構築物は、遺伝子または他の目的の核酸配列（例えば、キメラアダプター遺伝子）の発現を指示することができ、かつそのような目的の核酸配列を標的細胞に移すことができる任意の核酸構築物を含む。例えば、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸は、ｇＲＮＡおよび／またはキメラＣａｓタンパク質をコードするＤＮＡを含むベクター内に存在し得る。代替的に、それは、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡまたはキメラＣａｓタンパク質をコードするＤＮＡを含むベクターとは別のベクターまたはプラスミドであり得る。発現構築物において使用することができるプロモーターには、例えば、真核細胞、非ヒト真核細胞、動物細胞、非ヒト動物細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、齧歯動物細胞、マウス細胞、ラット細胞、多能性細胞、胚性幹（ＥＳ）細胞、成体幹細胞、発生が制限された前駆細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、または１細胞期胚のうちの１つ以上において活性なプロモーターが含まれる。そのようなプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターであり得る。任意に、プロモーターは、双方向性プロモーターであり得る。かかる双方向プロモーターは、（１）遠位配列要素（ＤＳＥ）、近位配列要素（ＰＳＥ）、およびＴＡＴＡボックスの３つの外部制御要素を含む完全な従来の

一方向Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター、ならびに（２）ＤＳＥの５’末端に逆方向に融合されたＰＳＥおよびＴＡＴＡボックスを含む第２の基本的なＰｏｌ　ＩＩＩプロモーターで構成され得る。例えば、Ｈ１プロモーターでは、ＤＳＥはＰＳＥとＴＡＴＡボックスに隣接しており、プロモーターは、Ｕ６プロモーターに由来するＰＳＥおよびＴＡＴＡボックスを追加することによって逆方向の転写が制御されるハイブリッドプロモーターを作製することにより、双方向にすることができる。例えば、ＵＳ２０１６／００７４５３５を参照されたく、すべ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。

【０１７８】

（１）アダプター

アダプター（すなわち、アダプタードメインまたはアダプタータンパク質）は、別個の配列を特異的に認識および結合する（例えば、配列特異的様式でのアプタマーなどの別個のＤＮＡおよび／またはＲＮＡ配列に結合する）核酸結合ドメイン（例えば、ＤＮＡ結合ドメインおよび／またはＲＮＡ結合ドメイン）である。アプタマーには、特定の三次元立体配座を採用する能力を通じて、高い親和性および特異性で標的分子に結合し得る核酸が含まれる。そのようなアダプターは、例えば、特定のＲＮＡ配列および二次構造に結合し得る。これらの配列（すなわち、アダプター結合要素）は、ガイドＲＮＡに操作され得る。例えば、ＭＳ２アプタマーは、ＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）に特異的に結合するようにガイドＲＮＡに操作され得る。例えば、アダプターは、配列番号７に示されるＭＣＰ配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。

【０１７９】

アダプターおよび標的のいくつかの特定の例には、バクテリオファージコートタンパク質の多様性の中に存在するＲＮＡ結合タンパク質／アプタマーの組み合わせが含まれる。例えば、ＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）、ＰＰ７、Ｑβ、Ｆ２、ＧＡ、ｆｒ、ＪＰ５０、Ｍ１２、Ｒ１７、ＢＺ１３、ＪＰ３４、ＪＰ５００、ＫＵ１、Ｍ１ｌ、ＭＸ１、ＴＷ１８、ＶＫ、ＳＰ、ＦＩ、ＩＤ２、ＮＬ９５、ＴＷ１９、ＡＰ２０５、ΦＣｂ５、ΦＣｂ８ｒ、ΦＣｂ１２ｒ、ΦＣｂ２３ｒ、７ｓ、およびＰＲＲ１のアダプタータンパク質またはその機能的断片もしくはバリアントを使用することができる。例えば、ＷＯ２０１６／０４９２５８を参照されたく、すべ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。アダプタータンパク質の機能的断片または機能的バリアントは、特異的なアダプター結合要素と結合する能力（例えば、配列特異的な様式で特異的なアダプター結合配列と結合する能力）を保持するものである。例えば、アミノ酸６８～６９がＳＧに変異し、アミノ酸７０～７５が野生型タンパク質から削除されている、ＰＰ７　Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓバクテリオファージコートタンパク質バリアントを使用することができる。例えば、Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１０２（１２）：２９３６－２９４４、およびＣｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５（１）：１０３－１０５を参照されたく、それらの各々は、すべ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。同様に、Ｎ５５Ｋ変異などのＭＣＰバリアントを使用することもできる。例えば、Ｓｐｉｎｇｏｌａ　ａｎｄ　Ｐｅａｂｏｄｙ（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９（１２）：９００６－９０１０を参照されたく、すべ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。

【０１８０】

使用できるアダプタータンパク質の他の例には、エンドリボヌクレアーゼＣｓｙ４またはラムダＮタンパク質の全体または一部（例えば、ＤＮＡ結合形態）が含まれる。例えば、ＵＳ２０１６／０３１２１９８を参照されたく、すべ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。

【０１８１】

（２）転写活性化ドメイン

本明細書に開示されるキメラアダプタータンパク質は、１つ以上の転写活性化ドメイン

を含む。かかる転写活性化ドメインは、天然に存在する転写活性化ドメインであり得るか、天然に存在する転写活性化ドメインの機能的断片もしくは機能的バリアントであり得るか、または操作もしくは合成転写活性化ドメインであり得る。使用できる転写活性化ドメインには、本明細書の他の場所でキメラＣａｓタンパク質で使用するために記載されたものが含まれる。

【０１８２】

本明細書に開示されるキメラアダプタータンパク質で使用するための特定の転写活性化ドメインは、ｐ６５および／もしくはＨＳＦ１転写活性化ドメインまたはその機能的断片もしくはバリアントを含む。ＨＳＦ１転写活性化ドメインは、ヒト熱ショック因子１（ＨＳＦ１）の転写活性化ドメインであり得る。ｐ６５転写活性化ドメインは、ＲＥＬＡ遺伝子によってコードされる核因子ＮＦ－カッパ－Ｂｐ６５サブユニットとしても知られる、転写因子ｐ６５の転写活性化ドメインであり得る。一例として、転写活性化ドメインは、配列番号８に記載のｐ６５転写活性化ドメインタンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる。別の例として、転写活性化ドメインは、配列番号９に記載のＨＳＦ１転写活性化ドメインタンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる。

【０１８３】

Ｃ．ＳＡＭガイドＲＮＡ

標的遺伝子の転写を活性化するために本明細書の他の場所に開示されるキメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質と結合することができるガイドＲＮＡも提供される。

【０１８４】

１つ以上のガイドＲＮＡが、本明細書に開示される方法または組成物において使用され得る。例えば、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上のガイドＲＮＡが使用され得る。２つ以上のガイドＲＮＡは、単一標的遺伝子における異なる標的配列を標的とすることができる。例えば、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上のガイドＲＮＡは、各々、単一標的遺伝子における異なる標的配列を標的とすることができる。同様に、ガイドＲＮＡは、複数の標的遺伝子（例えば、２つ以上、３つ以上、４つ以上、または５つ以上の標的遺伝子）を標的とすることができる。ガイドＲＮＡ標的配列の例は、本明細書の他の場所に開示される。

【０１８５】

（１）ガイドＲＮＡ

「ガイドＲＮＡ」または「ｇＲＮＡ」は、Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９タンパク質）に結合し、かつＣａｓタンパク質を標的ＤＮＡ内の特定の位置に標的化するＲＮＡ分子である。ガイドＲＮＡは、「ＤＮＡ標的化セグメント」（「ガイド配列」とも呼ばれる）および「タンパク質結合セグメント」の２つのセグメントを含み得る。「セグメント」は、ＲＮＡ中のヌクレオチドの連続したストレッチなどの、分子のセクションまたは領域を含む。Ｃａｓ９のものなど、いくつかのｇＲＮＡは、「アクチベーターＲＮＡ」（例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ）および「ターゲッターＲＮＡ」（例えば、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡまたはｃｒＲＮＡ）の２つの別個のＲＮＡ分子を含み得る。他のｇＲＮＡは、単一ＲＮＡ分子（単一ＲＮＡポリヌクレオチド）であり、これはまた「単一分子ｇＲＮＡ」、「単一ガイドＲＮＡ」、または「ｓｇＲＮＡ」と呼ばれ得る。例えば、ＷＯ２０１３／１７６７７２、ＷＯ２０１４／０６５５９６、ＷＯ２０１４／０８９２９０、ＷＯ２０１４／０９３６２２、ＷＯ２０１４／０９９７５０、ＷＯ２０１３／１４２５７８、およびＷＯ２０１４／１３１８３３を参照されたく、それらの各々は、すべ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。ガイドＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）またはｃｒＲＮＡおよびトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ

）の組み合わせのいずれかを指す。ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡは、単一ＲＮＡ分子（シングルガイドＲＮＡまたはｓｇＲＮＡ）として、または２つの別個のＲＮＡ分子（デュアルガイドＲＮＡまたはｄｇＲＮＡ）として関連付けることができる。例えば、Ｃａｓ９の場合、シングルガイドＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡに（例えば、リンカーを介して）融合したｃｒＲＮＡを含むことができる。例えば、Ｃｐｆ１の場合、標的配列への結合を達成するためにｃｒＲＮＡのみが必要とされる。「ガイドＲＮＡ」および「ｇＲＮＡ」という用語は、二重分子（すなわち、モジュラー）ｇＲＮＡおよび単一分子ｇＲＮＡの両方を含む。本明細書に開示されるいくつかの方法および組成物では、Ｃ５　ｇＲＮＡは、Ｓ．　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９　ｇＲＮＡまたはその同等物である。本明細書に開示されるいくつかの方法および組成物では、Ｃ５　ｇＲＮＡは、Ｓ．　ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９　ｇＲＮＡまたはその同等物である。

【０１８６】

例示的な２分子ｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ様（「ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」または「ターゲッターＲＮＡ」または「ｃｒＲＮＡ」または「ｃｒＲＮＡリピート」）分子および対応するｔｒａｃｒＲＮＡ様（「トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」または「アクチベーターＲＮＡ」または「ｔｒａｃｒＲＮＡ」）分子を含む。ｃｒＲＮＡは、ｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント（一本鎖）、およびｇＲＮＡのタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二重鎖の半分を形成するヌクレオチドのストレッチの両方を含む。ＤＮＡ標的化セグメントの下流（３’）に位置するｃｒＲＮＡテイルの例は、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵ（配列番号１０）を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。本明細書に開示されるＤＮＡ標的化セグメントのいずれも、配列番号１０の５’末端に結合して、ｃｒＲＮＡを形成することができる。

【０１８７】

対応するｔｒａｃｒＲＮＡ（アクチベーターＲＮＡ）は、ｇＲＮＡのタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二重鎖の残りの半分を形成するヌクレオチドのストレッチを含む。ｃｒＲＮＡのヌクレオチドのストレッチは、ｔｒａｃｒＲＮＡのヌクレオチドのストレッチと相補的であり、それをハイブリダイズして、ｇＲＮＡのタンパク質結合ドメインのｄｓＲＮＡ二重鎖を形成する。したがって、各ｃｒＲＮＡは、対応するｔｒａｃｒＲＮＡを有すると言われ得る。ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の例は、ＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ（配列番号１１）、ＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵＵ（配列番号５０）、またはＧＵＵＧＧＡＡＣＣＡＵＵＣＡＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（配列番号５１）のうちのいずれか１つを含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。

【０１８８】

ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡの両方が必要とされる系では、ｃｒＲＮＡおよび対応するｔｒａｃｒＲＮＡは、ハイブリダイズしてｇＲＮＡを形成する。ｃｒＲＮＡのみが必要とされる系では、ｃｒＲＮＡは、ｇＲＮＡであり得る。ｃｒＲＮＡはさらに、標的ＤＮＡの相補鎖にハイブリダイズする一本鎖ＤＮＡ標的化セグメントを提供する。細胞内での修飾に使用される場合、所与のｃｒＲＮＡまたはｔｒａｃｒＲＮＡ分子の正確な配列は、ＲＮＡ分子が使用される種に特異的になるように設計され得る。例えば、Ｍａｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３３９（６１２１）：８２３－８２６、Ｊｉｎｅｋ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３３７（６０９６）：８１６－８２１、Ｈｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１（３）：２２７－２２９、Ｊｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１（３）：２３３－２３９、およびＣｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３３９（６１２１）：８１９－８２３を参照されたく、それらの各々は、すべ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。

【０１８９】
所与のｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント（ｃｒＲＮＡ）は、以下により詳細に記載されるように、標的ＤＮＡの相補鎖上の配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。ｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対合）を介して配列特異的様式で標的ＤＮＡと相互作用する。したがって、ＤＮＡ標的化セグメントのヌクレオチド配列は変化してもよく、ｇＲＮＡおよび標的ＤＮＡが相互作用する標的ＤＮＡ内の位置を決定する。目的のｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントは、標的ＤＮＡ内の任意の所望の配列にハイブリダイズするように修飾され得る。天然発生型ｃｒＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系および生物によって異なるが、２１～４６ヌクレオチドの長さの２つのダイレクトリピート（ＤＲ）が隣接する、２１～７２ヌクレオチド長の標的化セグメントを含むことが多い（例えば、ＷＯ２０１４／１３１８３３を参照されたく、すべ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）。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓの場合、ＤＲは３６ヌクレオチド長であり、標的化セグメントは３０ヌクレオチド長である。３’に位置するＤＲは、対応するｔｒａｃｒＲＮＡと相補的であり、それをハイブリダイズし、それは順にＣａｓタンパク質と結合する。

【０１９０】
ＤＮＡ標的化セグメントは、例えば、少なくとも約１２、１５、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、または４０ヌクレオチドの長さを有し得る。そのようなＤＮＡ標的化セグメントは、例えば、約１２～約１００、約１２～約８０、約１２～約５０、約１２～約４０、約１２～約３０、約１２～約２５、または約１２～約２０ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、ＤＮＡ標的化セグメントは、約１５～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７～約２０ヌクレオチド、または約１７、１８、１９、もしくは２０ヌクレオチド）であり得る。例えば、ＵＳ２０１６／００２４５２３を参照されたく、すべ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。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９の場合、典型的なＤＮＡ標的化セグメントは、１６～２０ヌクレオチド長、または１７～２０ヌクレオチド長である。Ｓ．ａｕｒｅｕｓ由来のＣａｓ９の場合、典型的なＤＮＡ標的化セグメントは、２１～２３ヌクレオチド長である。Ｃｐｆ１の場合、典型的なＤＮＡ標的化セグメントは、少なくとも１６ヌクレオチド長または少なくとも１８ヌクレオチド長である。

【０１９１】
一例では、ＤＮＡ標的化セグメントは、約２０ヌクレオチド長であり得る。しかしながら、より短いおよびより長い配列が、標的セグメントに使用され得る（例えば、１５～２５ヌクレオチド長、例えば、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチド長）。ＤＮＡ標的化セグメントと対応するガイドＲＮＡ標的配列との間の同一性の程度（またはＤＮＡ標的化セグメントとガイドＲＮＡ標的配列の他の鎖との間の相補性の程度）は、例えば、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約１００％であり得る。ＤＮＡ標的化セグメントおよび対応するガイドＲＮＡ標的配列には、１つ以上のミスマッチが含まれ得る。例えば、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントおよび対応するガイドＲＮＡ標的配列には、１～４、１～３、１～２、１、２、３、または４つのミスマッチが含まれ得る（例えば、ガイドＲＮＡ標的配列の全長は、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、または少なくとも２０以上のヌクレオチドである）。例えば、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントおよび対応するガイドＲＮＡ標的配列には、ガイドＲＮＡ標的配列の全長が、少なくとも２０ヌクレオチドである、１～４、１～３、１～２、１、２、３、または４つのミスマッチが含まれ得る。

【０１９２】
ＴｒａｃｒＲＮＡは、任意の形態（例えば、完全長ｔｒａｃｒＲＮＡまたは活性な部分ｔｒａｃｒＲＮＡ）、および様々な長さであり得る。それらには、一次転写物または処理された形態が含まれ得る。例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ（単一ガイドＲＮＡの一部として、または２分子ｇＲＮＡの一部としての別個の分子として）は、野生型ｔｒａｃｒＲＮＡ配

列（例えば、野生型ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の約２０、２６、３２、４５、４８、５４、６３、６７、８５、またはそれ以上のヌクレオチド）のすべてまたは一部を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来の野生型ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の例には、１７１ヌクレオチド、８９ヌクレオチド、７５ヌクレオチド、および６５ヌクレオチドのバージョンが含まれる。例えば、Ｄｅｌｔｃｈｅｖａ ｅｔａｌ．（２０１１）Ｎａｔｕｒｅ ４７１（７３４０）：６０２－６０７、ＷＯ２０１４／０９３６６１を参照されたく、それらの各々は、すべ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。単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）内のｔｒａｃｒＲＮＡの例には、ｓｇＲＮＡの＋４８、＋５４、＋６７、および＋８５のバージョン内に見出されるｔｒａｃｒＲＮＡセグメントが含まれ、「＋ｎ」は、野生型ｔｒａｃｒＲＮＡの最大＋ｎヌクレオチドがｓｇＲＮＡに含まれることを示す。ＵＳ８，６９７，３５９を参照されたく、すべ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。

【０１９３】

ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補鎖との間の相補性パーセントは、少なくとも６０％（例えば、少なくとも６５％、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９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％）であり得る。ＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補鎖との間の相補性パーセントは、約２０個の連続するヌクレオチドにわたって少なくとも６０％であり得る。一例として、ＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補鎖との間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補鎖の５’末端にある１４個の連続するヌクレオチドにわたって１００％であり得、残りの部分にわたって０％まで低くなり得る。そのような場合、ＤＮＡ標的化セグメントは、１４ヌクレオチド長であるとみなされ得る。別の例として、ＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補鎖との間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補鎖の５’末端にある７個の連続するヌクレオチドにわたって１００％であり得、残りの部分にわたって０％まで低くなり得る。このような場合、ＤＮＡ標的セグメントは７ヌクレオチド長であるとみなされ得る。いくつかのガイドＲＮＡでは、ＤＮＡ標的化セグメント内の少なくとも１７ヌクレオチドは、標的ＤＮＡの相補鎖に相補的である。例えば、ＤＮＡ標的化セグメントは、２０ヌクレオチド長であり得、標的ＤＮＡの相補鎖との１、２、または３つのミスマッチを含み得る。一例では、ミスマッチは、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列に対応する相補鎖（すなわち、ＰＡＭ配列の逆相補体）の領域に隣接していない（例えば、ミスマッチは、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントの５’末端にあるか、またはミスマッチは、ＰＡＭ配列に対応する相補鎖の領域から少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、または１９塩基対離れている）。

【０１９４】

ｇＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、互いに相補的であるヌクレオチドの２つのストレッチを含み得る。タンパク質結合セグメントの相補的ヌクレオチドは、ハイブリダイズして二本鎖ＲＮＡ二重鎖（ｄｓＲＮＡ）を形成する。目的のｇＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、Ｃａｓタンパク質と相互作用し、ｇＲＮＡは、結合したＣａｓタンパク質を、ＤＮＡ標的化セグメントを介して標的ＤＮＡ内の特定のヌクレオチド配列に配向する。

【０１９５】

単一ガイドＲＮＡは、ＤＮＡ標的化セグメントおよび足場配列（すなわち、ガイドＲＮＡのタンパク質結合またはＣａｓ結合配列）を含み得る。例えば、かかるガイドＲＮＡは、３’足場配列に結合された５’ＤＮＡ標的化セグメントを有することができる。例示的な足場配列は、以下を含むか、本質的にそれらからなるか、またはそれらからなる：ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵ（バージョン１；配列番号１２）；ＧＵＵＧＧＡＡＣＣＡＵＵＣＡＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵ

ＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン２；配列番号１３）；ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン３；配列番号１４）；ＧＵＵＵＡＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＧＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＵＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン４；配列番号１５）；ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵＵＵＵＵ（バージョン５；配列番号５２）；ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ（バージョン６；配列番号５３）；またはＧＵＵＵＡＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＧＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＵＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵＵＵＵＵ（バージョン７；配列番号５４）。本明細書に開示されるガイドＲＮＡ標的配列のうちのいずれかを標的化するガイドＲＮＡは、例えば、ガイドＲＮＡの３’末端の例示的なガイドＲＮＡ足場配列のうちのいずれかに融合したガイドＲＮＡの５’末端のＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。すなわち、本明細書に開示されるＤＮＡ標的化セグメントのいずれも、上述の足場配列のうちのいずれかの５’末端に結合して、単一ガイドＲＮＡ（キメラガイドＲＮＡ）を形成することができる。

【０１９６】

ガイドＲＮＡは、追加の望ましい特徴（例えば、修飾または調節された安定性；細胞内標的化；蛍光標識による追跡；タンパク質またはタンパク質複合体の結合部位など）を提供する修飾または配列を含み得る。すなわち、ガイドＲＮＡは、１つ以上の修飾ヌクレオシドもしくはヌクレオチド、または標準的なＡ、Ｇ、Ｃ、およびＵ残基の代わりにもしくはそれに加えて使用される１つ以上の天然に存在しないおよび／または天然に存在する構成要素または配置を含み得る。かかる修飾の例としては、例えば、５’キャップ（例えば、７－メチルグアニル酸キャップ（ｍ７Ｇ））、３’ポリアデニル化テイル（すなわち、３’ポリ（Ａ）テイル）、リボスイッチ配列（例えば、タンパク質および／またはタンパク質複合体による安定性の制御および／または接近性の制御を可能にする）、安定性制御配列、ｄｓＲＮＡ二重鎖を形成する配列（すなわち、ヘアピン）、ＲＮＡを細胞内の位置（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体など）に標的化する修飾または配列、追跡を提供する修飾または配列（例えば、蛍光分子への直接コンジュゲーション、蛍光検出を容易にする部分へのコンジュゲーション、蛍光検出を可能にする配列など）、タンパク質（例えば、転写活性化因子などのＤＮＡに作用するタンパク質）に対する結合部位を提供する修飾または配列、およびそれらの組み合わせが含まれる。修飾の他の例には、操作されたステムループ二重構造、操作されたバルジ領域、ステムループ二重構造の操作されたヘアピン３’、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。例えば、ＵＳ２０１５／０３７６５８６を参照されたく、すべ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。バルジは、ｃｒＲＮＡ様領域と最小のｔｒａｃｒＲＮＡ様領域で構成される二重鎖内のヌクレオチドの対になっていない領域であり得る。バルジは、二重鎖の片側に、Ｘが任意のプリンであり、Ｙが反対側の鎖のヌクレオチドとゆらぎ塩基対を形成できるヌクレオチドであってもよい５’－ＸＸＸＹ－３’、および二重鎖の他方の側に対になっていないヌクレオチド領域を含むことができる。

【０１９７】

修飾されていない核酸は、分解されやすい場合がある。外因性核酸はまた、自然免疫応答を誘導し得る。修飾は、安定性を導入し、免疫原性を低減するのに役立ち得る。ガイドＲＮＡは、例えば、（１）ホスホジエステル骨格結合において、非結合リン酸酸素の一方または両方および／もしくは結合リン酸酸素の１つ以上の改変または置換（例示的な骨格修飾）、（２）リボース糖での２’ヒドロキシルの改変または置換などのリボース糖の構

成要素の改変または置換（例示的な糖修飾）、（３）リン酸部分のデホスホリンカーによる置換（例えば、大規模な置換）（例示的な骨格修飾）、（４）非基準核酸塩基を含む天然に存在する核酸塩基の修飾または置換（例示的な塩基修飾）、（５）リボース－リン酸骨格の置換または修飾（例示的な骨格修飾）、（６）オリゴヌクレオチドの３’末端または５’末端の修飾（例えば、末端リン酸基の除去、修飾、もしくは置換、または部分、キャップ、もしくはリンカーの複合（かかる３’または５’キャップ修飾は、糖および／または骨格修飾を含み得る））、および（７）糖の修飾または置換（例示的な糖修飾）のうちの１つ以上を含む、修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドを含み得る。他の可能なガイドＲＮＡ修飾には、ウラシルまたはポリ－ウラシルトラクトの修飾または置換が含まれる。例えば、ＷＯ２０１５／０４８５７７およびＵＳ２０１６／０２３７４５５を参照されたく、それらの各々は、すべ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。同様の修飾を、Ｃａｓ　ｍＲＮＡなどのＣａｓコード核酸に行うことができる。例えば、Ｃａｓ　ｍＲＮＡは、同義コドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。

【０１９８】

上記のホースでのような化学修飾を組み合わせて、２、３、４、またはそれ以上の修飾を有することができる残基（ヌクレオシドおよびヌクレオチド）を含む修飾ｇＲＮＡおよび／またはｍＲＮＡを提供することができる。例えば、修飾残基は、修飾糖および修飾核酸塩基を有することができる。一例では、ｇＲＮＡのすべての塩基が修飾されている（例えば、すべての塩基は、ホスホロチオエート基などの修飾されたリン酸基を有する）。例えば、ｇＲＮＡのすべてまたは実質的にすべてのリン酸基は、ホスホロチオエート基で置き換えることができる。代替的または追加的に、修飾ｇＲＮＡは、５’末端またはその近くに少なくとも１つの修飾残基を含み得る。代替的または追加的に、修飾ｇＲＮＡは、３’末端またはその近くに少なくとも１つの修飾残基を含み得る。

【０１９９】

いくつかのｇＲＮＡは、１つ、２つ、３つ、またはそれ以上の修飾残基を含む。例えば、修飾ｇＲＮＡにおける位置の少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、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％、または１００％は、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドであり得る。

【０２００】

修飾されていない核酸は、分解されやすい場合がある。外因性核酸はまた、自然免疫応答を誘導し得る。修飾は、安定性を導入し、免疫原性を低減するのに役立ち得る。本明細書に記載のいくつかのｇＲＮＡは、細胞内または血清系ヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、１つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むことができる。本明細書に記載されているいくつかの修飾ｇＲＮＡは、細胞の集団に導入された場合、自然免疫応答の低減を示し得る。

【０２０１】

本明細書に開示されるｇＲＮＡは、修飾残基のリン酸基が、１つ以上の酸素を異なる置換基で置き換えることによって修飾され得る骨格修飾を含むことができる。修飾は、本明細書に記載されるように、修飾されていないリン酸部分を修飾リン酸基で大規模に置換することを含み得る。リン酸骨格の骨格修飾には、非荷電リンカーまたは非対称電荷分布を有する荷電リンカーのいずれかをもたらす改変も含まれ得る。

【０２０２】

修飾リン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、ホスホン酸水素、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、およびホスホトリエステルが含まれる。修飾されていないリン酸基のリン原子は、アキラルである。しかしながら、１つの非架橋酸素を上記の１つの原

子または原子基に置換することは、リン原子がキラルになり得る。不斉中心性リン原子は、「Ｒ」配置（Ｒｐ）または「Ｓ」配置（Ｓｐ）のいずれかを保有し得る。骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドと連結する酸素）を、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）で置換することによっても修飾され得る。置換は、連結する酸素または連結する酸素の両方で生じ得る。

【０２０３】

リン酸基は、特定の骨格修飾において、リンを含まない連結因子で置換され得る。いくつかの実施形態では、荷電リン酸基は、中性部分によって置換され得る。リン酸基を置換することができる部分の例には、限定されないが、例えば、メチルホスホネート、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルマセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノが含まれ得る。

【０２０４】

核酸を模倣することができる足場はまた、リン酸リンカーおよびリボース糖がヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチド代替物によって置換されるように構築され得る。かかる修飾は、骨格および糖修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、代替骨格によって係留され得る。例には、モルフォリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸（ＰＮＡ）ヌクレオシド代替物が含まれ得るが、これらに限定されない。

【０２０５】

修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、糖基への１つ以上の修飾（糖修飾）を含むことができる。例えば、２’ヒドロキシル基（ＯＨ）は、修飾することができる（例えば、いくつかの異なるオキシまたはデオキシ置換基で置換することができる）。２’ヒドロキシル基への修飾は、２’－アルコキシドイオンを形成するためにヒドロキシルを脱プロトン化することができなくなるため、核酸の安定性を増強することができる。

【０２０６】

２’ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシまたはアリールオキシ（ＯＲ、「Ｒ」が、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたは糖であり得る）；ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、Ｏ（$CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$ＯＲを含み得、Ｒが、例えば、Ｈまたは任意に置換されるアルキルであり得、ｎが、０～２０（例えば、０～４、０～８、０～１０、０～１６、１～４、１～８、１～１０、１～１６、１～２０、２～４、２～８、２～１０、２～１６、２～２０、４～８、４～１０、４～１６、および４～２０）の整数であり得る。２’ヒドロキシル基修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅであり得る。同様に、２’ヒドロキシル基修飾は、２’－フルオロ修飾であり得、２’ヒドロキシル基をフッ化物で置換する。２’ヒドロキシル基修飾は、２’ヒドロキシルが、例えば、C_{1-6}アルキレンまたはC_{1-6}ヘテロアルキレンブリッジによって、同じリボース糖の４’炭素に接続され得るロックド核酸（ＬＮＡ）を含み得、例示的な架橋は、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋；Ｏ－アミノ（アミノは、例えば、NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得る）；およびアミノアルコキシ、Ｏ（$CH_2)_n$－アミノ（アミノは、例えば、NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得る）を含み得る。２’ヒドロキシル基修飾は、リボース環がＣ２’－Ｃ３’結合を欠くアンロックド核酸（ＵＮＡ）を含み得る。２’ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基（ＭＯＥ）（$OCH_2CH_2OCH_3$、例えば、ＰＥＧ誘導体）を含み得る。

【０２０７】
デオキシ２’修飾は、水素（すなわち、部分的にｄｓＲＮＡのオーバーハング部分でのデオキシリボース糖）；ハロ（例えば、ブロモ、クロロ、フルオロ、またはヨード）；アミノ（アミノは、例えば、ＮＨ２；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸であり得る）；ＮＨ（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＮＨ）$_n$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－アミノ（アミノは、例えば、本明細書に記載されるものであり得る）、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ（Ｒは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたは糖であり得る）、シアノ；メルカプト；アルキル－チオ－アルキル；チオアルコキシ；およびアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルを含み得、任意に、例えば、本明細書に記載のアミノで置換され得る。
【０２０８】
糖修飾は、リボース中の対応する炭素とは反対の立体化学的配置を有する１つ以上の炭素を含み得る糖基を含むことができる。したがって、修飾核酸は、糖として、例えば、アラビノースを含むヌクレオチドを含み得る。修飾核酸はまた、脱塩基糖を含み得る。これらの脱塩基糖はまた、構成糖原子の１つ以上でさらに修飾され得る。修飾核酸はまた、Ｌ型である１つ以上の糖（例えば、Ｌ－ヌクレオシド）を含み得る。
【０２０９】
修飾核酸に組み込むことができる、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、核酸塩基とも呼ばれる修飾塩基を含み得る。核酸塩基の例には、これらに限定されないが、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、およびウラシル（Ｕ）が含まれる。これらの核酸塩基は、修飾核酸に組み込むことができる修飾残基を提供するために修飾され得るか、または完全に置換され得る。ヌクレオチドの核酸塩基は独立して、プリン、ピリミジン、プリン類似体、またはピリミジン類似体から選択され得る。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、例えば、塩基の天然に存在する合成誘導体を含み得る。
【０２１０】
デュアルガイドＲＮＡでは、ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡの各々が、修飾を含み得る。かかる修飾は、ｃｒＲＮＡおよび／またはｔｒａｃｒＲＮＡの一端または両端にあり得る。ｓｇＲＮＡでは、ｓｇＲＮＡの一端または両端の１つ以上の残基が化学的に修飾され得、および／または内部ヌクレオシドが修飾され得、および／またはｓｇＲＮＡ全体が化学的に修飾され得る。いくつかのｇＲＮＡは、５’末端修飾を含む。いくつかのｇＲＮＡは、３’末端修飾を含む。
【０２１１】
本明細書に開示されるガイドＲＮＡは、ＷＯ２０１８／１０７０２８Ａｌに開示される修飾パターンのうちの１つを含むことができ、すべ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。本明細書に開示されるガイドＲＮＡはまた、ＵＳ２０１７／０１１４３３４に開示される構造／修飾パターンのうちの１つを含むことができ、すべ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。本明細書に開示されるガイドＲＮＡはまた、ＷＯ２０１７／１３６７９４、ＷＯ２０１７／００４２７９、ＵＳ２０１８／０１８７１８６、またはＵＳ２０１９／００４８３３８に開示される構造／修飾パターンのうちの１つを含むことができ、これらの各々が、すべ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。
【０２１２】
一例として、ガイドＲＮＡの５’または３’末端のヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を含み得る（例えば、塩基は、ホスホロチオエート基である修飾リン酸基を有し得る）。例えば、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの５’または３’末端の２、３、または４つの末端ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含み得る。別の例として、ガイドＲＮＡの５’および／または３’末端のヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル修飾を有し得る。例えば、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの５’および／または３’末端（例えば、５’末端）の

２、３、または４つの末端ヌクレオチドに２’－Ｏ－メチル修飾を含み得る。例えば、ＷＯ２０１７／１７３０５４Ａ１およびＦｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ．２２（９）：２２２７－２２３５を参照されたく、それらの各々は、すべ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。他の可能な修飾は、本明細書の他の場所でより詳細に説明されている。特定の例では、ガイドＲＮＡには、最初の３つの５’および３’末端ＲＮＡ残基に２’－Ｏ－メチル類似体および３’ホスホロチオエートヌクレオチド間結合が含まれる。かかる化学修飾は、例えば、エキソヌクレアーゼからガイドＲＮＡへのより優れた安定性および保護を提供し、それらが修飾されていないガイドＲＮＡよりも長く細胞内に持続することを可能にする。かかる化学修飾はまた、例えば、ＲＮＡを積極的に分解し得るかまたは細胞死につながる免疫カスケードを引き起こし得る自然細胞内免疫応答から保護することもできる。

【０２１３】

一例として、本明細書に記載のガイドＲＮＡのいずれも、少なくとも１つの修飾を含むことができる。一例では、少なくとも１つの修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含む。例えば、少なくとも１つの修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含み得る。代替的または追加的に、少なくとも１つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含み得る。代替的または追加的に、少なくとも１つの修飾は、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含み得る。一例では、本明細書に記載のガイドＲＮＡは、１つ以上の２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドおよびヌクレオチド間の１つ以上のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む。

【０２１４】

修飾は、ガイドＲＮＡのいずれの場所でも生じ得る。一例として、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの５’末端にある最初の５つのヌクレオチドの１つ以上での修飾を含み、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの３’末端の最後の５ヌクレオチドの１つ以上、またはそれらの組み合わせでの修飾を含む。例えば、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの最初の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、ガイドＲＮＡの最後の４つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合、またはそれらの組み合わせを含み得る。代替的または追加的に、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの５’末端の最初の３つのヌクレオチドに２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含み得、ガイドＲＮＡの３’末端の最後の３ヌクレオチドに２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含み得る。

【０２１５】

ヌクレオチド糖環に影響を与えることが示されている他の化学修飾は、ハロゲン置換である。例えば、ヌクレオチド糖環の２’－フルオロ（２’－Ｆ）置換は、オリゴヌクレオチド結合親和性およびヌクレアーゼ安定性を増加させることができる。脱塩基ヌクレオチドとは、窒素塩基を欠くヌクレオチドを指す。逆塩基とは、通常の５’から３’結合（すなわち、５’から５’結合または３’から３’結合のいずれか）から逆になっている結合を有するものを指す。

【０２１６】

脱塩基ヌクレオチドは、逆結合で結合し得る。例えば、脱塩基ヌクレオチドは、５’から５’結合を介して末端５’ヌクレオチドと結合し得るか、または脱塩基ヌクレオチドは、３’から３’の結合を介して末端３’ヌクレオチドと結合し得る。末端５’または３’ヌクレオチドのいずれかにある逆脱塩基ヌクレオチドは、逆脱塩基エンドキャップと呼ばれることもある。

【０２１７】

一例では、５’末端での最初の３、４、または５ヌクレオチドの１つ以上、および３’末端の最後の３、４、または５ヌクレオチドの１つ以上が修飾される。修飾は、例えば、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｆ、逆塩基性ヌクレオチド、ホスホロチオエート結合、または安定性および／もしくは性能を高めることが周知である他のヌクレオチド修飾であり得る。

【０２１８】
別の例では、５’末端の最初の４ヌクレオチド、および３’末端の最後の４ヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合で結合され得る。
【０２１９】
別の例では、５’末端の最初の３ヌクレオチド、および３’末端の最後の３ヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含み得る。別の例では、５’末端の最初の３ヌクレオチド、および３’末端の最後の３ヌクレオチドは、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。別の例では、５’末端の最初の３ヌクレオチド、および３’末端の最後の３ヌクレオチドは、逆塩基性ヌクレオチドを含む。
【０２２０】
いくつかのガイドＲＮＡ（例えば、シングルガイドＲＮＡ）では、ガイドＲＮＡの少なくとも１つのループ（例えば、２つのループ）は、１つ以上のアダプター（すなわち、アダプタータンパク質またはドメイン）に結合する別個のＲＮＡ配列の挿入によって修飾される。かかるアダプタータンパク質は、転写活性化ドメインなどの１つ以上の異種機能ドメインをさらに動員するために使用され得る。かかるアダプタータンパク質（すなわち、キメラアダプタータンパク質）を含む融合タンパク質の例は、本明細書の他の場所に開示される。例えば、ＭＳ２結合ループｇｇｃｃＡＡＣＡＵＧＡＧＧＡＵＣＡＣＣＣＡＵＧＵＣＵＧＣＡＧｇｇｃｃ（配列番号１６）は、ＷＯ２０１６／０４９２５８およびＫｏｎｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｎａｔｕｒｅ　５１７（７５３６）：５８３－５８８に記載されているＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系について、配列番号配列番号１２、１４、５２、または５３）またはｓｇＲＮＡ骨格に示されるｓｇＲＮＡ足場（骨格）のヌクレオチド＋１３～＋１６およびヌクレオチド＋５３～＋５６を置換することができ、参考文献の各々は、すべ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。例えば、図３を参照されたい。本明細書で使用されるガイドＲＮＡの番号付けは、ガイドＲＮＡ足場配列（すなわち、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントの下流の配列）におけるヌクレオチドの番号付けを指す。例えば、ガイドＲＮＡ足場の第１のヌクレオチドは＋１であり、足場の第２のヌクレオチドは＋２というようになる。配列番号１２、１４、５２、または５３のヌクレオチド＋１３～＋１６に対応する残基は、本明細書ではテトラループと称される領域である、配列番号１２、１４、５２、または５３のヌクレオチド＋９～＋２１にまたがる領域のループ配列である。配列番号１２、１４、５２、または５３のヌクレオチド＋５３～＋５６に対応する残基は、本明細書ではステムループ２と称される領域である、配列番号１２、１４、５２、または５３のヌクレオチド＋４８～＋６１にまたがる領域のループ配列である。配列番号１２、１４、５２、または５３にある他のステムループ配列は、ステムループ１（ヌクレオチド＋３３～＋４１）およびステムループ３（ヌクレオチド＋６３～＋７５）を含む。得られる構造は、テトラループおよびステムループ２配列の各々がＭＳ２結合ループにより置換されているｓｇＲＮＡ足場である。テトラループおよびステムループ２は、ＭＳ２結合ループを追加することがいかなるＣａｓ９残基にも干渉すべきでないように、Ｃａｓ９タンパク質から突出する。さらに、テトラループおよびステムループ２部位のＤＮＡへの近接は、これらの位置への局在化により、ＤＮＡと転写活性化因子などの任意の動員されたタンパク質との間に高度な相互作用がもたらされ得るあることを示す。したがって、いくつかのｓｇＲＮＡでは、配列番号１２、１４、５２、または５３に記載のガイドＲＮＡ足場の＋１３～＋１６に対応するヌクレオチドおよび／もしくは＋５３～＋５６に対応するヌクレオチド、またはこれらの足場／骨格のいずれかと最適にアラインされた場合の対応する残基は、１つ以上のアダプタータンパク質またはドメインに結合することができる別個のＲＮＡ配列によって置換される。代替的または追加的に、アダプター結合配列は、ガイドＲＮＡの５’末端または３’末端に付加され得る。テトラループおよびステムループ２領域にＭＳ２結合ループを含む例示的なガイドＲＮＡ足場は、配列番号４０に記載の配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。テトラループおよびステムループ２領域にＭＳ２結合ループを含む例示的な一般的な単一ガイドＲＮＡは、配列番号４５または５７

に記載の配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。
【０２２１】
ガイドＲＮＡは、任意の形態で提供され得る。例えば、ｇＲＮＡは、２つの分子（別個のｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ）または１つの分子（ｓｇＲＮＡ）のいずれかとしてＲＮＡの形態で、および任意にＣａｓタンパク質との複合体の形態で提供され得る。ｇＲＮＡはまた、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡの形態で提供され得る。ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、単一ＲＮＡ分子（ｓｇＲＮＡ）または別個のＲＮＡ分子（例えば、別個のｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードすることができる。後者の場合、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、１つのＤＮＡ分子として、またはｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡをそれぞれコードする別個のＤＮＡ分子として提供され得る。
【０２２２】
ｇＲＮＡがＤＮＡの形態で提供される場合、ｇＲＮＡは、一時的、条件付き、または構成的に細胞内で発現され得る。ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、細胞のゲノムにおいて安定して組み込まれ、細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結され得る。代替的に、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、発現構築物中のプロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、異種核酸を含むベクター内にあり得る。かかる発現構築物で使用することができるプロモーターには、例えば、真核細胞、非ヒト真核細胞、動物細胞、非ヒト動物細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、齧歯動物細胞、マウス細胞、ラット細胞、多能性細胞、胚性幹（ＥＳ）細胞、成体幹細胞、発生が制限された前駆細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、または１細胞期胚のうちの１つ以上において活性なプロモーターが含まれる。かかるプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターであり得る。かかるプロモーターはまた、例えば、双方向プロモーターであり得る。好適なプロモーターの特定の例には、ヒトＵ６プロモーター、ラットＵ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーター、またはマウスＵ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーターなどのＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターが含まれる。
【０２２３】
代替的に、ｇＲＮＡは、他の様々な方法で調製され得る。例えば、ｇＲＮＡは、例えば、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを使用するインビトロ転写によって調製され得る（例えば、ＷＯ２０１４／０８９２９０およびＷＯ２０１４／０６５５９６を参照されたく、それらの各々は、すべ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）。ガイドＲＮＡはまた、化学的合成によって調製された合成的に生成された分子であり得る。例えば、ガイドＲＮＡは、最初の３つの５’および３’末端ＲＮＡ残基に２’－Ｏ－メチル類似体および３’ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むように化学的に合成され得る。
【０２２４】
ガイドＲＮＡ（またはガイドＲＮＡをコードする核酸）は、１つ以上のガイドＲＮＡ（例えば、１、２、３、４、またはそれ以上のガイドＲＮＡ）と、ガイドＲＮＡの安定性を増加させる（例えば、所定の保存条件下（例えば、－２０℃、４℃、または周囲温度）で、分解産物が閾値未満、例えば出発核酸またはタンパク質の０．５重量％未満のままである期間を延長する、あるいはインビボでの安定性を増加させる）担体と、を含む組成物であり得る。かかる担体の非限定的な例には、ポリ（乳酸）（ＰＬＡ）ミクロスフェア、ポリ（Ｄ，Ｌ－乳酸－コグリコール－酸）（ＰＬＧＡ）ミクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コキレート（ｃｏｃｈｌｅａｔｅｓ）、および脂質微小管が含まれる。かかる組成物は、Ｃａｓ９タンパク質などのＣａｓタンパク質、またはＣａｓタンパク質をコードする核酸をさらに含み得る。
【０２２５】
（２）ガイドＲＮＡ標的配列
ガイドＲＮＡの標的ＤＮＡには、結合に十分な条件が存在する場合に、ｇＲＮＡのＤＮＡ標的セグメントが結合するＤＮＡに存在する核酸配列が含まれる。好適なＤＮＡ／ＲＮ

Ａ結合条件には、細胞に通常存在する生理学的条件が含まれる。他の好適なＤＮＡ／ＲＮＡ結合条件（例えば、無細胞系における条件）は、当該技術分野で知られている（例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ Ｅｄ．（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ ２００１）を参照されたく、すべ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）。ｇＲＮＡに相補的であり、かつそれとハイブリダイズする標的ＤＮＡの鎖は、「相補的鎖」と呼ばれることができ、「相補的鎖」に相補的である（したがって、Ｃａｓタンパク質またはｇＲＮＡに相補的ではない）標的ＤＮＡの鎖は、「非相補鎖」または「テンプレート鎖」と呼ばれることができる。

【０２２６】

標的ＤＮＡは、ガイドＲＮＡがハイブリダイズする相補鎖上の配列と非相補鎖上の対応する配列（例えば、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に隣接する）の両方を含む。本明細書で使用される「ガイドＲＮＡ標的配列」という用語は、具体的には、特に、ガイドＲＮＡが相補鎖上でハイブリダイズする配列に対応する（すなわち、その逆相補体）非相補鎖上の配列を指す。すなわち、ガイドＲＮＡ標的配列は、ＰＡＭに隣接する非相補鎖上の配列を指す（例えば、Ｃａｓ９の場合、ＰＡＭの上流または５’）。ガイドＲＮＡ標的配列は、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントと同等であるが、ウラシルの代わりにチミンを含む。一例として、ＳｐＣａｓ９酵素のガイドＲＮＡ標的配列は、非相補鎖上の５’－ＮＧＧ－３’ＰＡＭの上流の配列を指し得る。ガイドＲＮＡは、標的ＤＮＡの相補鎖に対して相補性を有するように設計されており、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補鎖との間のハイブリダイゼーションは、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する。ハイブリダイゼーションを引き起こし、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進するのに十分な相補性があれば、完全な相補性は必ずしも必要ではない。ガイドＲＮＡが本明細書でガイドＲＮＡ標的配列を標的とするものとして言及される場合、それは、ガイドＲＮＡが、非相補鎖上のガイドＲＮＡ標的配列の逆相補体である標的ＤＮＡの相補鎖配列にハイブリダイズすることを意味する。

【０２２７】

標的ＤＮＡまたはガイドＲＮＡ標的配列は、任意のポリヌクレオチドを含み得、例えば、細胞の核または細胞質内、あるいはミトコンドリアまたは葉緑体などの細胞の細胞小器官内に位置し得る。標的ＤＮＡまたはガイドＲＮＡ標的配列は、細胞に対して内因性または外因性の任意の核酸配列であり得る。ガイドＲＮＡ標的配列は、遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードする配列または非コード配列（例えば、制御性配列）であり得るか、または両方を含み得る。

【０２２８】

それは標的配列が遺伝子の転写開始部位に隣接していることが好ましい場合がある。例えば、標的配列は、転写開始部位の１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０、１２０、１１０、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０、１０、５、もしくは１塩基対以内、転写開始部位の１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０、１２０、１１０、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０、１０、５、もしくは１塩基対上流以内、または転写開始部位の１０００、９００、８００、７００、６００、５００、４００、３００、２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０、１２０、１１０、１００、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０、１０、５、もしくは１塩基対下流以内であり得る。任意に、標的配列は、転写開始部位の２００塩基対上流および転写開始部位の１塩基対下流の領域内（－２００～＋１）にある。

【０２２９】

標的配列は、転写活性化の標的となることが所望される任意の遺伝子内にあり得る。いくつかの事例では、標的遺伝子は、非発現遺伝子または弱発現遺伝子であり得る（例えば

、１．１倍、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．９倍、または２倍など、バックグラウンドを超えて最小限にしか発現されない）。標的遺伝子はまた、対照遺伝子と比較して低レベルで発現されるものであり得る。標的遺伝子はまた、後成的にサイレンスされるものであり得る。「エピゲネティックにサイレンシングされる」という用語は、変異などの遺伝的変化以外の機構により、転写されていない、または対照試料（例えば、正常細胞などの対応する対照細胞）における遺伝子の転写レベルに対して低下したレベルで転写されている遺伝子を指す。遺伝子サイレンシングのエピジェネティックな機構は周知であり、例えば、遺伝子転写が減少または阻害されるような、遺伝子の５’制御性領域のＣｐＧアイランドでのＣｐＧジヌクレオチドの高メチル化、および例えば、ヒストンのアセチル化によるクロマチンの構造変化が含まれる。

【０２３０】

標的遺伝子には、肝臓などの特定の器官または組織で発現される遺伝子が含まれ得る。標的遺伝子は、疾患関連遺伝子を含み得る。疾患関連遺伝子とは、非疾患対照の組織または細胞と比較して、疾患発症組織に由来する細胞において異常なレベルまたは異常な形態で転写または翻訳産物を産生する任意の遺伝子を指す。それは、異常に高いレベルで発現されるようになる遺伝子であり得、そこでは、改変された発現は、疾患の発生および／または進行と相関する。疾患関連遺伝子はまた、疾患の病因に関与する変異または遺伝的バリエーションを所有する遺伝子を指す。転写または翻訳された産物は、既知または未知であり、正常または異常なレベルであり得る。例えば、標的遺伝子は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、プリオン病、およびトランスチレチンアミロイドーシス（例えば、Ｔｔｒ）などのアミロイドーシスなどのタンパク質凝集疾患および障害に関連する遺伝子であり得る。標的遺伝子はまた、高コレステロール血症またはアテローム性動脈硬化症などの疾患または状態に関連する経路に関与する遺伝子、または過剰発現された場合にかかる疾患または状態をモデル化できる遺伝子であり得る。標的遺伝子はまた、１つ以上の種類のがんで発現または過剰発現される遺伝子であり得る。例えば、Ｓａｎｔａｒｉｕｓ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ １０（１）：５９－６４を参照されたく、すべ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。

【０２３１】

かかる標的遺伝子の１つの特定の例は、Ｔｔｒ遺伝子である。任意に、Ｔｔｒ遺伝子は、病原性変異（例えば、アミロイドーシスを引き起こす変異）を含むことができる。かかる変異の例は、例えば、ＷＯ２０１８／００７８７１に提供されており、すべ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。例示的なヒトＴＴＲタンパク質および例示的なヒトＴＴＲ遺伝子は、それぞれ、ＵｎｉＰｒｏｔ ＩＤ Ｐ０２７６６およびＥｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ ７２７６によって識別される。例示的なマウスＴＴＲタンパク質および例示的なマウスＴｔｒ遺伝子は、それぞれ、ＵｎｉＰｒｏｔ ＩＤ Ｐ０７３０９およびＥｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ ２２１３９によって識別される。トランスサイレチン（ＴＴＲ）は、血清および脳脊髄液に含まれるタンパク質で、甲状腺ホルモンとレチノール結合タンパク質をレチノールに運ぶ。肝臓はＴＴＲを血中に分泌し、脈絡叢はそれを脳脊髄液に分泌する。ＴＴＲは網膜色素上皮でも産生され、硝子体に分泌される。アミロイド疾患老人性全身性アミロイドーシス（ＳＳＡ）、家族性アミロイド多発神経障害（ＦＡＰ）、および家族性アミロイド心筋症（ＦＡＣ）では、誤って折りたたまれて凝集したＴＴＲは複数の組織および器官に蓄積する。トランスサイレチン（ＴＴＲ）は、１２７アミノ酸、５５ｋＤａの血清および脳脊髄液輸送タンパク質であり、主に肝臓で合成されるが、脈絡叢によっても産生される。プレアルブミン、チロキシン結合プレアルブミン、ＡＴＴＲ、ＴＢＰＡ、ＣＴＳ、ＣＴＳ１、ＨＥＬ１１１、ＨｓＴ２６５１、ＰＡＬＢとも呼ばれている。本来の状態では、ＴＴＲは四量体として存在する。ホモ接合体では、ホモ四量体は同一の１２７アミノ酸のベータシートに富むサブユニットを含む。ヘテロ接合体では、ＴＴＲ四量体は変異型および／または野生型サブユニットで構成され、通常は統計的に組み合わされる。ＴＴＲは、血清と脳脊髄液の両方でチロキシン（Ｔ４）とレチノール

結合ＲＢＰ（レチノール結合タンパク質）を運ぶ役割を果たす。マウスＴｔｒ遺伝子におけるガイドＲＮＡ標的配列（ＰＡＭを含まない）の例は、それぞれ、配列番号３４、３５、および３６に記載される。配列番号３４は、Ｔｔｒ転写開始部位の－６３に位置し（ゲノム座標：ビルドｍｍ１０、ｃｈｒ１８、＋鎖、２０６６５１８７－２０６６５２０９）、配列番号３５は、Ｔｔｒ転写開始部位の－１３４に位置し（ゲノム座標：ビルドｍｍ１０、ｃｈｒ１８、＋鎖、２０６６５１１６－２０６６５１３８）、配列番号３６は、Ｔｔｒ転写開始部位の－１１２に位置する（ゲノム座標：ビルドｍｍ１０、ｃｈｒ１８、＋鎖、２０６６５１３８－２０６６５１６０）。それぞれ配列番号３４、３５、および３６に記載のガイドＲＮＡ標的配列に対応するガイドＲＮＡ　ＤＮＡ標的化セグメントは、それぞれ配列番号４１、４２、および４３に記載される。これらのＤＮＡ標的化セグメントを含む単一ガイドＲＮＡの例は、それぞれ、配列番号３７、３８、および３９または５５に記載される。

【０２３２】

疾患関連遺伝子はまた、増加した遺伝子の産生が対象において有益である（例えば、疾患を治療または予防するために）任意の遺伝子を含み得る。かかる遺伝子は、その過少発現または低発現が、疾患、障害、もしくは症候群に関連するか、またはそれらの原因となる遺伝子であり得る。例えば、かかる標的遺伝子の低減した転写、かかる標的遺伝子からの遺伝子産物の低減した量、またはかかる標的遺伝子からの遺伝子産物の低減した活性は、標的遺伝子の転写または発現を増加させることが有益であるような疾患に関連し得るか、疾患を増悪し得るか、または疾患を引き起こし得る。かかる遺伝子の一例は、ＯＴＣ（Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ　５００９）である。かかる遺伝子の他の例は、ＨＢＧ１（Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ　３０４７）およびＨＢＧ２（Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤ　３０４８）である。かかる遺伝子の他の例には、表２および３にあるようなハプロ不全遺伝子が含まれる。

【０２３３】

Ｃａｓタンパク質による標的ＤＮＡの部位特異的結合および切断は、（ｉ）ガイドＲＮＡと標的ＤＮＡの相補鎖との間の塩基対合相補性、および（ｉｉ）標的ＤＮＡの非相補鎖にある、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）と呼ばれる短いモチーフの両方によって決定される位置で起こり得る。ＰＡＭは、ガイドＲＮＡ標的配列に隣接し得る。任意に、ガイドＲＮＡ標的配列は、３’末端でＰＡＭが隣接し得る（例えば、Ｃａｓ９の場合）。あるいは、ガイドＲＮＡ標的配列は、５’末端でＰＡＭが隣接し得る（例えば、Ｃｐｆ１の場合）。例えば、Ｃａｓタンパク質の切断部位は、ＰＡＭ配列の上流または下流（例えば、ガイドＲＮＡ標的配列内）の約１～約１０または約２～約５塩基対（例えば、３塩基対）であり得る。ＳｐＣａｓ９の場合、ＰＡＭ配列（すなわち、非相補鎖上）は、５’－N_1ＧＧ－３’であり得、N_1は、任意のＤＮＡヌクレオチドであり、ＰＡＭは、標的ＤＮＡの非相補鎖上のガイドＲＮＡ標的配列の３’のすぐ近くである。したがって、相補鎖上のＰＡＭに対応する（すなわち、逆相補体）配列は、５’－ＣＣN_2－３’であり、N_2は、任意のＤＮＡヌクレオチドであり、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントが標的ＤＮＡの相補鎖にハイブリダイズする配列の５’のすぐ近くである。いくつかのそのような場合、N_1およびN_2は、相補的であることができ、N_1～N_2塩基対は、任意の塩基対であり得る（例えば、N_1＝ＣおよびN_2＝Ｇ、N_1＝ＧおよびN_2＝Ｃ、N_1＝ＡおよびN_2＝Ｔ、またはN_1＝ＴおよびN_2＝Ａ）。Ｓ．ａｕｒｅｕｓ由来のＣａｓ９の場合、ＰＡＭは、ＮＮＧＲＲＴまたはＮＮＧＲＲであり得、Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｃ、またはＴであり得、Ｒは、ＧまたはＡであり得る。Ｃ．ｊｅｊｕｎｉ由来のＣａｓ９の場合、ＰＡＭは、例えば、ＮＮＮＮＡＣＡＣまたはＮＮＮＮＲＹＡＣであり得、Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｃ、またはＴであり得、Ｒは、ＧまたはＡであり得る。いくつかの場合（例えば、ＦｎＣｐｆ１の場合）では、ＰＡＭ配列は、５’の上流にあり、配列５’－ＴＴＮ－３’を有し得る。

【０２３４】

ガイドＲＮＡ標的配列の例は、ＳｐＣａｓ９タンパク質によって認識されるＮＧＧモチーフの直前の２０ヌクレオチドのＤＮＡ配列である。例えば、ガイドＲＮＡ標的配列＋Ｐ

ＡＭの２つの例は、ＧＮ$_{19}$ＮＧＧ（配列番号１７）またはＮ$_{20}$ＮＧＧ（配列番号１８）である。例えば、ＷＯ２０１４／１６５８２５を参照されたく、すべ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。５’末端のグアニンは、細胞内のＲＮＡポリメラーゼによる転写を促進することができる。ガイドＲＮＡ標的配列＋ＰＡＭの他の例は、インビトロでのＴ７ポリメラーゼによる効率的な転写を促進するための、５’末端に２つのグアニンヌクレオチドを含み得る（例えば、ＧＧＮ$_{20}$ＮＧＧ；配列番号１９）。例えば、ＷＯ２０１４／０６５５９６を参照されたく、すべ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。他のガイドＲＮＡ標的配列＋ＰＡＭは、５’ＧまたはＧＧおよび３’ＧＧまたはＮＧＧを含む、配列番号１７～１９の４～２２ヌクレオチドの長さを有し得る。さらに他のガイドＲＮＡ標的配列＋ＰＡＭは、配列番号１７～１９の１４～２０ヌクレオチド長を有し得る。

【０２３５】

標的ＤＮＡにハイブリダイズしたＣＲＩＳＰＲ複合体の形成は、ガイドＲＮＡ標的配列（すなわち、標的ＤＮＡの非相補鎖上のガイドＲＮＡ標的配列およびガイドＲＮＡがハイブリダイズする相補鎖上の逆相補体）に対応する領域内または領域の近くの標的ＤＮＡの一方または両方の鎖の切断をもたらし得る。例えば、切断部位は、ガイドＲＮＡ標的配列内にあり得る（例えば、ＰＡＭ配列に対して定義された位置に）。「切断部位」は、Ｃａｓタンパク質が一本鎖切断または二本鎖切断を生成する標的ＤＮＡの位置を含む。切断部位は、一本鎖のみ（例えば、ニッカーゼが使用される場合）または二本鎖ＤＮＡの両方の鎖上にあり得る。切断部位は、両方の鎖上の同じ位置にあり得るか（平滑末端を生成する；例えば、Ｃａｓ９）、または各鎖上の異なる部位にあり得る（千鳥状の末端を生成する（すなわち、オーバーハング）；例えば、Ｃｐｆ１）。千鳥状の末端は、例えば、各々が異なる鎖上の異なる切断部位で一本鎖切断を生成し、それによって二本鎖切断を生成する２つのＣａｓタンパク質を使用することによって生成され得る。例えば、第１のニッカーゼは、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）の第１の鎖上に一本鎖切断を作成することができ、第２のニッカーゼは、オーバーハング配列が作成されるようにｄｓＤＮＡの第２の鎖上に一本鎖切断を作成することができる。いくつかの場合では、第１の鎖のニッカーゼのガイドＲＮＡ標的配列または切断部位は、第２の鎖のニッカーゼのガイドＲＮＡ標的配列または切断部位から少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、７５、１００、２５０、５００、または１，０００塩基対分離されている。

【０２３６】

Ｄ．キメラＣａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、ガイドＲＮＡ、または相乗的活性化メディエーターをコードする核酸

本明細書の他の場所で詳細に記載されるキメラＣａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、およびガイドＲＮＡは、本明細書に開示される方法および組成物において核酸（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）の形態で提供され得る。例えば、核酸は、キメラＣａｓタンパク質発現カセット、キメラアダプタータンパク質発現カセット、キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質の両方をコードする核酸を含む相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）発現カセット、ガイドＲＮＡ発現カセット、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。かかる核酸は、ＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））またはＤＮＡであり得、一本鎖または二本鎖であり得、直鎖状または環状であり得る。例えば、核酸は、キメラＣａｓタンパク質ｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質ｍＲＮＡ、キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質の両方をコードする核酸を含む相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）ｍＲＮＡ、ガイドＲＮＡ、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。ＤＮＡは、発現ベクターまたは標的化ベクターなどのベクターの一部であり得る。ベクターはまた、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、およびレトロウイルスベクターなどのウイルスベクターであり得る。本明細書に開示される核酸のいずれかが細胞に導入されると、コードされたキメラＤＮＡ標的タンパク質、キメラアダプタータンパク質、またはガイドＲＮＡは、細胞内で一過性、

条件付き、または構成的に発現され得る。

【０２３７】

任意に、特定の細胞または生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のために、核酸がコドン最適化され得る。例えば、核酸は、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、真核細胞、非ヒト真核細胞、動物細胞、非ヒト動物細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、齧歯動物細胞、マウス細胞、ラット細胞、または任意の他の目的の宿主細胞においてより頻度高く使用される代替コドンへと修飾することができる。

【０２３８】

いくつかの組成物および方法では、Ｃａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、およびガイドＲＮＡは、ＲＮＡの形態で提供され得る。かかるＲＮＡは、修飾ＲＮＡであり得る。例えば、ＷＯ２０１７／１７３０５４、ＵＳ２０１９／０１３６２３１、およびＷＯ２０１８／１０７０２８を参照されたく、それらの各々は、すべ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。例えば、１つ以上のＲＮＡは、５’末端および／または３’末端に１つ以上の安定化末端修飾を含むように修飾され得る。かかる修飾には、例えば、５’末端および／または３’末端の１つ以上のホスホロチオエート結合、または５’末端および／または３’末端の１つ以上の２’－Ｏ－メチル修飾が含まれ得る（例えば、５’末端または３’末端）。一例として、５’末端の少なくとも最初の１、２、３、または４ヌクレオチドが修飾され得、かつ３’末端の少なくとも最後の１、２、３、または４ヌクレオチドが修飾され得る。例えば、かかる修飾は、最初の１、２、３、または４ヌクレオチドでの２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド、および／または３’末端の最後の１、２、３、または４ヌクレオチドの２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含み得る。追加的または代替的に、かかる修飾は、例えば、５’末端での最初の４ヌクレオチドの１つ以上の間、または３’末端の最後の４ヌクレオチドの１つ以上の間のホスホロチオエート結合を含み得る。例えば、５’末端での最初の４ヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合で結合され得、および／または３’末端の最後の４ヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合で結合され得る。特定の例では、ＲＮＡ（例えば、化学的に合成されたガイドＲＮＡなどのガイドＲＮＡ）は、最初の３つの５’および３’末端ＲＮＡ残基に２’－Ｏ－メチル類似体および３’ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。そのような化学修飾は、例えば、エキソヌクレアーゼからのより優れた安定性および保護をガイドＲＮＡに提供して、それらが未修飾のガイドＲＮＡよりも長く細胞内に存続することを可能にする。かかる化学修飾はまた、例えば、ＲＮＡを積極的に分解し得るかまたは細胞死につながる免疫カスケードを引き起こし得る自然細胞内免疫応答から保護することもできる。

【０２３９】

修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、ガイドＲＮＡまたはｍＲＮＡに存在し得る。１つ以上の修飾ヌクレオシドもしくはヌクレオチドを含むガイドＲＮＡまたはｍＲＮＡは、標準的なＡ、Ｇ、Ｃ、およびＵ残基の代わりにもしくはそれに加えて使用される１つ以上の天然に存在しないおよび／または天然に存在する構成要素または配置の存在を説明するために修飾ＲＮＡと呼ばれる。修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、例えば、（１）ホスホジエステル骨格結合において、非結合リン酸酸素の一方または両方および／もしくは結合リン酸酸素の１つ以上の改変または置換（骨格修飾）、（２）リボース糖の構成要素（例えば、リボース糖の２’ヒドロキシルの）の改変または置換（糖修飾）、（３）リン酸部分のデホスホリンカーによる大規模な置換（骨格修飾）、（４）天然に存在する核酸塩基の修飾または置換（例えば、非標準核酸塩基による）（塩基修飾）、（５）リボース－リン酸骨格の置換または修飾（骨格修飾）、（６）オリゴヌクレオチドの３’末端または５’末端の修飾（例えば、末端リン酸基の除去、修飾、もしくは置換、または部分、キャップ、もしくはリンカーの複合（かかる３’または５’キャップ修飾は、糖および／または骨格修飾を含み得る）、および（７）糖の修飾または置換（糖修飾）のうちの１つ以上を含む。

【０２４０】

修飾を組み合わせて、２、３、４、またはそれ以上の修飾を有することができるヌクレオシドおよびヌクレオチド（残基）を含む修飾ＲＮＡを提供することができる。例えば、修飾残基は、修飾糖および修飾核酸塩基を有することができる。いくつかの例では、ｇＲＮＡまたはｍＲＮＡのすべての塩基が修飾されている（例えば、すべての塩基は、ホスホロチオエート基などの修飾されたリン酸基を有する）。例えば、ｇＲＮＡまたはｍＲＮＡ分子のすべてまたは実質的にすべてのリン酸基は、ホスホロチオエート基で置き換えることができる。他の例では、修飾ＲＮＡは、ＲＮＡの５’末端またはその近く、および／またはＲＮＡの３’末端またはその近くに少なくとも１つの修飾残基を含む。

【０２４１】

いくつかの例では、修飾ｇＲＮＡまたはｍＲＮＡは、１つ、２つ、３つ、またはそれ以上の修飾残基を含む。いくつかの例では、ｇＲＮＡまたはｍＲＮＡは、ｇＲＮＡまたはｍＲＮＡの５’および３’末端の各々に１つ、２つ、３つ、またはそれ以上の修飾残基を含む。いくつかの例では、修飾ｍＲＮＡは、５、１０、１５、５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、またはそれ以上の修飾残基を含む。いくつかの例では、修飾ｇＲＮＡまたはｍＲＮＡにおける位置の少なくとも５％（例えば、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または約１００％）は、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドである。

【０２４２】

修飾されていない核酸は、例えば、細胞ヌクレアーゼによって分解されやすい可能性がある。例えば、ヌクレアーゼは、核酸ホスホジエステル結合を加水分解することができる。安定性を提供するために、本明細書に記載のＲＮＡ（例えば、ガイドＲＮＡまたはキメラＣａｓタンパク質ｍＲＮＡまたはキメラアダプタータンパク質ｍＲＮＡ）は、１つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むことができる。いくつかの例では、本明細書に記載の修飾ＲＮＡ分子は、インビボおよびエクスビボの両方で、細胞の集団に導入された場合、低減した自然免疫応答を示し得る。自然免疫応答という用語は、一本鎖核酸を含む外因性核酸に対する細胞応答を含み、サイトカインの発現および放出、特にインターフェロンの誘導、ならびに細胞死を伴う。

【０２４３】

骨格修飾のいくつかの例では、修飾残基のリン酸基が、１つ以上の酸素を異なる置換基で置き換えることによって修飾され得る骨格修飾を含むことができる。さらに、修飾さ残基（例えば、修飾核酸に存在する修飾残基）は、本明細書に記載されるように、修飾されていないリン酸部分を修飾リン酸基で大規模に置換することを含み得る。いくつかの例では、リン酸骨格の骨格修飾は、非荷電リンカーまたは非対称電荷分布を有する荷電リンカーのいずれかをもたらす改変を含み得る。

【０２４４】

修飾リン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、ホスホン酸水素、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、およびホスホトリエステルが含まれる。修飾されていないリン酸基のリン原子は、アキラルである。しかしながら、１つの非架橋酸素を上記の１つの原子または原子基に置換することは、リン原子がキラルになり得る。不斉中心性リン原子は、「Ｒ」配置または「Ｓ」配置のいずれかを保有し得る。骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドと連結する酸素）を、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）で置換することによっても修飾され得る。置換は、連結する酸素または連結する酸素の両方で生じ得る。

【０２４５】

リン酸基は、特定の骨格修飾において、リンを含まない連結因子で置換され得る。例え

ば、荷電リン酸基は、中性部分によって置換され得る。リン酸基を置換することができる部分の例には、例えば、メチルホスホネート、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルマセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノが含まれる。

【０２４６】

核酸を模倣することができる足場はまた、リン酸リンカーおよびリボース糖がヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチド代替物によって置換されるように構築され得る。かかる修飾は、骨格および糖修飾を含み得る。例えば、核酸塩基は、代替骨格によって係留され得る。例には、モルフォリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸（ＰＮＡ）ヌクレオシド代替物が含まれる。

【０２４７】

修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドはまた、糖基への１つ以上の修飾を含むことができる。例えば、２’ヒドロキシル基（ＯＨ）は、いくつかの異なるオキシもしくはデオキシ置換基で修飾または置換することができる。かかる２’ヒドロキシル基への修飾は、２’－アルコキシドイオンを形成するためにヒドロキシルを脱プロトン化することができなくなるため、核酸の安定性を増強することができる。

【０２４８】

２’ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシまたはアリールオキシ（ＯＲ、Ｒが、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたは糖であり得る）、またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、Ｏ（$CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$を含み得、Ｒが、例えば、Ｈまたは任意に置換されるアルキルであり得、ｎが、０～２０（例えば、０～４、０～８、０～１０、０～１６、１～４、１～８、１～１０、１～１６、１～２０、２～４、２～８、２～１０、２～１６、２～２０、４～８、４～１０、４～１６、および４～２０）の整数であり得る。一例では、２’ヒドロキシル基修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅであり得る。別の例では、２’ヒドロキシル基修飾は、２’－フルオロ修飾であり得、２’ヒドロキシル基をフッ化物で置換する。他の例では、２’ヒドロキシル基修飾は、２’ヒドロキシルが、例えば、C_{1-6}アルキレンまたはC_{1-6}ヘテロアルキレンブリッジによって、同じリボース糖の４’炭素に接続され得るロックド核酸（ＬＮＡ）を含み得る。例示的な架橋は、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋；Ｏ－アミノ（アミノは、例えば、NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得る）；およびアミノアルコキシ、Ｏ（$CH_2)_n$－アミノ（アミノは、例えば、NH_2、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得る）を含み得る。いくつかの例では、２’ヒドロキシル基修飾は、リボース環がＣ２’－Ｃ３’結合を欠くアンロックド核酸（ＵＮＡ）を含み得る。いくつかの例では、２’ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基（ＭＯＥ）（$OCH_2CH_2OCH_3$、例えば、ＰＥＧ誘導体）を含み得る。

【０２４９】

デオキシ２’修飾は、水素（すなわち、部分的にｄｓＲＮＡのオーバーハング部分でのデオキシリボース糖）；ハロ（例えば、ブロモ、クロロ、フルオロ、またはヨード）；アミノ（アミノは、例えば、－ＮＨ２、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸であり得る）；$NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$－アミノ（アミノは、例えば、本明細書に記載されるものであり得る）、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ（Ｒは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたは糖であり得る）、シアノ；メルカプト；アルキル－チオ－アルキル；チオアルコキシ；および

アルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルを含み得、任意に、例えば、本明細書に記載のアミノで置換され得る。

【０２５０】

糖修飾は、リボース中の対応する炭素とは反対の立体化学的配置を有する１つ以上の炭素を含み得る糖基を含むことができる。したがって、修飾核酸は、例えば、糖として、アラビノースを含むヌクレオチドを含み得る。修飾核酸はまた、脱塩基糖を含み得る。これらの脱塩基糖はまた、構成糖原子の１つ以上でさらに修飾され得る。修飾核酸はまた、Ｌ型である１つ以上の糖（例えば、Ｌ－ヌクレオシド）を含み得る。

【０２５１】

修飾核酸に組み込むことができる、本明細書に記載の修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、核酸塩基とも呼ばれる修飾塩基を含み得る。核酸塩基の例には、これらに限定されないが、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、およびウラシル（Ｕ）が含まれる。これらの核酸塩基は、修飾核酸に組み込むことができる修飾残基を提供するために修飾され得るか、または完全に置換され得る。ヌクレオチドの核酸塩基は独立して、プリン、ピリミジン、プリン類似体、またはピリミジン類似体から選択され得る。いくつかの例では、核酸塩基は、例えば、塩基の天然に存在する合成誘導体を含み得る。

【０２５２】

ｇＲＮＡもしくはｍＲＮＡの一端または両端の１つ以上の残基は、化学的に修飾され得るか、またはｇＲＮＡもしくはｍＲＮＡ全体が化学的に修飾され得る。いくつかの例は、５’末端修飾を含む。いくつかの例示的な実施形態は、３’末端修飾を含む。特定のｇＲＮＡでは、ｇＲＮＡ分子の一本鎖オーバーハングの１つ以上またはすべてのヌクレオチドが。デオキシヌクレオチドである。特定の修飾ｍＲＮＡでは、ｍＲＮＡは、５’末端および／または３’末端修飾を含むことができる。

【０２５３】

ｍＲＮＡとして提供することができるキメラＣａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、またはその両方は、安定性および／または免疫原性の特性を改善するために修飾することができる。修飾は、ｍＲＮＡ内の１つ以上のヌクレオシドに対して行われ得る。ｍＲＮＡ核酸塩基への化学修飾の例には、シュードウリジン、１－メチル－シュードウリジン、および５－メチル－シチジンが含まれる。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡ、または両方をコードするＳＡＭ　ｍＲＮＡもキャップすることができる。キャップは、例えば、＋１リボヌクレオチドがリボースの２’Ｏ位置でメチル化されているキャップ１構造であり得る。キャッピングは、例えば、インビボで優れた活性を与えることができ（例えば、天然のキャップを模倣することによって）、宿主の自然免疫系の刺激を低減する自然な構造をもたらすことができる（例えば、自然免疫系のパターン認識受容体の活性化を減少させることができる）。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡ、または両方をコードするＳＡＭ　ｍＲＮＡもポリアデニル化することができる（ポリ（Ａ）テイルを含むため）。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡ、または両方をコードするＳＡＭ　ｍＲＮＡもまた、シュードウリジンを含むように修飾することができる（例えば、シュードウリジンで完全に置換することができる）。例えば、キャップされポリアデニル化されたキメラＣａｓ　ｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質ｍＲＮＡ、またはＮ１－メチルシュードウリジンを含むＳＡＭ　ｍＲＮＡを使用することができる。同様に、キメラＣａｓｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質ｍＲＮＡ、またはＳＡＭ　ｍＲＮＡは、同義コドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。他の可能な修飾は、本明細書の他の場所でより詳細に記載される。

【０２５４】

ｍＲＮＡとして提供されるキメラＣａｓタンパク質および／またはキメラアダプタータンパク質は、安定性および／または免疫原性の特性を改善するために修飾することができる。修飾は、ｍＲＮＡ内の１つ以上のヌクレオシドに対して行われ得る。ｍＲＮＡ核酸塩

基への化学修飾の例には、シュードウリジン、１－メチル－シュードウリジン、および５－メチル－シチジンが含まれる。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡ、または両方をコードするＳＡＭ　ｍＲＮＡもキャップすることができる。キャップは、例えば、＋１リボヌクレオチドがリボースの２’Ｏ位置でメチル化されているキャップ１構造であり得る。キャッピングは、例えば、インビボで優れた活性を与えることができ（例えば、天然のキャップを模倣することによって）、宿主の自然免疫系の刺激を低減する自然な構造をもたらすことができる（例えば、自然免疫系のパターン認識受容体の活性化を減少させることができる）。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡ、または両方をコードするＳＡＭ　ｍＲＮＡもポリアデニル化することができる（ポリ（Ａ）テイルを含むため）。キメラＣａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質をコードするｍＲＮＡ、または両方をコードするＳＡＭ　ｍＲＮＡもまた、シュードウリジンを含むように修飾することができる（例えば、シュードウリジンで完全に置換することができる）。例えば、キャップされポリアデニル化されたキメラＣａｓｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質、またはＮ１－メチルシュードウリジンを含むＳＡＭ　ｍＲＮＡを使用することができる。同様に、キメラＣａｓ　ｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質ｍＲＮＡ、またはＳＡＭ　ｍＲＮＡは、同義コドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。

【０２５５】

キメラＣａｓｍＲＮＡ、キメラアダプターｍＲＮＡ、またはＳＡＭ　ｍＲＮＡは、少なくとも１つ、複数、またはすべてのウリジン位置で修飾されたウリジンを含むことができる。修飾されたウリジンは、５位で修飾されたウリジンであり得る（例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで）。修飾されたウリジンは、１位で修飾されたシュードウリジンであり得る（例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで）。修飾されたウリジンは、例えば、シュードウリジン、Ｎ１－メチル－シュードウリジン、５－メトキシウリジン、５－ヨードウリジン、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、５－メトキシウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、５－ヨードウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、Ｎ１－メチル－シュードウリジンである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンおよび５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチルシュードウリジンおよび５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、５－ヨードウリジンおよびＮ１－メチル－シュードウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾されたウリジンは、シュードウリジンおよび５－ヨードウリジンの組み合わせである。いくつかの例では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンおよび５－メトキシウリジンの組み合わせである。

【０２５６】

本明細書に開示されるキメラＣａｓ　ｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質ｍＲＮＡ、またはＳＡＭ　ｍＲＮＡはまた、Ｃａｐ０、Ｃａｐｌ、またはＣａｐ２などの５’キャップを含み得る。５’キャップは通常、ｍＲＮＡの５’から３’鎖の第１のヌクレオチドの５’位置（すなわち、第１のキャップ近位ヌクレオチド）と５’－トリホスフェートを介して連結した７－メチルグアニンリボヌクレオチド（例えば、ＡＲＣＡに関してさらに修飾され得る）である。Ｃａｐ０では、ｍＲＮＡの第１および第２のキャップ近位ヌクレオチドのリボースの両方が、２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐｌでは、ｍＲＮＡの第１および第２の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ２’－メトキシおよび２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐ２では、ｍＲＮＡの第１および第２のキャップ近位ヌクレオチドのリボースの両方が、２’－メトキシを含む。例えば、Ｋａｔｉｂａｈ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１１（３３）：１２０２５

－３０、およびＡｂｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１４（１１）：Ｅ２１０６－Ｅ２１１５を参照されたく、それらの各々は、すべ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。ヒトｍＲＮＡなどの哺乳動物ｍＲＮＡを含む大部分の内因性高等真核生物ｍＲＮＡは、ＣａｐｌまたはＣａｐ２を含む。ＣａｐｌおよびＣａｐ２とは異なるＣａｐ０および他のキャップ構造は、ＩＦＩＴ－１およびＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の構成要素によって非自己として認識されるため、ヒトなどの哺乳動物では免疫原性であり得、これはＩ型インターフェロンを含む上昇したサイトカインレベルをもたらし得る。ＩＦＩＴ－１およびＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の構成要素もまた、ｍＲＮＡとＣａｐｌまたはＣａｐ２以外のキャップとの結合についてｅＩＦ４Ｅと競合し得、ｍＲＮＡの翻訳を阻害する可能性がある。

【０２５７】

キャップは、共転写性を含み得る。例えば、ＡＲＣＡ（抗逆転キャップ類似体；Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＡＭ８０４５）は、開始時に転写物にインビトロで組み込むことができる、グアニンリボヌクレオチドの５’位置と連結した７－メチルグアニン３’－メトキシ－５’－トリホスフェートを含むキャップ類似体である。ＡＲＣＡは、第１のキャップ近位ヌクレオチドの２’位置がヒドロキシルであるＣａｐ０キャップをもたらす。例えば、Ｓｔｅｐｉｎｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）ＲＮＡ　７：１４８６－１４９５を参照されたく、すべ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。

【０２５８】

ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ；ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｎ－７１１３）またはＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧ；ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｎ－７１３３）は、共転写性Ｃａｐｌ構造を提供するために使用され得る。ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧおよびＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧの３’－Ｏ－メチル化バージョンは、ＴｒｉＬｉｎｋ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号Ｎ－７４１３およびＮ－７４３３でそれぞれ入手可能である。

【０２５９】

代替的に、キャップは、転写後にＲＮＡに追加することもできる。例えば、ワクシニアキャッピング酵素は市販されており（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、カタログ番号Ｍ２０８０Ｓ）、そのＤ１サブユニットによって提供されるＲＮＡトリホスファターゼおよびグアニリルトランスフェラーゼ活性と、そのＤ１２サブユニットによって提供されるグアニンメチルトランスフェラーゼと、を有する。そのため、Ｓ－アデノシルメチオニンおよびＧＴＰの存在下で、ＲＮＡに７－メチルグアニンを付加してＣａｐ０を付与することができる。例えば、Ｇｕｏ　ａｎｄ　Ｍｏｓｓ（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８７：４０２３－４０２７、およびＭａｏ　ａｎｄ　Ｓｈｕｍａｎ（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：２４４７２－２４４７９を参照されたく、それらの各々は、すべ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。

【０２６０】

キメラＣａｓ　ｍＲＮＡ、キメラアダプタータンパク質ｍＲＮＡ、またはＳＡＭ　ｍＲＮＡは、ポリアデニル化（ポリＡ）テイルをさらに含むことができる。ポリＡテイルは、例えば、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、または少なくとも１００のアデニン、任意に、最大３００のアデニンを含むことができる。例えば、ポリＡテイルは、９５、９６、９７、９８、９９、または１００のアデニンヌクレオチドを含むことができる。

【０２６１】

代替的に、Ｃａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、およびガイドＲＮＡは、

ＤＮＡの形態で提供され得る。ＤＮＡまたは発現カセットは、細胞または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）のゲノム（すなわち、染色体へ）への安定した組み込みのためのものであり得るか、またはそれが染色体の外側での発現のためのもの（例えば、染色体外で複製するＤＮＡ）であり得る。安定して組み込まれた発現カセットまたは核酸は、真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）のゲノムにランダムに組み込まれ得るか（すなわち、トランスジェニック）、またはそれらは、真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）のゲノムの所定の領域に組み込まれ得る（すなわち、ノックイン）。

【０２６２】

本明細書に記載の核酸または発現カセットは、真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）内でのインビボまたは細胞内でのエクスビボでの発現に好適な任意のプロモーターに作動可能に連結され得る。真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）は、本明細書の他の場所に記載されているように、任意の好適なな真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）であり得る。一例として、核酸または発現カセット（例えば、キメラＣａｓタンパク質発現カセット、キメラアダプタータンパク質発現カセット、またはキメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質の両方をコードする核酸を含むＳＡＭカセット）は、ゲノム遺伝子座で内因性プロモーターに作動可能に連結するためのものであり得る。代替的に、カセット核酸または発現カセットは、外因性プロモーター、例えば、構成的に活性なプロモーター（例えば、ＣＡＧプロモーターもしくはＵ６プロモーター）、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、時間的に制限されたプロモーター（例えば、発生的に調節されたプロモーター）、または空間的に制限されたプロモーター（例えば、細胞特異的または組織特異的プロモーター）に作動可能に連結され得る。かかるプロモーターは周知であり、本明細書の他の場所で論じられる。発現構築物で使用することができるプロモーターには、例えば、真核細胞、非ヒト真核細胞、動物細胞、非ヒト動物細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、齧歯動物細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、ウサギ細胞、多能性細胞、胚性幹（ＥＳ）細胞、または接合子のうちの１つ以上において活性なプロモーターが含まれる。かかるプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターであり得る。

【０２６３】

例えば、ガイドＲＮＡをコードする核酸は、ヒトＵ６プロモーターまたはマウスＵ６プロモーターなどのＵ６プロモーターに作動可能に連結され得る。好適なプロモーター（例えば、ガイドＲＮＡを発現するための）の特定の例には、ヒトＵ６プロモーター、ラットＵ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーター、またはマウスＵ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーターなどのＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターが含まれる。

【０２６４】

任意に、プロモーターは、第１の遺伝子（例えば、キメラＣａｓタンパク質をコードする遺伝子）および第２の遺伝子（例えば、ガイドＲＮＡまたはキメラアダプタータンパク質をコードする遺伝子）の発現を他の方向に駆動する双方向プロモーターであり得る。かかる双方向プロモーターは、（１）遠位配列要素（ＤＳＥ）、近位配列要素（ＰＳＥ）、およびＴＡＴＡボックスの３つの外部制御要素を含む完全な従来の一方向Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター、ならびに（２）ＤＳＥの５’末端に逆方向に融合されたＰＳＥおよびＴＡＴＡボックスを含む第２の基本的なＰｏｌ　ＩＩＩプロモーターで構成され得る。例えば、Ｈ１プロモーターでは、ＤＳＥはＰＳＥとＴＡＴＡボックスに隣接しており、プロモーターは、Ｕ６プロモーターに由来するＰＳＥおよびＴＡＴＡボックスを追加することによって逆方向の転写が制御されるハイブリッドプロモーターを作成することにより、双方向にすることができる。例えば、ＵＳ２０１６／００７４５３５を参照されたく、すべ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。双方向プロモーターを使用して２つの遺伝子を同時に発現させることにより、コンパクトな発現カセットを生成して

送達を容易にすることができる。

【０２６５】

１つ以上の核酸は、マルチシストロン性発現構築物またはマルチシストロン性メッセンジャーＲＮＡにおいて一緒であり得る。例えば、キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸およびキメラアダプタータンパク質をコードする核酸は、バイシストロン性発現構築物において一緒であり得る。マルチシストロン性発現ベクターは、同じｍＲＮＡ（すなわち、同じプロモーターから生成された転写物）から２つ以上の別々のタンパク質を同時に発現する。タンパク質のマルチシストロン発現のための好適な戦略には、例えば、２Ａペプチドの使用および配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）の使用が含まれる。例えば、かかる構築物は、（１）１つ以上のキメラＣａｓタンパク質および１つ以上のキメラアダプタータンパク質をコードする核酸、（２）２つ以上のキメラアダプタータンパク質をコードする核酸、（３）２つ以上のキメラＣａｓタンパク質をコードする核酸、（４）２つ以上のガイドＲＮＡをコードする核酸、（５）１つ以上のキメラＣａｓタンパク質および１つ以上のガイドＲＮＡをコードする核酸、（６）１つ以上のキメラアダプタータンパク質および１つ以上のガイドＲＮＡをコードする核酸、または（７）１つ以上のキメラＣａｓタンパク質、１つ以上のキメラアダプタータンパク質、および１つ以上のガイドＲＮＡをコードする核酸を含み得る。一例として、かかるマルチシストロン性ベクターは、１つ以上の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を使用して、ｍＲＮＡの内部領域からの翻訳の開始を可能にすることができる。別の例として、かかるマルチシストロン性ベクターは、１つ以上の２Ａペプチドを使用することができる。これらのペプチドは小さな「自己切断」ペプチドであり、一般に１８～２２アミノ酸の長さを有し、同じｍＲＮＡから等モルレベルの複数の遺伝子を生成する。リボソームは、２ＡペプチドのＣ末端でのグリシル－プロリルペプチド結合の合成をスキップし、２Ａペプチドとそのすぐ下流のペプチドの間の「切断」を引き起こす。例えば、Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　６（４）：ｅ１８５５６を参照されたく、すべ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。「切断」は、Ｃ末端にあるグリシンとプロリン残基の間で発生し、上流のシストロンが、その最後にいくつかの残基を付加し、下流のシストロンはプロリンで始まる。その結果、「切断された」下流ペプチドは、そのＮ末端にプロリンを有する。２Ａ媒介切断は、すべての真核細胞で普遍的な現象である。２Ａペプチドは、ピコルナウイルス、昆虫ウイルス、およびＣ型ロタウイルスから同定されている。例えば、Ｓｚｙｍｃｚａｋ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ｅｘｐｅｒｔ　Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．５（５）：６２７－６３８を参照されたく、すべ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。使用できる２Ａペプチドの例には、Ｔｈｏｓｅａ　ａｓｉｇｎａウイルス２Ａ（Ｔ２Ａ）、ブタテッショウウイルス－１２Ａ（Ｐ２Ａ）、ウマ鼻炎Ａウイルス（ＥＲＡＶ）２Ａ（Ｅ２Ａ）、およびＦＭＤＶ２Ａ（Ｆ２Ａ）が含まれる。例示的なＴ２Ａ、Ｐ２Ａ、Ｅ２Ａ、およびＦ２Ａ配列には、Ｔ２Ａ（ＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ；配列番号２０）；Ｐ２Ａ（ＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ；配列番号２１）；Ｅ２Ａ（ＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ；配列番号２２）；およびＦ２Ａ（ＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ；配列番号２３）が含まれる。ＧＳＧ残基は、これらのペプチドのいずれかの５’末端に付加して、切断効率を向上させることができる。

【０２６６】

核酸または発現カセットのいずれも、コード配列の上流にポリアデニル化シグナルまたは転写ターミネーターを含むことができる。例えば、キメラＣａｓタンパク質発現カセット、キメラアダプタータンパク質発現カセット、ＳＡＭ発現カセット、またはガイドＲＮＡ発現カセットは、発現カセット内のコード配列（複数可）の上流にポリアデニル化シグナルまたは転写ターミネーターを含むことができる。ポリアデニル化シグナルまたは転写ターミネーターは、部位特異的リコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ認識部位に隣接することができる。ポリアデニル化シグナルまたは転写ターミネーターは、コード配列によってコードされるタンパク質またはＲＮＡ（例えば、キメラＣａｓタンパク質

、キメラアダプタータンパク質、ガイドＲＮＡ、またはリコンビナーゼ）の転写および発現を妨げる。しかしながら、部位特異的リコンビナーゼに曝露すると、ポリアデニル化シグナルまたは転写ターミネーターが切除されると、タンパク質またはＲＮＡを発現させることができる。

【０２６７】

発現カセット（例えば、キメラＣａｓタンパク質発現カセットまたはＳＡＭ発現カセット）のかかる構成は、ポリアデニル化シグナルもしくは転写ターミネーターが組織特異的または発達段階特異的な方法で切除される場合、発現カセットを含む真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）における組織特異的発現または発達段階特異的発現を可能にし得る。例えば、キメラＣａｓタンパク質の場合、これは、細胞または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）におけるキメラＣａｓタンパク質の長期発現、あるいは真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）内の望ましくない発達段階または望ましくない細胞もしくは組織型におけるキメラＣａｓタンパク質の発現による毒性を低減し得る。例えば、Ｐａｒｉｋｈ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　１０（１）：ｅ０１１６４８４を参照されたく、すべ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。組織特異的または発生段階特異的な方法でのポリアデニル化シグナルまたは転写ターミネーターの切除は、発現カセットを含む真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）が、組織特異的または発生段階特異的プロモーターに作動可能に連結された部位特異的リコンビナーゼのコード配列をさらに含む場合に達成され得る。次いで、ポリアデニル化シグナルまたは転写ターミネーターは、それらの組織またはそれらの発生段階でのみ切除され、組織特異的発現または発生段階特異的発現を可能にする。一例では、キメラＣａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質、またはガイドＲＮＡは、肝臓特異的な様式で発現させることができる。

【０２６８】

任意の転写ターミネーターまたはポリアデニル化シグナルを使用できる。本明細書で使用される「転写ターミネーター」は、転写の終結を引き起こすＤＮＡ配列を指す。真核生物では、転写ターミネーターはタンパク質因子によって認識され、終結の後に、ポリ（Ａ）ポリメラーゼの存在下でｍＲＮＡ転写物にポリ（Ａ）テイルを追加するプロセスであるポリアデニル化が続く。哺乳動物のポリ（Ａ）シグナルは、典型的には、約４５ヌクレオチド長のコア配列で構成されており、切断およびポリアデニル化の効率を増強するのに役立つ多様な補助配列が隣接され得る。コア配列は、ポリＡ認識モチーフまたはポリＡ認識配列と呼ばれ、切断およびポリアデニル化特異性因子（ＣＰＳＦ）によって認識される、ｍＲＮＡ内の高度に保存された上流要素（ＡＡＴＡＡＡまたはＡＡＵＡＡＡ）、ならびに定義が不十分であり、切断刺激因子（ＣｓｔＦ）によって結合される下流領域（ＵまたはＧとＵが豊富）で構成される。使用できる転写ターミネーターの例には、例えば、ヒト成長ホルモン（ＨＧＨ）ポリアデニル化シグナル、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）後期ポリアデニル化シグナル、ウサギベータグロビンポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）ポリアデニル化シグナル、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）ポリアデニル化シグナル、ＡＯＸ１転写終結配列、ＣＹＣ１転写終結配列、または真核細胞における遺伝子発現の調節に適していることが知られている任意の転写終結配列が含まれる。

【０２６９】

部位特異的リコンビナーゼには、２つの組換え部位が単一の核酸内または別々の核酸上で物理的に分離されているリコンビナーゼ認識部位間の組換えを促進することができる酵素が含まれる。リコンビナーゼの例には、Ｃｒｅ、Ｆｌｐ、およびＤｒｅリコンビナーゼが含まれる。Ｃｒｅリコンビナーゼ遺伝子の一例はＣｒｅｉであり、Ｃｒｅリコンビナーゼをコードする２つのエキソンがイントロンによって分離され、原核細胞での発現を防ぐ。そのようなリコンビナーゼは、核への局在化を促進するための核局在化シグナルをさらに含むことができる（例えば、ＮＬＳ－Ｃｒｅｉ）。リコンビナーゼ認識部位には、部位

特異的リコンビナーゼによって認識され、組換え事象の基質として機能することができるヌクレオチド配列が含まれる。リコンビナーゼ認識部位の例には、ＦＲＴ、ＦＲＴ１１、ＦＲＴ７１、ａｔｔｐ、ａｔｔ、ｒｏｘ、ならびにｌｏｘＰ、ｌｏｘ５１１、ｌｏｘ２２７２、ｌｏｘ６６、ｌｏｘ７１、ｌｏｘＭ２、およびｌｏｘ５１７１などのｌｏｘ部位が含まれる。

【０２７０】

本明細書に開示される発現カセットは、他の構成要素も含むことができる。かかる発現カセット（例えば、キメラＣａｓタンパク質発現カセット、キメラアダプタータンパク質発現カセット、ＳＡＭ発現カセット、ガイドＲＮＡ発現カセット、またはリコンビナーゼ発現カセット）は、発現カセットの５’末端にある３’スプライシング配列および／またはコード配列（例えば、キメラＣａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、またはガイドＲＮＡをコードする）に続く第２のポリアデニル化シグナルをさらに含むことができる。３’スプライシング配列という用語は、スプライシング機構によって認識および結合され得る３’イントロン／エキソン境界における核酸配列を指す。発現カセットは、例えば、薬剤耐性タンパク質のコード配列を含む選択カセットをさらに含むことができる。好適な選択マーカーの例には、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（ｎｅｏｒ）、ハイグロマイシンＢホスホトランスフェラーゼ（ｈｙｇｒ）、ピューロマイシン－Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ（ｐｕｒｏｒ）、ブラストサイジンＳデアミナーゼ（ｂｓｒｒ）、キサンチン／グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ｇｐｔ）、または単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ＨＳＶ－ｋ）が含まれる。任意に、選択カセットは、部位特異的リコンビナーゼのためのリコンビナーゼ認識部位に隣接し得る。発現カセットが、上記のようにコード配列の上流にポリアデニル化シグナルに隣接するリコンビナーゼ認識部位をさらに含む場合、選択カセットは、同じリコンビナーゼ認識部位に隣接し得るか、または異なるリコンビナーゼによって認識される異なるセットのリコンビナーゼ認識部位に隣接し得る。

【０２７１】

発現カセットはまた、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質）などの１つ以上のレポータータンパク質をコードする核酸を含むことができる。任意の好適なレポータータンパク質が使用され得る。例えば、蛍光レポータータンパク質が使用され得、または非蛍光レポータータンパク質が使用され得。蛍光レポータータンパク質の例は、本明細書の他の場所で提供される。非蛍光レポータータンパク質には、例えば、ベータ－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ（例えば、ウミシイタケルシフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、およびＮａｎｏＬｕｃルシフェラーゼ）、およびベータ－グルクロニダーゼなどの組織化学的または生物発光アッセイで使用できるレポータータンパク質が含まれる。発現カセッには、フローサイトメトリーアッセイで検出できるレポータータンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質などの蛍光レポータータンパク質）および／または組織化学的アッセイで検出できるレポータータンパク質（例えば、ベータ－ガラクトシダーゼタンパク質）が含まれ得る。かかる組織化学的アッセイの一例は、Ｘ－Ｇａｌ（５－ブロモ－４－クロロ－３－インドイル－ｂ－Ｄ－ガラクトピラノシド）の加水分解を通した組織化学的なインサイツベータガラクトシダーゼ発現の可視化であり、青色沈殿物を生成するか、ベータメチルウンベリフェリルガラクトシド（ＭＵＧ）およびフルオレセインジガラクトシド（ＦＤＧ）などの蛍光発生基質を使用する。

【０２７２】

本明細書に記載の発現カセットは、任意の形態であり得る。例えば、発現カセットは、ベクターまたはプラスミド内にあり得る。発現カセットは、タンパク質またはＲＮＡの発現を指示することができる発現構築物中のプロモーターと作動可能に連結され得る（例えば、上流のポリアデニル化シグナルの除去時）。代替的に、発現カセットは、標的化ベクター内にあり得る。例えば、標的化ベクターは、発現カセットに隣接する相同性アームを含むことができ、相同性アームは、ゲノム組み込みおよび／または内因性配列の置換を容易にするために、所望の標的ゲノム遺伝子座との組換えを指示するのに好適である。

【０２７３】
触媒的に不活性なＣａｓタンパク質をコードする核酸の特定の例は、配列番号２に記載のｄＣａｓ９タンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる。任意に、核酸は、配列番号２４に記載の配列と少なくとも少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる（任意に、配列は、配列番号２に記載のｄＣａｓ９タンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のタンパク質をコードする）。

【０２７４】
キメラＣａｓタンパク質をコードする核酸の特定の例は、配列番号１に記載のキメラＣａｓタンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる。任意に、核酸は、配列番号２５に記載の配列と少なくとも少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる（任意に、配列は、配列番号１に記載のキメラＣａｓタンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のタンパク質をコードする）。

【０２７５】
アダプターをコードする核酸の特定の例は、配列番号７に記載のＭＣＰ配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる。任意に、核酸は、配列番号２６に記載の配列と少なくとも少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる（任意に、配列は、配列番号７に記載のＭＣＰタンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のタンパク質をコードする）。

【０２７６】
キメラアダプタータンパク質をコードする核酸の特定の例は、配列番号６に記載のキメラアダプタータンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる。任意に、核酸は、配列番号２７に記載の配列と少なくとも少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる（任意に、配列は、配列番号６に記載のキメラアダプタータンパク質配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のタンパク質をコードする）。

【０２７７】
転写活性化ドメインをコードする核酸の特定の例は、それぞれ配列番号３、８、または９に記載のＶＰ６４、ｐ６５、またはＨＳＦ１配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列をコードする核酸を含むか、本質的になるか、またはそれからなることができる。任意に、核酸は、それぞれ配列番号３、８、または９に記載の配列と少

なくとも少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のアミノ酸配列をコードする核酸を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなることができる（任意に、配列は、それぞれ配列番号３、８、または９に記載のＶＰ６４、ｐ６５、またはＨＳＦ１配列と少なくとも８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一のタンパク質をコードする）。

【０２７８】

相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）発現カセットの一例は、５’から３’までを含む：（ａ）３’スプライシング配列；（ｂ）第１のリコンビナーゼ認識部位（例えば、ｌｏｘＰ部位）；（ｃ）薬剤耐性遺伝子のコード配列（例えば、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（ｎｅｏｒ）コード配列）；（ｄ）ポリアデニル化シグナル；（ｅ）第２のリコンビナーゼ認識部位（例えば、ｌｏｘＰ部位）；（ｆ）キメラＣａｓタンパク質コード配列（例えば、ｄＣａｓ９－ＮＬＳ－ＶＰ６４融合タンパク質）；（ｇ）２Ａタンパク質コード配列（例えば、Ｔ２Ａコード配列）；および（ｅ）キメラアダプタータンパク質コード配列（例えば、ＭＣＰ－ＮＬＳ－ｐ６５－ＨＳＦ１）。例えば、配列番号３１（配列番号４６に記載のコード配列および配列番号４４に記載のコードタンパク質、および配列番号６１に記載のｍＲＮＡ配列）を参照されたい。

【０２７９】

一般的なガイドＲＮＡアレイ発現カセットの一例は、５’から３’までを含む：（ａ）３’スプライシング配列；（ｂ）第１のリコンビナーゼ認識部位（例えば、ｒｏｘ部位）；（ｃ）薬剤耐性遺伝子のコード配列（例えば、ピューロマイシン－Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ（ｐｕｒｏｒ）コード配列）；（ｄ）ポリアデニル化シグナル；（ｅ）第２のリコンビナーゼ認識部位（例えば、ｒｏｘ部位）；（ｆ）１つ以上のガイドＲＮＡ遺伝子を含むガイドＲＮＡ（例えば、第１のＵ６プロモーターとそれに続く第１のガイドＲＮＡコード配列、第２のＵ６プロモーターとそれに続く第２のガイドＲＮＡコード配列、および第３のＵ６プロモーターとそれに続く第３のガイドＲＮＡコード配列）。例えば、配列番号３２を参照されたい。プロモーターおよびガイドＲＮＡコード配列を含む配列番号３２の領域は、配列番号４７に記載される。マウスＴｔｒを標的とするガイドＲＮＡをコードするかかるガイドＲＮＡアレイ発現カセットは、配列番号３３に記載される。プロモーターおよびガイドＲＮＡコード配列を含む配列番号３３の領域は、配列番号４８に記載される。

【０２８０】

一般的なガイドＲＮＡアレイ発現カセットの別の例は、１つ以上のガイドＲＮＡ遺伝子（例えば、第１のＵ６プロモーターとそれに続く第１のガイドＲＮＡコード配列、第２のＵ６プロモーターとそれに続く第２のガイドＲＮＡコード配列、および第３のＵ６プロモーターとそれに続く第３のガイドＲＮＡコード配列）を含む。かかる一般的なガイドＲＮＡアレイ発現カセットは、配列番号４８に記載される。特定の遺伝子のためのかかるガイドＲＮＡアレイ発現カセットの例は、例えば、配列番号３３、４８、および４９に記載される。

【０２８１】

ＩＶ．脂質ナノ粒子ならびにガイドＲＮＡおよび他の構成要素の細胞および真核生物への導入

標的遺伝子の転写または発現を増加させるための、同じＬＮＰ内のすべてのＳＡＭシステム構成要素を細胞または真核生物に送達するための脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）も本明細書に開示される。本明細書に開示される方法は、相乗的活性化メディエーターシステムのすべての構成要素（１つ以上のガイドＲＮＡまたは核酸をコードする、キメラＣａｓタンパク質または核酸をコードする、およびキメラアダプタータンパク質または核酸をコードする）を同じＬＮＰ内で一緒に細胞または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）に導入することを含む。例えば、かかるＬＮＰは、（ａ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質を含む、キメ

ラ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）関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする核酸と、（ｂ）１つ以上の転写活性化ドメインと融合したアダプターを含む、キメラアダプタータンパク質をコードする核酸と、（ｃ）各ガイドＲＮＡが、キメラアダプタータンパク質が特異的に結合することができる１つ以上のアダプター結合要素を含む、１つ以上のガイドＲＮＡまたは１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸であって、１つ以上のガイドＲＮＡの各々が、Ｃａｓタンパク質と複合体を形成し、それを標的遺伝子内の標的配列に誘導することができ、それにより標的遺伝子の発現を増加させる、１つ以上のガイドＲＮＡまたは１つ以上のガイドＲＮＡをコードする１つ以上の核酸と、を含むカーゴを含み得る。一例では、相乗的活性化メディエーターシステムのすべての構成要素が、同じＬＮＰ内に一緒にＲＮＡの形態で導入される。「導入すること」は、核酸またはタンパク質が細胞の内部または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）内の細胞の内部にアクセスできるように、細胞または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）に核酸またはタンパク質を提示することを含む。

【０２８２】

ガイドＲＮＡは、ＲＮＡ（例えば、インビトロ転写されたＲＮＡ）の形態で、またはガイドＲＮＡをコードするＤＮＡの形態で細胞に導入することができる。同様に、キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質などのタンパク質構成要素は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはタンパク質の形態で細胞に導入することができる。ＤＮＡの形態で導入されると、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、細胞内で活性のあるプロモーターに作動可能に連結することができる。かかるＤＮＡは、１つ以上の発現構築物中にあり得る。例えば、かかる発現構築物は、単一核酸分子の構成要素であり得る。代替的に、それらは、２つ以上の核酸分子の間で任意の組み合わせで分離することができる（すなわち、１つ以上のＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡをコードするＤＮＡおよび１つ以上のｔｒａｃｒＲＮＡをコードするＤＮＡは、別個の核酸分子の構成要素であり得る）。キメラＣａｓタンパク質、キメラアダプタータンパク質、またはガイドＲＮＡをコードする核酸は、本明細書の他の場所でより詳細に論じられる。

【０２８３】

特定の例では、１つ以上のガイドＲＮＡ、キメラＣａｓタンパク質、およびキメラアダプタータンパク質は、各々、同じＬＮＰにおけるＬＮＰ媒介送達を介してＲＮＡの形態で導入される。本明細書のいずこかでより詳細に論じられるように、１つ以上のＲＮＡは、５’末端および／または３’末端に１つ以上の安定化末端修飾を含むように修飾され得る。かかる修飾には、例えば、５’末端および／または３’末端の１つ以上のホスホロチオエート結合、または５’末端および／または３’末端の１つ以上の２’－Ｏ－メチル修飾が含まれ得る。かかる方法による送達は、一過性のＣａｓ発現および／またはガイドＲＮＡの存在をもたらし、生分解性脂質はクリアランスを改善し、忍容性を改善し、免疫原性を低下させる。脂質製剤は、生体分子を分解から保護すると同時に、細胞への取り込みを改善することができる。

【０２８４】

脂質ナノ粒子は、分子間力によって互いに物理的に結合した複数の脂質分子を含む粒子である。これらには、ミクロスフェア（単層および多層ベシクル、例えばリポソームを含む）、エマルジョン中の分散相、ミセル、または懸濁液中の内相が含まれる。かかる脂質ナノ粒子は、送達のために１つ以上の核酸またはタンパク質をカプセル化するために使用することができる。カチオン性脂質を含む製剤は、核酸などのポリアニオンを送達するのに有用である。含めることができる他の脂質は、中性脂質（すなわち、非荷電または両性イオン脂質）、陰イオン脂質、トランスフェクションを増強するヘルパー脂質、およびナノ粒子がインビボで存在できる時間を増加させるステルス脂質である。好適なカチオン性脂質、中性脂質、アニオン性脂質、ヘルパー脂質、およびステルス脂質の例は、ＷＯ２０１６／０１０８４０Ａ１およびＷＯ２０１７／１７３０５４Ａ１に見出すことができ、すべての目的のためにそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。例示的な脂質

ナノ粒子は、カチオン性脂質および１つ以上の他の成分を含むことができる。一例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質を含むことができる。別の例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質およびＤＳＰＣなどの中性脂質を含むことができる。別の例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質、ＤＳＰＣなどの任意の中性脂質、およびＳ０１０、Ｓ０２４、Ｓ０２７、Ｓ０３１、またはＳ０３３などのステルス脂質を含むことができる。

【０２８５】

ＬＮＰは、（ｉ）カプセル化およびエンドソーム脱出のための脂質、（ｉｉ）安定化のための中性脂質、（ｉｉｉ）安定化のためのヘルパー脂質、および（ｉｖ）ステルス脂質のうちの１つ以上またはすべてを含み得る。例えば、Ｆｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ．２２（９）：２２２７－２２３５およびＷＯ２０１７／１７３０５４Ａ１を参照されたく、すべての目的のためにそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。特定のＬＮＰでは、カーゴは、ガイドＲＮＡまたはガイドＲＮＡをコードする核酸を含むことができる。特定のＬＮＰでは、カーゴは、ＳＡＭ　ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡ、またはガイドＲＮＡをコードする核酸を含むことができる。

【０２８６】

カプセル化およびエンドソーム脱出のための脂質は、カチオン性脂質であり得る。脂質はまた、生分解性イオン化可能脂質などの生分解性脂質であり得る。好適な脂質の一例は、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアートとも呼ばれる、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアートである脂質ＡまたはＬＰ０１である。例えば、Ｆｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ．２２（９）：２２２７－２２３５およびＷＯ２０１７／１７３０５４Ａ１を参照されたく、すべての目的のためにそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。好適な脂質の別の例は、（（５－（（ジメチルアミノ）メチル）－１，３－フェニレン）ビス（オキシ））ビス（オクタン－８，１－ジイル）ビス（デカノアート）とも呼ばれる、（（５－（（ジメチルアミノ）メチル）－１，３－フェニレン）ビス（オキシ））ビス（オクタン－８，１－ジイル）ビス（デカノアート）である脂質Ｂである。好適な脂質の別の例は、２－（（４－（（（３－（ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）ヘキサデカノイル）オキシ）プロパン－１，３－ジイル（９Ｚ，９’Ｚ，１２Ｚ，１２’Ｚ）－ビス（オクタデカ－９，１２－ジエノアート）である脂質Ｃである。好適な脂質の別の例は、３－（（（３－（ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）－１３－（オクタノイルオキシ）トリデシル３－オクチルウンデカノアートである脂質Ｄである。他の好適な脂質には、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（［（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－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）ブタノエートまたはＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ＭＣ３））としても知られる）が含まれる。

【０２８７】

本明細書に記載のＬＮＰでの使用に好適ないくつかのかかる脂質は、インビボで生分解性である。例えば、そのような脂質を含むＬＮＰには、脂質の少なくとも７５％が、８、１０、１２、２４、もしくは４８時間以内、または３、４、５、６、７、もしくは１０日以内に血漿から除去されるものが含まれる。別の例として、ＬＮＰの少なくとも５０％が、８、１０、１２、２４、もしくは４８時間以内、または３、４、５、６、７、もしくは１０日以内に血漿から除去される。

【０２８８】

かかる脂質は、それらが含まれる培地のｐＨに応じてイオン化可能であってよい。例えば、わずかに酸性の培地では、脂質はプロトン化され、したがって正電荷を帯びることが

できる。逆に、例えば、ｐＨが約７．３５である血液などのわずかに塩基性の媒体では、脂質はプロトン化されない可能性があり、したがって電荷を帯びない可能性がある。いくつかの実施形態では、脂質は、少なくとも約９、９．５、または１０のｐＨでプロトン化され得る。かかる脂質が電荷を帯びる能力は、その固有のｐＫａに関連している。例えば、脂質は、独立して、約５．８～約６．２の範囲のｐＫａを有し得る。

【０２８９】

中性脂質は、ＬＮＰを安定化し、そのプロセシングを改善するよう機能する。好適な中性脂質の例には、様々な中性、非荷電、または双性イオン性脂質が含まれる。本開示における使用に好適な中性リン脂質の例は、５－ヘプタデシルベンゼン－１，３－ジオール（レゾルシノール）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジステロイルホスファチジルコリン、または１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）、ホスホコリン（ＤＯＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ホスファチジルコリン（ＰＬＰＣ）、１，２－ジアラキドノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＡＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、卵ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）、ジラウリロイルホスファチジルコリン（ＤＬＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、１－ミリストイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（ＭＰＰＣ）、１－パルミトイル－２－ミリストイルホスファチジルコリン（ＰＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－ステアロイルホスファチジルコリン（ＰＳＰＣ）、１，２－ジアラキドイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＢＰＣ）、１－ステアロイル－２－パルミトイルホスファチジルコリン（ＳＰＰＣ）、１，２－ジエイコセノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＥＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、リソホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジリノレオイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、パルミトイルロレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、イソホスファチジルエタノールアミン、１－ステアロイル－２－オレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＳＯＰＣ）、およびこれらの組み合わせを含むが、これらには限定されない。例えば、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、およびジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）からなる群から選択され得る。

【０２９０】

ヘルパー脂質には、トランスフェクションを促進する脂質が含まれる。ヘルパー脂質がトランスフェクションを強化する機序は、粒子安定性を増強することを含み得る。特定の事例では、ヘルパー脂質は、膜融合性を増強することができる。ヘルパー脂質は、ステロイド、ステロール、およびアルキルレゾルシノールを含む。好適なヘルパー脂質の例には、コレステロール、５－ヘプタデシルレゾルシノール、およびヘミコハク酸コレステロールが含まれる。一例では、ヘルパー脂質は、コレステロールまたはヘミコハク酸コレステロールであり得る。

【０２９１】

ステルス脂質には、ナノ粒子がインビボで存在できる時間の長さを変える脂質が含まれる。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を低減し、粒子サイズを制御することによって製剤化プロセスにおいて有用である。ステルス脂質は、ＬＮＰの薬物動態特性を調節し得る。好適なステルス脂質には、脂質部分に連結された親水性頭部基を有する脂質が含まれる。

【０２９２】

ステルス脂質の親水性頭部基は、例えば、ＰＥＧ（しばしばポリ（エチレンオキシド）と呼ばれる）、ポリ（オキサゾリン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（グリセロール）、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリアミノ酸、およびポリＮ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドに基づくポリマーから選択されるポリマー部分を含み得る。Ｐ

ＥＧという用語は、ポリエチレングリコールまたは他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。特定のＬＮＰ製剤では、ＰＥＧはＰＥＧ２０００とも呼ばれるＰＥＧ－２Ｋであり、平均分子量は約２，０００ダルトンである。例えば、ＷＯ２０１７／１７３０５４Ａ１を参照されたく、すべ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。

【０２９３】

ステルス脂質の脂質部分は、例えば、独立して約Ｃ４～約Ｃ４０の飽和または不飽和の炭素原子を含むアルキル鎖長を有するジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基を含むものを含むジアシルグリセロールまたはジアシルグリカミドから由来し得、鎖は１つ以上の、例えばアミドまたはエステルなどの官能基を含み得る。ジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基は、１つ以上の置換アルキル基をさらに含み得る。

【０２９４】

一例として、ステルス脂質は、ＰＥＧ－ジラウロイルグリセロール、ＰＥＧ－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリセロール、ＰＥＧ－ジステアロイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＳＰＥ）、ＰＥＧ－ジラウリルグリカミド、ＰＥＧ－ジミリスチルグリカミド、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリカミド、およびＰＥＧ－ジステアロイルグリカミド、ＰＥＧ－コレステロール（ｌ－［８’－（コレスト－５－エン－３［ベータ］－オキシ）カルボキシアミド－３’，６’－ジオキサオクタニル］カルバモイル－［オメガ］－メチル－ポリ（エチレングリコール）、ＰＥＧ－ＤＭＢ（３，４－ジテトラデコキシルベンジル－［オメガ］－メチル－ポリ（エチレングリコール）エーテル）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ）、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－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＰＥ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＧ）、ポリ（エチレングリコール）－２０００－ジメタクリレート（ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＡ））、および１，２－ジステアリルオキシプロピル－３－アミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］（ＰＥＧ２ｋ－ＤＳＡ）から選択され得る。１つの具体的な例において、ステルス脂質は、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧであり得る。

【０２９５】

ＬＮＰは、製剤中の成分脂質の異なるそれぞれのモル比を含むことができる。ＣＣＤ脂質のモル％は、例えば、約３０モル％～約６０モル％、約３５モル％～約５５モル％、約４０モル％～約５０モル％、約４２モル％～約４７モル％、または約４５％であり得る。ヘルパー脂質のモル％は、例えば、約３０モル％～約６０モル％、約３５モル％～約５５モル％、約４０モル％～約５０モル％、約４１モル％～約４６モル％、または約４４モル％であり得る。中性脂質のモル％は、例えば、約１モル％～約２０モル％、約５モル％～約１５モル％、約７モル％～約１２モル％、または約９モル％であり得る。ステルス脂質のモル％は、例えば、約１モル％～約１０モル％、約１モル％～約５モル％、約１モル％～約３モル％、約２モル％、または約１モル％であり得る。

【０２９６】

ＬＮＰは、生分解性脂質（Ｎ）の正に帯電したアミン基と、カプセル化される核酸の負に帯電したリン酸基（Ｐ）との間で異なる比を有することができる。これは、方程式Ｎ／Ｐで数学的に表すことができる。例えば、Ｎ／Ｐ比は、約０．５～約１００、約１～約５０、約１～約２５、約１～約１０、約１～約７、約３～約５、約４～約５、約４、約４．５、または約５であり得る。Ｎ／Ｐ比はまた、約４～約７または約４．５～約６であり得る。特定の例では、Ｎ／Ｐ比は、４．５または６であり得る。

【０２９７】

いくつかのＬＮＰでは、カーゴは、Ｃａｓ　ｍＲＮＡまたはＳＡＭ　ｍＲＮＡ（例えば、キメラＣａｓタンパク質およびキメラアダプタータンパク質の両方をコードするバイシストロン性ｍＲＮＡは、例えば、２Ａをコードする配列によって分離される）、およびｇ

ＲＮＡを含み得る。Ｃａｓ　ｍＲＮＡ／ＳＡＭ　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡは、異なる比であり得る。例えば、ＬＮＰ製剤は、約２５：１～約１：２５の範囲、約１０：１～約１：１０の範囲、約５：１～約１：５の範囲、または約１：１のＣａｓ　ｍＲＮＡ／ＳＡＭ　ｍＲＮＡ対ｇＲＮＡ核酸の比を含み得る。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１～約１：５、または約１０：１のＣａｓ　ｍＲＮＡ／ＳＡＭ　ｍＲＮＡ対ｇＲＮＡ核酸の比を含み得る。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１０、２５：１、１０：１、５：１、３：１、１：１、１：１：３、１：５、１：１０、または１：２５のＣａｓ　ｍＲＮＡ／ＳＡＭ　ｍＲＮＡ対ｇＲＮＡ核酸の比を含み得る。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１～約１：２のＣａｓ　ｍＲＮＡ／ＳＡＭ　ｍＲＮＡ対ｇＲＮＡ核酸の比を含み得る。詳細な例では、Ｃａｓ　ｍＲＮＡ／ＳＡＭ　ｍＲＮＡ対ｇＲＮＡの比は、約１：１または約１：２であり得る。

【０２９８】

ＬＮＰの例示的な投薬は、全ＲＮＡ（Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡ）カーゴ含有量に関して約０．１、約０．２５、約０．３、約０．５、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約８、もしくは約１０ｍｇ／ｋｇ体重（ｍｐｋ）、または約０．１～約１０、約０．２５～約１０、約０．３～約１０、約０．５～約１０、約１～約１０、約２～約１０、約３～約１０、約４～約１０、約５～約１０、約６～約１０、約８～約１０、約０．１～約８、約０．１～約６、約０．１～約５、約０．１～約４、約０．１～約３、約０．１～約２、約０．１～約１、約０．１～約０．５、約０．１～約０．３、約０．１～約０．２５、約０．２５～約８、約０．３～約６、約０．５～約５、約１～約５、もしくは約２～約３ｍｇ／ｋｇ体重を含む。かかるＬＮＰは、例えば、静脈内に投与することができる。一例では、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ、約０．１～約１０ｍｇ／ｋｇ、または約０．０１～約０．３ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量が使用され得る。例えば、約０．０１、約０．０３、約０．１、約０．３、約０．５、約１、約２、約３、または約１０ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量が使用され得る。一例では、約０．５～約１０、約０．５～約５、約０．５～約３、約１～約１０、約１～約５、約１～約３、または約１～約２ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ用量が使用され得る。

【０２９９】

好適なＬＮＰの具体的な例は、４．５の窒素対リン酸塩（Ｎ／Ｐ）比を持ち、４５：４４：９：２のモル比で生分解性カチオン性脂質、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む。生分解性カチオン性脂質は、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアートとも呼ばれる、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアートであり得る。例えば、Ｆｉｎｎｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ．２２（９）：２２２７－２２３５を参照されたく、すべ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。Ｃａｓ９ｍＲＮＡ／ＳＡＭ　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で１：１にすることができる。好適なＬＮＰの別の具体的な例には、Ｄｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ＭＣ３）、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ－ＤＭＧが５０：３８．５：１０：１．５のモル比で含まれている。

【０３００】

好適なＬＮＰの別の具体的な例は、６の窒素対リン酸塩（Ｎ／Ｐ）比を有し、５０：３８：９：３のモル比で生分解性カチオン性脂質、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む。生分解性カチオン性脂質は、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアートとも呼ばれる、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアートであり得る。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ

／ＳＡＭ　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で１：２にすることができる。

【０３０１】

好適なＬＮＰの別の特定の例は、３の窒素対リン酸塩（Ｎ／Ｐ）比を有し、５０：１０：３８．５：１．５の比または４７：１０：４２：１の比でカチオン性脂質、構造脂質、コレステロール（例えば、コレステロール（ヒツジ）（Ａｖａｎｔｉ　７００００））、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧ（例えば、ＰＥＧ－ＤＭＧ　２０００（ＮＯＦ　Ａｍｅｒｉｃａ－ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ（登録商標）ＧＭ－０２０（ＤＭＧ－ＰＥＧ））を含む。構造脂質は、例えば、ＤＳＰＣ（例えば、ＤＳＰＣ（Ａｖａｎｔｉ　８５０３６５））、ＳＯＰＣ、ＤＯＰＣ、またはＤＯＰＥであり得る。カチオン性／イオン化可能脂質は、例えば、Ｄｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（例えば、Ｄｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（Ｂｉｏｆｉｎｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ））であり得る。

【０３０２】

好適なＬＮＰの別の特定の例には、４５：９：４４：２の比でのＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ脂質が含まれる。好適なＬＮＰの別の特定の例には、５０：１０：３９：１の比でのＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＯＰＥ、コレステロール、およびＰＥＧ脂質またはＰＥＧ　ＤＭＧが含まれる。好適なＬＮＰの別の特定の例は、５５：１０：３２．５：２．５の比でのＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを有する。好適なＬＮＰの別の特定の例は、５０：１０：３８．５：１．５の比でのＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＭＧを有する。好適なＬＮＰの別の特定の例は、５０：１０：３８．５：１．５の比でのＤｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＭＧを有する。

【０３０３】

インビボでの投与は、例えば、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、局所、鼻腔内、または筋肉内を含む任意の好適な経路によることができる。全身投与様式には、例えば、経口および非経口経路が含まれる。非経口経路の例には、静脈内、動脈内、骨内、筋肉内、皮内、皮下、鼻腔内、および腹腔内経路が含まれる。具体的な例は静脈内注入である。鼻腔内注入および硝子体内注射は、他の特定の例である。局所投与様式には、例えば、髄腔内、脳室内、実質内（例えば、線条体（例えば、尾状核または被殻へ）、大脳皮質、前中心回旋、海馬（例えば、歯状回またはＣＡ３領域）、側頭皮質、扁桃体、前頭皮質、視床、小脳、髄質、視床、視蓋、被殻、またはニグラ実質への局所的な実質内送達）、眼内、眼窩内、結膜下、硝子体内、網膜下、および強膜を介した経路が含まれる。（全身的アプローチと比較して）有意に少量の成分は、全身的に投与された場合（例えば、静脈内）と比較して、局所的に投与された場合（例えば、実質内または硝子体内）に効果を発揮し得る。局所投与様式はまた、治療有効量の成分が全身投与されるときに起こり得る潜在的に毒性の副作用の発生率を低減または排除し得る。

【０３０４】

インビボでの投与は、例えば、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、局所、鼻腔内、または筋肉内を含む任意の適切な経路によることができる。具体的な例は静脈内注入である。鼻腔内注入および硝子体内注射は、他の特定の例である。ガイドＲＮＡ（またはガイドＲＮＡをコードする核酸）を含む組成物は、１つ以上の生理学的および薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤または助剤を使用して製剤化することができる。製剤は、選択した投与経路に依存し得る。「薬学的に許容される」という用語は、担体、希釈剤、賦形剤、または補助剤が製剤の他の成分と適合性であり、そのレシピエントに実質的に有害ではないことを意味する。

【０３０５】

投与の頻度および投与回数は、例えば、ガイドＲＮＡまたはキメラＣａｓタンパク質またはキメラアダプタータンパク質ｍＲＮＡの半減期、および他の要因の中でも投与経路に依存し得る。細胞または真核生物（例えば、動物、非ヒト動物、哺乳動物、または非ヒト哺乳動物）への核酸またはタンパク質の導入は、ある期間にわたって１回または複数回実

施することができる。例えば、導入は、ある期間にわたって一度だけ、ある期間にわたって少なくとも２回、ある期間にわたって少なくとも３回、ある期間にわたって少なくとも４回、ある期間にわたって少なくとも５回、ある期間にわたって少なくとも６回、ある期間にわたって少なくとも７回、ある期間にわたって少なくとも８回、ある期間にわたって少なくとも９回、ある期間にわたって少なくとも１０回、ある期間にわたって少なくとも１１回、ある期間にわたって少なくとも１２回、ある期間にわたって少なくとも１３回、ある期間にわたって少なくとも１４回、ある期間にわたって少なくとも１５回、ある期間にわたって少なくとも１６回、ある期間にわたって少なくとも１７回、ある期間にわたって少なくとも１８回、ある期間にわたって少なくとも１９回、またはある期間にわたって少なくとも２０回、実施することができる。

【０３０６】

ＬＮＰの例示的な投薬は、全ＲＮＡ（Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡ）カーゴ含有量に関して約０．１、約０．２５、約０．３、約０．５、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約８、もしくは約１０ｍｇ／ｋｇ体重（ｍｐｋ）、または約０．１～約１０、約０．２５～約１０、約０．３～約１０、約０．５～約１０、約１～約１０、約２～約１０、約３～約１０、約４～約１０、約５～約１０、約６～約１０、約８～約１０、約０．１～約８、約０．１～約６、約０．１～約５、約０．１～約４、約０．１～約３、約０．１～約２、約０．１～約０．１、約０．１～約５、約０．１～約３、約０．１～約０．２５、約０．２５～約８、約０．３～約６、約０．５～約５、約１～約０．５、もしくは約２～約３ｍｇ／ｋｇ体重を含む。かかるＬＮＰは、例えば、静脈内に投与することができる。

【０３０７】

上記または下記で引用されているすべての特許出願、ウェブサイト、他の刊行物、アクセッション番号などは、各項目が、参照により組み込まれることが具体的にかつ個別に示されたのと同じ程度に、すべての目的に関して、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。配列の異なるバージョンが違う時間にアクセッション番号に関連付けられている場合、本出願の有効な出願日においてアクセッション番号に関連付けられるバージョンを意味する。有効な出願日とは、該当する場合、アクセッション番号に関する実際の出願日以前または優先出願の出願日を意味する。同様に、刊行物、ウェブサイトなどの異なるバージョンが違う時間に公開されている場合、別段の指定のない限り、本出願の有効な出願日の直近に公開されたバージョンを意味する。別段に他の指示がない限り、本発明の任意の特徴、ステップ、要素、実施形態、または態様を、任意の他のものと組み合わせて使用することができる。本発明は、明瞭さおよび理解の目的に対し図表および例を介していくつかの詳細が記載されているが、添付の特許請求の範囲内で、ある特定の変化および改変を実施することができることが明らかになろう。

【０３０８】

配列の簡単な説明

添付の配列表に列記されているヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、ヌクレオチド塩基のための標準的な文字略語、およびアミノ酸のための三文字表記を使用して示されている。ヌクレオチド配列は、配列の５’末端から始まって先へ（すなわち、各行で左から右へ）進み３’末端に至る標準規則に従っている。各ヌクレオチド配列の１本の鎖のみが示されているが、相補鎖は、示されている鎖を任意に参照することによって含まれると理解される。アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が提供される場合、同じアミノ酸配列をコードするそのコドン縮重バリアントもまた提供されることが理解される。アミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列が提供される場合、同じアミノ酸配列をコードするＲＮＡ配列もまた提供されることが理解される（チミンをウラシルで置き換えることにより）。アミノ酸配列は、配列のアミノ末端から始まって先へ（すなわち、各行で左から右へ）進みカルボキシ末端に至る標準規則に従っている。

【表４－１】

表４．配列の説明

配列番号	タイプ	説明
1	タンパク質	dCas9-VP64 キメラ Cas タンパク質
2	タンパク質	dCas9 タンパク質
3	タンパク質	VP64 転写活性化ドメイン
4	タンパク質	リンカーv1
5	タンパク質	リンカーv2
6	タンパク質	MCP-p65-HSF1 キメラアダプタータンパク質
7	タンパク質	MS2 コートタンパク質(MCP)
8	タンパク質	p65 転写活性化ドメイン
9	タンパク質	HSF1 転写活性化ドメイン
10	RNA	crRNA テイル
11	RNA	tracrRNA
12	RNA	gRNA 足場 v1
13	RNA	gRNA 足場 v2
14	RNA	gRNA 足場 v3
15	RNA	gRNA 足場 v4
16	RNA	MS2 結合ループ
17	DNA	ガイド RNA 標的配列と PAM v1
18	DNA	ガイド RNA 標的配列と PAM v2
19	DNA	ガイド RNA 標的配列と PAM v3
20	タンパク質	T2A
21	タンパク質	P2A
22	タンパク質	E2A
23	タンパク質	F2A
24	DNA	dCas9 タンパク質をコードする核酸
25	DNA	dCas9-VP64 キメラ Cas タンパク質をコードする DNA
26	DNA	MCP をコードする核酸
27	DNA	MCP-p65-HSF1 キメラアダプタータンパク質をコードする DNA
28	DNA	VP64 転写活性化ドメインをコードする核酸
29	DNA	p65 転写活性化ドメインをコードする核酸
30	DNA	HSF1 転写活性化ドメインをコードする核酸
31	DNA	相乗的活性化メディエーター(SAM)バイシストロン性発現カセット(dCas9-VP64-T2A-MCP-p65-HSF1)
32	DNA	一般的なガイド RNA アレイ発現カセット
33	DNA	Ttr ガイド RNA アレイ発現カセット
34	DNA	マウス Ttr ガイド RNA 標的配列 v1
35	DNA	マウス Ttr ガイド RNA 標的配列 v2
36	DNA	マウス Ttr ガイド RNA 標的配列 v3
37	RNA	マウス Ttr シングルガイド RNA v1
38	RNA	マウス Ttr シングルガイド RNA v2
39	RNA	マウス Ttr シングルガイド RNA v3
40	RNA	MS2 結合ループを備えた gRNA 足場
41	RNA	マウス Ttr ガイド RNA DNA 標的化セグメント v1
42	RNA	マウス Ttr ガイド RNA DNA 標的化セグメント v2
43	RNA	マウス Ttr ガイド RNA DNA 標的化セグメント v3
44	タンパク質	相乗的活性化メディエーター(SAM)(dCas9-VP64-T2A-MCP-p65-HSF1)
45	RNA	MS2 結合ループ備えた一般的なシングル gRNA

【表４－２】

配列番号	タイプ	説明
46	DNA	相乗的活性化メディエーター(SAM)コード配列(dCas9-VP64-T2A-MCP-p65-HSF1)
47	DNA	一般的なガイドRNAアレイプロモーターおよびガイドRNAコード配列
48	DNA	Ttrガイド RNAアレイプロモーターおよびガイドRNAコード配列
49	DNA	pscAAV Ttrアレイ
50	RNA	tracrRNA v2
51	RNA	tracrRNA v3
52	RNA	gRNA 足場 v5
53	RNA	gRNA 足場 v6
54	RNA	gRNA 足場 v7
55	RNA	マウス Ttr シングルガイド RNA v3b
56	RNA	MS2結合ループ v2を備えた gRNA 足場
57	RNA	MS2結合ループ v2備えた一般的なシングル gRNA
58	タンパク質	SV40 NLS v1
59	タンパク質	SV40 NLS v2
60	タンパク質	ヌクレオプラスミンの NLS
61	RNA	相乗的活性化メディエーター(SAM) mRNA (dCas9-VP64-T2A-MCP-p65-HSF1)

【実施例】

【０３０９】

実施例１．ＬＮＰ媒介ｄＣａｓ９　ＳＡＭ送達

本実施例では、ｄＣａｓ９（触媒性死Ｃａｓ９）相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）システムを使用して遺伝子発現を上方制御することに焦点を当てた。このシステムでは、いくつかの活性化ドメインが相互作用して、任意の１つの因子のみによって誘導され得るよりも大きな遺伝子応答を引き起こす。構成要素は、（１）単純ヘルペスウイルスタンパク質１６の４つのタンデムコピーで構成される転写活性化因子であるＶＰ６４ドメインと直接融合されたｄＣａｓ９、（２）熱ショック因子１（ＨＳＦ１）および転写因子６５（ｐ６５）の２つの追加の活性化転写因子と融合されるＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）、および（３）ＭＳ２ループ含有ｓｇＲＮＡ（ＭＳ２結合ループを含めることで長さが約９７ヌクレオチドから約１６６ヌクレオチドに増加）を含む。ＶＰ６４が転写開始部位の近くに結合するタンパク質と融合すると、それが強力な転写活性化因子として機能する。ＭＣＰは、ＭＳ２ステムループに自然に結合する。例示的なシステムでは、ＭＣＰは、ＣＲＩＳＰＲ関連ｓｇＲＮＡに操作されたＭＳ２ステムループと相互作用し、それによって結合した転写因子を適切なゲノム位置にシャトルする。

【０３１０】

このシステムの最初の反復では、３つの別個のレンチウイルスを使用して３つの別個の構成要素を送達した。３構成要素システムは、細胞培養においてある程度の柔軟性をもたらすが、この設定は動物モデルではあまり望ましくない。代わりに、最初に、マウスＲｏｓａ２６プロモーターによって駆動される１つの転写産物として、ｄＣａｓ９、ＶＰ６４、ＭＣＰ、ＨＳＦ１、およびｐ６５を導入することを選択した。次に、肝臓特異的な上方制御のために、マウスの尾静脈に組換えアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を注入することにより、ガイドＲＮＡを導入することができた。ＷＴ　ＡＡＶは、低い免疫原性を有し、高く予測可能な組み込み部位（１９番染色体上のＡＡＶＳ１）を有するため、一般に遺伝子治療に安全であると考えられている。しかしながら、遺伝子治療ベクターとしてのそれらの安全性を増加させるために、ＷＴ　ＡＡＶの組み込み能力が排除され、これらのベクターが宿主細胞核にエピソームとして残る。この実施例の目的について、すべてのＡＡＶ参照は組換えバリアントを示す。宿主に導入されると、ＡＡＶに対する免疫応答は一般に中和抗体に制限され、明確に定義される細胞傷害性応答を伴わない。非分裂細胞では、これ

らのＡＡＶエピソームは宿主細胞の寿命の間無傷のままである。細胞分裂では、ＡＡＶＤＮＡは細胞分裂によって希釈されるため、治療応答を継続するには、より多くのウイルスを投与する必要がある。これらのその後の曝露は、ウイルスの急速な中和をもたらし、したがって、宿主応答の低下をもたらす可能性がある。これを回避するために、研究者らは連続感染に代替の血清型を使用するが、これは血清型の特異性によって妨げられる。

【０３１１】

ＡＡＶ系治療法における別の懸念は、２つの逆方向末端反復間の４．６ｋｂという比較的小さなクローニング能力である。ｄＣａｓ９　ＳＡＭの完全なコード配列は約５．８ｋｂ（プロモーターを含まない）であるため、すべてのＳＡＭ構成要素が単一ＡＡＶから発現できない。これを回避する１つの方法は、マウスが、ｇＲＮＡを除くＳＡＭシステムのすべての構成要素を発現するように、Ｒｏｓａ２６遺伝子座の第１のイントロンにゲノム的に組み込まれるｄＣａｓ９－ＮＬＳ－ＶＰ６４－Ｔ２Ａ－ＭＣＰ－ＮＬＳ－ｐ６５－ＨＳＦ１発現カセットを含む、ｄＣａｓ９　ＳＡＭマウスバックグラウンドで作業することである。例えば、２０１９年３月１９日に出願された米国特許出願第１６／３５８，３９５号および２０１９年３月１９日に出願されたＰＣＴ特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０２３００９を参照されたく、それらの各々は、すべ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。これらのマウスでは、発現カセット内のＳ．　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　ｄＣａｓ９コード配列（ＣＤＳ）を、マウスでの発現のためにコドン最適化した。コードされたｄＣａｓ９には、Ｃａｓ９ヌクレアーゼ非活性にするためのＤ１０ＡおよびＮ８６３Ａの変異が含まれる。ｄＣａｓ９－ＮＬＳ－ＶＰ６４－Ｔ２Ａ－ＭＣＰ－ＮＬＳ－ｐ６５－ＨＳＦ１発現カセット（ＳＡＭ発現カセット）は、配列番号３１に記載した。相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）コード配列（ｄＣａｓ９－ＶＰ６４－Ｔ２Ａ－ＭＣＰ－ｐ６５－ＨＳＦ１）は、配列番号４６に記載し、配列番号４４に記載のタンパク質をコードする。相乗的活性化メディエーター（ＳＡＭ）ｍＲＮＡ配列（ｄＣａｓ９－ＶＰ６４－Ｔ２Ａ－ＭＣＰ－ｐ６５－ＨＳＦ１）は、配列番号６１に記載した。発現カセットは、Ｒｏｓａ２６遺伝子座の強力で普遍的な発現およびＲｏｓａ２６遺伝子座の標的化の容易さを利用するために、Ｒｏｓａ２６遺伝子座の第１のイントロンを標的とした。

【０３１２】

しかしながら、明らかな理由から、ｄＣａｓ９－ＳＡＭを発現するマウスを使用することは臨床現場では選択肢とならない。代替的に、２つ以上のＡＡＶにまたがって要素を発現させ、それらの両方が同じ細胞に感染することを期待することができる。繰り返すが、これは治療の解決法としては望ましくない。これを念頭に置いて、臨床への橋渡しができるようにこのシステムを最適化することに着手した。

【０３１３】

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、内因性エンドサイトーシス機構を利用してＬＤＬ受容体を介して分子を取り込むことにより、安全かつ効果的に核酸を細胞に送達するため、ＡＡＶの使用に代わる魅力的な選択肢となる。製剤の変動は、生物に一度導入されると粒子の安定性および指向性に影響を与え得る。さらに、様々なリガンドの抱合により、ＬＮＰの標的特異性をさらに増加されることができる。この送達方法の１つの注意点は、ＬＮＰによって肝細胞に送達された野生型Ｃａｓ９　ｍＲＮＡが、いくつかの事例において細胞取り込みから数日以内に除去される可能性があるため、宿主細胞への一時的な影響である（データは示さず）。しかしながら、ＬＮＰ送達に対する免疫応答は存在せず、許容される連続投与が可能である。残念ながら、この送達システムのｄＣａｓ９　ＳＡＭ遺伝子活性化への適用は、ＲＮＡ合成技術の制限によって制限されてきた。これらの制限は、これらの分子が１１０ヌクレオチドのプラットフォームの最大値よりも大きいため、安定化末端修飾を伴うＳＡＭｓｇＲＮＡの生成が妨げられてきた。しかしながら、最近、ＲＮＡ合成技術により、末端修飾を伴う２００個の合成ヌクレオチドに対するその能力が増加し、ＳＡＭ　ｓｇＲＮＡのＬＮＰ送達の評価が可能となった。

【０３１４】

アミロイドーシス研究モデルを作製することを目的として、トランスサイレチン（Ｔｔ

ｒ）に向けられたＳＡＭ　ｇＲＮＡの送達を試験した。野生型ＴＴＲは、解離、ミスフォールド、凝集を引き起こし、疾患を誘発するアミロイド蓄積を引き起こす。

【０３１５】

３つのＴｔｒ　ＳＡＭガイドのアレイを発現する肝臓特異的ＡＡＶ（血清型８）の尾静脈注射により、Ｔｔｒ遺伝子を正確に過剰発現させた。ＴｔｒガイドＲＮＡアレイを、図１および配列番号３３に記載さした。プロモーターおよびガイドＲＮＡコード配列を含む領域は、配列番号４８に記載した。アレイ内のガイドＲＮＡによって標的とされるマウスＴｔｒ遺伝子中のガイドＲＮＡ標的配列（ＰＡＭを含まない）は、それぞれ、配列番号３４（ＡＣＧＧＴＴＧＣＣＣＴＣＴＴＴＣＣＣＡＡ）、配列番号３５（ＡＣＴＧＴＣＡＧＡＣＴＣＡＡＡＧＧＴＧＣ）、および配列番号３６（ＧＡＣＡＡＴＡＡＧＴＡＧＴＣＴＴＡＣＴＣ）に記載した。配列番号３４（Ｔｔｒ　ｇＡ）はＴｔｒ転写開始部位の－６３に位置し、配列番号３５（Ｔｔｒ　ｇＡ２）はＴｔｒ転写開始部位の－１３４に位置し、配列番号３６（Ｔｔｒ　ｇＡ３）はＴｔｒ転写開始部位の－１１２に位置する。これらのガイドＲＮＡ標的配列を標的とする単一ガイドＲＮＡは、それぞれ、配列番号３７、３８、および３９に記載した。ガイドは、ｄＣａｓ９　ＳＡＭ構成要素をＴｔｒ転写開始部位（ＴＳＳ）の上流の１００～２００ｂｐ領域に向けるように設計した。図２を参照されたい。ＭＳ２ステムループを含む各ガイドＲＮＡの構造の一般的な概略図を図３（配列番号４５）に示した。

【０３１６】

３つの群のマウスを評価した：（１）Ｒｏｓａ２６－ｄＣａｓ９－ＳＡＭ（未処理）；（２）Ｒｏｓａ２６－ｄＣａｓ９－ＳＡＭ（ＡＡＶ８－ＧＦＰ）；（３）Ｒｏｓａ２６－ｄＣａｓ９－ＳＡＭ（ＡＡＶ８－ｇＴＴＲアレイ（Ｔｔｒを標的とする３つのガイド））。これらのマウスに、８週齢でＡＡＶ８－ＧＦＰまたはＡＡＶ８－ｇＴＴＲアレイを注入し、注入後８ヶ月まで追跡した。ＴＴＲの血清含量を、様々な初期時点で、その後毎月、ＥＬＩＳＡによって測定し、これらの動物を任意の病理学的変化について観察した。注入後８ヶ月でこれらの動物において病理学的変化は観察されなかったが、注射後１９日目までに循環ＴＴＲの初期増加が１１倍となり、５ヶ月までにＴＴＲが約４倍上昇する定常状態が見られた。図４に示すように、無関係のウイルスで処理したｄＣａｓ９　ＳＡＭマウスは、ＷＴマウスと同様に、約１０００μｇ／ｍＬの循環ＴＴＲを維持する。一方、ＡＡＶ発現ＳＡＭガイドアレイを投与したｄＣａｓ９　ＳＡＭマウスの循環ＴＴＲタンパク質レベルは、１９日目までに１１，０００μｇ／ｍＬに急上昇した。図４を参照されたい。このレベルは、ウイルス粒子が中和されるか、または自然の恒常性が回復するにつれて、時間の経過とともにゆっくりと減少した。図４を参照されたい。いずれにせよ、循環ＴＴＲタンパク質レベルは、研究マウスでの再用量に対する能力を伴わずに、１年以内に野生型近くまで低下すると予想される。

【０３１７】

ＬＮＰ上方制御は著しく短い時間の持続であると予想されたが、再用量の利点はこの制限を克服することができる。そのことを念頭に置いて、単一ＳＡＭ　Ｔｔｒ　ｓｇＲＮＡの単一ＬＮＰ送達からタンパク質の上昇をどれだけ長く維持できるかを特徴づけるように試みた。２つの群のマウスを評価した：（１）Ｒｏｓａ２６－ｄＣａｓ９－ＳＡＭ（未処理）；および（２）Ｒｏｓａ２６－ｄＣａｓ９－ＳＡＭ（Ｒ－ＬＮＰ２７７－ｇＴＴＲ（Ｔｔｒを標的とする１つのガイド））。ガイドＲＮＡによって標的化されたマウスＴｔｒ遺伝子におけるガイドＲＮＡ標的配列（ＰＡＭを含まない）は、配列番号３６（ＧＡＣＡＡＴＡＡＧＴＡＧＴＣＴＴＡＣＴＣ）に記載した。このガイドＲＮＡ標的配列を標的とする単一ガイドＲＮＡは、配列番号５５に記載した。シングルガイドＲＮＡを、最初の３つの５’および最後の３つの３’残基に２’－Ｏ－メチル類似体および３’ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むように修飾した。

【０３１８】

ＬＮＰ製剤について、エタノール中の５０ｍＭで、（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－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（ＭＣ３；Ｂｉｏｆｉｎｅ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ；Ａｖａｎｔｉ）、コレステロール（Ｃｈｏｌ；Ａｖａｎｔｉ）、および１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロメトキシポリエチレングリコール（ＰＥＧ－ＤＭＧ（２０００）；ＮＯＦ）のストック溶液を使用した。これらの脂質を混合して、５０：１０：３８．５：１．５（ＭＣ３：ＤＳＰＣ：Ｃｈｏｌ：ＰＥＧ－ＤＭＧ）のモル比を得た。ｇＲＮＡを、１０ｍＭクエン酸ナトリウム（ｐＨ５）で２２５μｇ／ｍＬに調製した。ＢｅｎｃｈＴｏｐ　Ｎａｎｏａｓｓｅｍｂｌｒ（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ）のマイクロ流体混合を使用して、ＲＮＡおよび脂質を１２ｍＬ／分の流速で、ＲＮＡ：脂質の体積比を３：１で混合した。ＬＮＰをＰＢＳ（ｐＨ７．４）で希釈して、エタノールで希釈し、続いて遠心フィルタ（Ａｍｉｃｏｎ、１０ｋＤカットオフ）を使用して濃縮した。ＲＮＡを修正Ｒｉｂｒｏｇｒｅｅｎアッセイ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によって定量化し、ＬＮＰをＴＥおよび２％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含むＴＥで定量化した。総カプセル化ＲＮＡを、Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００試料（総ＲＮＡ）－ＴＥ試料（ＲＮＡフリー）のＲＮＡを測定することによって決定した。動物に送達する前に、ＬＮＰを０．２２μｍシリンジフィルタで濾過し、２００μＬのｉ．ｖ．注入の総量でＰＢＳ（ｐＨ７．４）で適切な濃度に希釈した。

【０３１９】

３匹のマウスを群（１）で試験し、２匹のマウスを群（２）で試験した。これらのマウスに、１２週齢で２００μＬ　ＰＢＳ中の１ｍｐｋ　ＬＮＰを注入し、注入後６７日まで追跡した。ＴＴＲの血清含量を、様々な初期時点で、その後毎月、ＥＬＩＳＡによって測定した。驚いたことに、４，０００μｇ／ｍＬの増加したＴＴＲタンパク質レベルは、数週間一定のレベルで維持され、上方制御が予想よりもはるかに一時的ではなかったことを示す。図５Ａおよび５Ｂを参照されたい。注目すべきことに、ＡＡＶ送達に関連するタンパク質の最初の急上昇はかなり高いが、ＬＮＰ送達には３つのＳＡＭ　Ｔｔｒ　ｓｇＲＮＡのうちの１つのみが含まれた。さらに、ＬＮＰ送達によって達成されたＴＴＲ上方制御は、数週間顕著な程度で一定のレベルのままであったが、ＡＡＶ送達誘導によって達成された上方制御は非常に不安定であった（初期は１９日間で大幅に増加し、その後時間の経過とともに絶えず減少する）。ＡＡＶ送達は、強力な初期の上方制御を誘導し、１年を超える発現を可能としたが、時間の経過とともに低下し続けた。ＬＮＰ送達は、発現の急速な増加を可能にし、数週間安定であり、その後、次の用量が提供されない場合、タンパク質レベルが正常に回復し得る。

【０３２０】

次に、異なる用量のＬＮＰを投与した場合の効果を評価した。上記の実験と同様に、単一ＳＡＭ　Ｔｔｒ　ｓｇＲＮＡ（Ｔｔｒ　ｇＡ３）を、マウスの体重（ｍｐｋ）のキログラムあたり０．５ミリグラム、１ｍｐｋ、および２ｍｐｋの３回の投与でＬＮＰによってオスのＲｏｓａ２６－ｄＣａｓ９－ＳＡＭマウスに導入した。ＬＮＰを尾静脈から注入して、ＬＮＰの単回用量からのタンパク質の上昇を維持できる期間を特徴づけた。この一過性送達法は、約３週間の用量依存的な遺伝子活性化、および１ヶ月以上の血清ＴＴＲレベルの上昇をもたらした。加えて、用量依存的な上昇がＥＬＩＳＡによって観察された。最低用量では７倍の増加が得られ、最高用量では１５倍の増加が得られた。図６を参照されたい。連続投与の影響を評価するために、第２の研究を実施した。研究の開始時に、すべてのマウスにＴｔｒ　ｇＡ２を製剤化した０．５ｍｐｋのＬＮＰを注入し、採血を毎週行った。これらのマウスのサブセットには２週または４週で別の０．５ｍｐｋ　ＬＮＰを投与し、追加のナイーブマウスにはＬＮＰ機能を確認するために注射した（図７Ａおよび７Ｂ）。すべての事例において、再用量はＴｔｒ発現を正常にブーストした。有害作用を伴わずに単一時点で動物の再用量が成功したことは、同じ動物の連続投与が実行可能であり得ることを示唆する。マウスに、０日目でＴｔｒ　ｇＡ２を製剤化した０．５ｍｐｋ　ＬＮＰ、２週で０．５ｍｐｋで再度、および４週で０．５ｍｐｋの最終用量を３回投与した１つの追加の研究を実施した。７週間にわたって２倍を超えるＴＴＲの持続的な上方制御を観察した。図８を参照されたい。

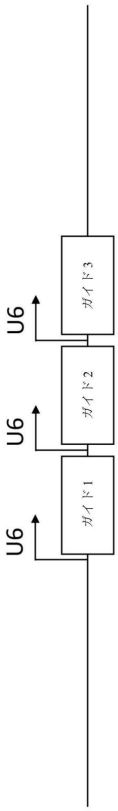
【０３２１】
単一ＬＮＰを、相乗的活性化メディエーター（ｄＣａｓ９－ＶＰ６４－Ｔ２Ａ－ＭＣＰ－ｐ６５－ＨＳＦ１）をコードするインビトロ転写ｍＲＮＡおよびＴｔｒを標的とする化学合成ＳＡＭ　ｓｇＲＮＡの両方を含むカーゴを含むように製剤化した。ｍＲＮＡをキャップし、ポリアデニル化し、非修飾またはシュードウリジン（ｐｓｕ）修飾した（すべての標準的なウラシル残基を、ウラシルが窒素－炭素ではなく炭素－炭素結合で結合されるウリジン異性体であるシュードウリジンに置換した）。ＳＡＭ　ｇＲＮＡを、最初の３つの５’および３’末端ＲＮＡ残基に２’－Ｏ－メチル類似体および３’ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むように修飾した。野生型マウスに、修飾ｍＲＮＡおよびＴｔｒを標的とするＳＡＭ　ｓｇＲＮＡ（Ｔｔｒ　ｇＡ２）を含むＬＮＰ、または未修飾ｍＲＮＡおよびＳＡＭ　ｓｇＲＮＡを含むＬＮＰを、０日目に２ｍｐｋで注入し、ＴＴＲの血清レベルを２１日間にわたって測定した。未処理の野生型マウスを陰性対照として使用した。図９に示すように、修飾ｍＲＮＡおよびＴｔｒを標的とするＳＡＭ　ｓｇＲＮＡを含むＬＮＰは、６日目までにＴＴＲ血清レベルを１０００μｇ／ｍＬ以下から３０００μｇ／ｍＬ超に正常に増加させ、未修飾ｍＲＮＡおよびＴｔｒを標的とするＳＡＭ　ｓｇＲＮＡを含むＬＮＰは、ＴＴＲ血清レベルを低い程度で増加させた。単回用量によるこの上方制御は、少なくとも２週間持続した。

【０３２２】
次に、上記のように製剤化された単一ＬＮＰを、相乗的活性化メディエーター（ｄＣａｓ９－ＶＰ６４－Ｔ２Ａ－ＭＣＰ－ｐ６５－ＨＳＦ１）をコードするインビトロ転写ｍＲＮＡ、および同じ遺伝子を標的とする複数の化学合成ＳＡＭ　ｓｇＲＮＡの両方を含むカーゴを含むように生成した。ｍＲＮＡをポリアデニル化およびキャップし（ＴｒｉＬｉｎｋ　ＣＬＥＡＮＣＡＰ（登録商標））、ＳＡＭ　ｇＲＮＡを、最初の３つの５’および３’末端ＲＮＡ残基に２’－Ｏ－メチル類似体および３’ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むように修飾した。野生型マウスにＬＮＰを注入し、ＳＡＭ　ｓｇＲＮＡによって標的とされる標的遺伝子の発現を評価した。

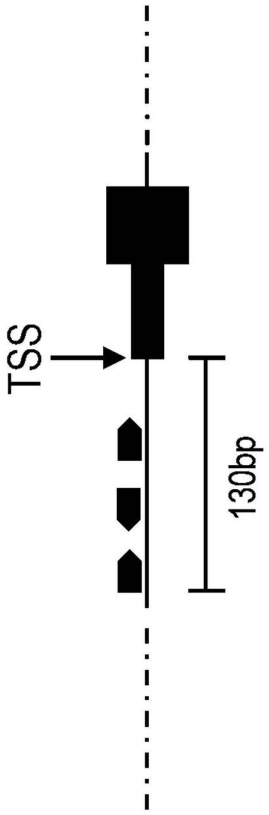
【０３２３】
ＳＡＭ　ｓｇＲＮＡを他のすべてのＳＡＭ構成要素と一緒にＬＮＰ送達することは、（１）ｄＣａｓ９　ＳＡＭ転写産物およびＳＡＭ　ｓｇＲＮＡが同じ細胞に到達することを確認し、（２）製剤／リガンドの取り込みにより、組織特異性の増加を媒介し、（３）免疫応答の恐れを伴わずに生物体を再投与し、（４）より安定した発現レベルを生成できることから、治療用ｄＣａｓ９　ＳＡＭ適用を有意に増強する。要するに、この核酸送達の組み合わせは、安全かつ予想外に安定した様式で、潜在的なｄＣａｓ９適用を大幅に増強させた。

【図面】

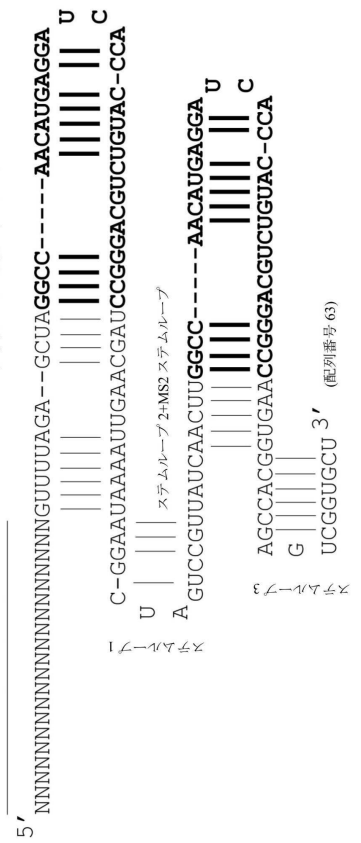
【図１】


U6
ガイド1
U6
ガイド2
U6
ガイド3

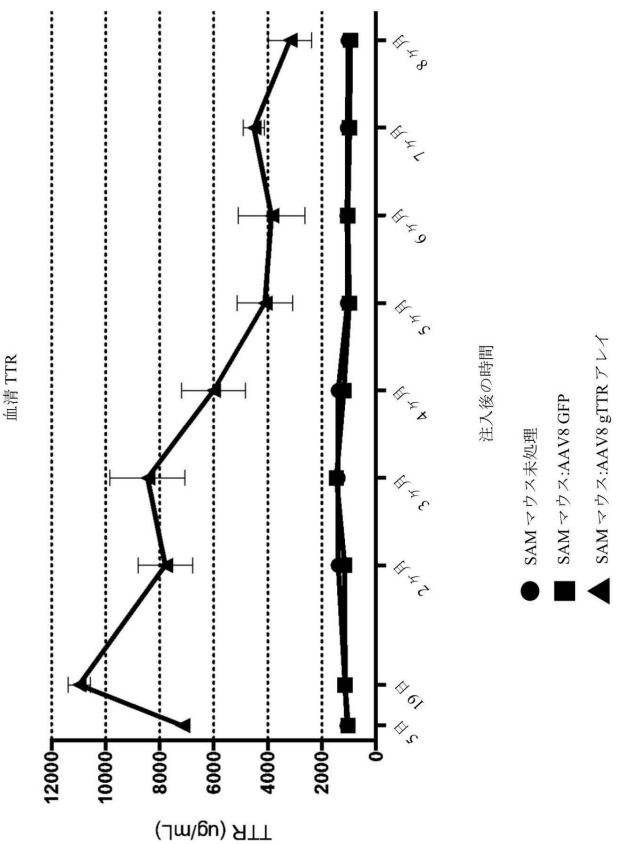
【図２】


TSS
130bp

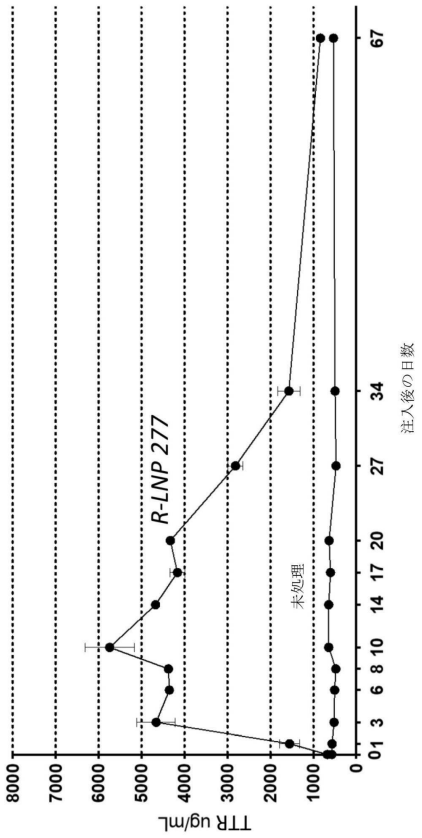
【図３】


DNA 標的化セグメント
5′
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGA--GCUAGGCC-----AACAUGAGGA
C-GGAAUAAAAUUGAACGAUCCGGGACGUCUGUAC-CCA
U
A
GUCCGUUAUCAACUUGGCC-----AACAUGAGGA
AGCCACGGUGAACCGGGACGUCUGUAC-CCA
G
UCGGUGCU 3′
テトラループ+MS2 ステムループ
ステムループ 1
ステムループ 2+MS2 ステムループ
ステムループ 3
(配列番号 63)

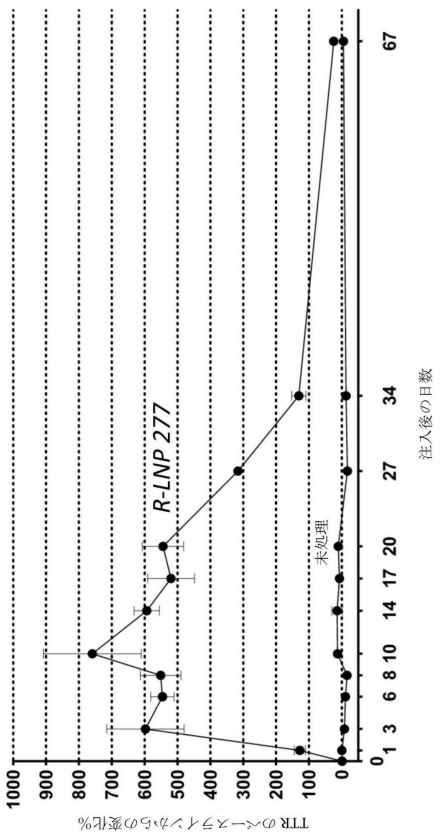
【図４】


血清 TTR
TTR (ug/mL)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
5日
19日
2ヶ月
3ヶ月
4ヶ月
5ヶ月
6ヶ月
7ヶ月
8ヶ月
注入後の時間
SAM マウス未処理
SAM マウス:AAV8 GFP
SAM マウス:AAV8 gTTR アレイ

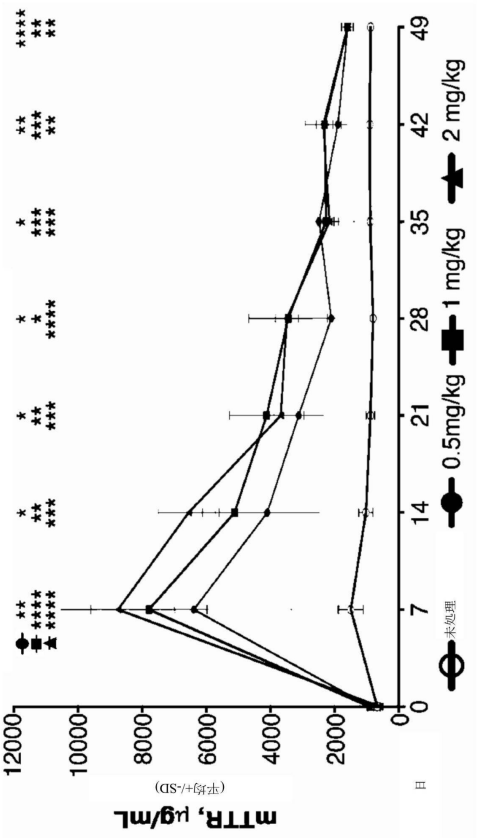
【図５Ａ】



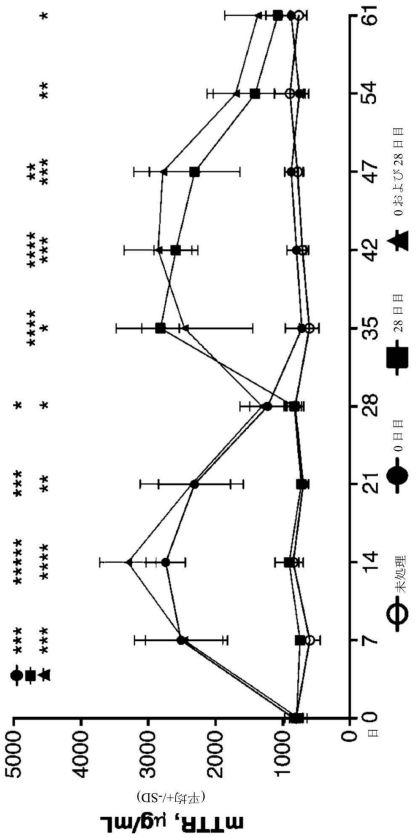
【図５Ｂ】



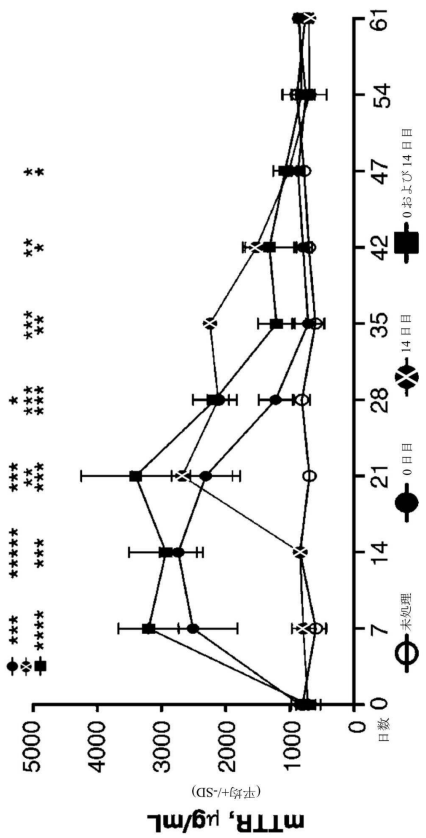
【図６】



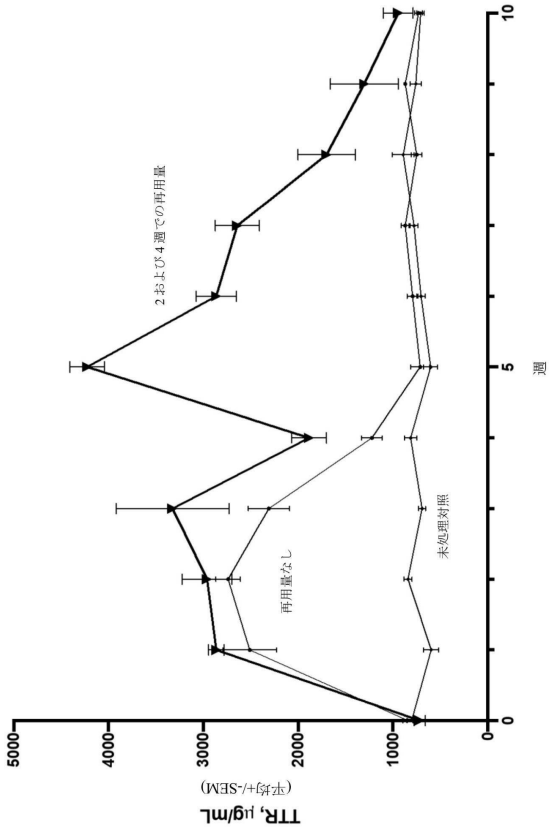
【図７Ａ】



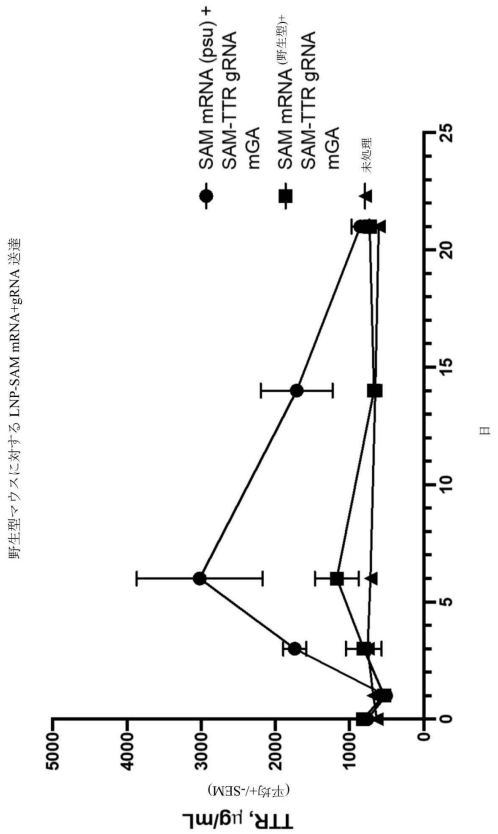
【図７Ｂ】


mTTR, μg/mL
(平均+/-SD)
日数
未処理
0 日目
14 日目
0 および 14 日目

【図８】


TTR, μg/mL
(平均+/-SEM)
週
2 および 4 週での再用量
再用量なし
未処理対照

【図９】


野生型マウスに対する LNP-SAM mRNA+gRNA 送達
SAM mRNA (psu) + SAM-TTR gRNA mGA
SAM mRNA (野生型)+ SAM-TTR gRNA mGA
未処理
TTR, μg/mL
(平均+/-SEM)
日

【配列表】
2022548031000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/050491

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K48/00 C12N9/22 C12N15/113
ADD.

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)
A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/089486 A2 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US] ET AL.) 18 June 2015 (2015-06-18) paragraph [0016] - paragraph [0018] paragraph [0081] - paragraph [0086] paragraph [0416] - paragraph [0434] -----	1-123
X	WO 2017/184786 A1 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US] ET AL.) 26 October 2017 (2017-10-26) paragraph [0027] paragraph [0483] - paragraph [0487] -----	1-123
X	WO 2017/106657 A1 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US] ET AL.) 22 June 2017 (2017-06-22) paragraph [0027]; claims 2,9,13-16 ----- -/--	1-123

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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

"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
21 December 2020	18/01/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Sprinks, Matthew

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/050491

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/106236 A1 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US] ET AL.) 30 June 2016 (2016-06-30) paragraphs [0048] - [0053] paragraph [0236] -----	1-123

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/050491

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015089486 A2	18-06-2015	EP 3080271 A2	19-10-2016
		JP 6793547 B2	02-12-2020
		JP 2017532001 A	02-11-2017
		US 2016355797 A1	08-12-2016
		US 2020115687 A1	16-04-2020
		WO 2015089486 A2	18-06-2015
WO 2017184786 A1	26-10-2017	AU 2017253107 A1	06-12-2018
		CA 3026112 A1	26-10-2017
		EP 3445853 A1	27-02-2019
		US 2020263166 A1	20-08-2020
		WO 2017184786 A1	26-10-2017
WO 2017106657 A1	22-06-2017	US 2019233814 A1	01-08-2019
		WO 2017106657 A1	22-06-2017
WO 2016106236 A1	30-06-2016	US 2017306335 A1	26-10-2017
		WO 2016106236 A1	30-06-2016

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）
A01K	*67/027 (2006.01)*	A01K	67/027	
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10	
A61K	*48/00 (2006.01)*	A61K	48/00	
A61P	*1/16 (2006.01)*	A61P	1/16	
A61P	*43/00 (2006.01)*	A61P	43/00	105
A61K	*9/16 (2006.01)*	A61K	9/16	
A61K	*47/18 (2006.01)*	A61K	47/18	
A61K	*47/24 (2006.01)*	A61K	47/24	
A61K	*47/28 (2006.01)*	A61K	47/28	
A61K	*47/34 (2017.01)*	A61K	47/34	

,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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,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．ＴＲＩＴＯＮ

ル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ハートフォード， スザンヌ
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ゴン， グオチュン
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付
(72)発明者 ザンブロウィッツ， ブライアン
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０５９１， タリータウン， オールド ソー ミル リバー ロード ７７７， リジェネロン ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド 気付

Ｆターム（参考） 4B065 AA91X AB01 AC14 AC20 BA05 CA44
4C076 AA31 DD51 DD63 DD70 EE23
4C084 AA13 NA14 ZA751 ZB211