(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-514304
(P2025-514304A)
(43)公表日　令和7年5月2日(2025.5.2)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/09 (2006.01)		C12N	15/09	100	4B065
C12N 15/55 (2006.01)		C12N	15/09	110	
C12N 15/86 (2006.01)		C12N	15/55	ZNA	
C12N 15/864 (2006.01)		C12N	15/86	Z	
C12N 15/11 (2006.01)		C12N	15/864	100Z	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全183頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-563564(P2024-563564)
(86)(22)出願日　令和5年4月28日(2023.4.28)
(85)翻訳文提出日　令和6年11月13日(2024.11.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/066343
(87)国際公開番号　WO2023/212677
(87)国際公開日　令和5年11月2日(2023.11.2)
(31)優先権主張番号　63/336,663
(32)優先日　令和4年4月29日(2022.4.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
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
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　遺伝子治療法のための組織特異的遺伝子外セーフハーバーの同定

(57)【要約】
目的の産物をコードする核酸を、細胞、細胞の集団、若しくは対象におけるゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入するため、又は目的の産物をコードする核酸を、細胞、細胞の集団、若しくは対象におけるゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現させるための組成物及び方法が提供される。ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入された目的の産物のコード配列を含む核酸構築物を含む細胞又は細胞の集団も提供される。特定の細胞又は組織型において使用するためのゲノムセーフハーバー遺伝子座を同定する方法も提供される。

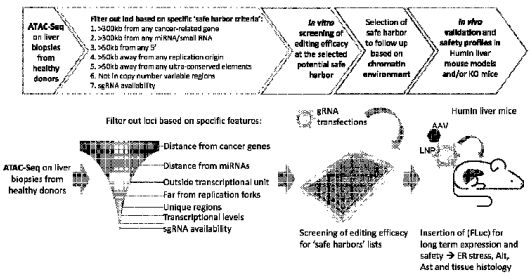


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
核酸構築物をヒト細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込む方法であって、前記ヒト細胞に、
（ａ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、前記ヌクレアーゼ剤は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、
（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び
（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに
（ｂ）前記核酸構築物であって、前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は、目的の産物をコードする、前記核酸構築物を投与することを含み、
前記ヌクレアーゼ剤は、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入される、方法。
【請求項２】
ヒト細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座から目的の産物を発現させる方法であって、前記ヒト細胞に、
（ａ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、前記ヌクレアーゼ剤は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、
（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び
（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに
（ｂ）核酸構築物であって、前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は、前記目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み、
前記ヌクレアーゼ剤は前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物は前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入されて、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座を作製し、前記目的の産物は、前記修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現する、方法。
【請求項３】
前記ヒト細胞は肝臓細胞である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記ヒト細胞は肝細胞である、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記ヒト細胞はインビトロ又はエクスビボである、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記ヒト細胞は、インビボで対象に存在する、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
核酸構築物を、ヒト対象のヒト細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込む方法

であって、前記ヒト対象に、
（ａ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、前記ヌクレアーゼ剤は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、
（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び
（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに
（ｂ）前記核酸構築物であって、前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は、目的の産物をコードする、前記核酸構築物を投与することを含み、
前記ヌクレアーゼ剤は、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入される、方法。
【請求項８】
ヒト対象のヒト細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座から目的の産物を発現させる方法であって、前記ヒト対象に、
（ａ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、前記ヌクレアーゼ剤は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、
（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び
（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに
（ｂ）核酸構築物であって、前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は、前記目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み、
前記ヌクレアーゼ剤は前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物は前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入されて、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座を作製し、前記目的の産物は、前記修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現する、方法。
【請求項９】
前記ヒト細胞は肝臓細胞である、請求項７又は８に記載の方法。
【請求項１０】
前記ヒト細胞は肝細胞である、請求項７～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記ヌクレアーゼ剤は、
（ａ）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、
（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、又は、
（ｃ）（ｉ）Ｃａｓタンパク質若しくは前記Ｃａｓタンパク質をコードする核酸、及び
（ｉｉ）ガイドＲＮＡ若しくは前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡであって、前記ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、前記ガイドＲＮＡは、前記Ｃａｓタンパク質に結合し、前記Ｃａｓタンパク質に前記ガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる、ガイドＲＮＡ若しくは前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡ、を含む、方法。
【請求項１２】

前記ヌクレアーゼ剤は、
（ａ）Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする核酸と、
（ｂ）ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡであって、前記ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、前記ガイドＲＮＡは、前記Ｃａｓタンパク質に結合し、前記Ｃａｓタンパク質に前記ガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる、ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡと、を含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記方法は、ＲＮＡの形態で前記ガイドＲＮＡを投与することを含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記ガイドＲＮＡは少なくとも１つの修飾を含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記少なくとも１つの修飾は２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記少なくとも１つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項１４又は１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記ガイドＲＮＡは単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、請求項１２～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９タンパク質である、請求項１２～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
前記Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、又はＮｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記Ｃａｓタンパク質はＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する、請求項１８に記載の方法。
【請求項２１】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸は、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項１２～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記方法は、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を投与することを含み、前記核酸は、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む、請求項１２～２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡは少なくとも１つの修飾を含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする前記１つ以上のＤＮＡは、脂質ナノ粒子と会合している、請求項１２～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、

（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び
（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される、請求項１～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標である、請求項１２～２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７であるか、又は配列番号３９に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１２～２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つからなる、請求項２６又は２７に記載の方法。
【請求項２９】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５に記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である、請求項２６又は２７に記載の方法。
【請求項３０】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２５を含む、請求項２６～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２５からなる、請求項２６～３０いずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標である、請求項１２～２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２であるか、又は配列番号４０に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１２～２５、及び３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５

のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つからなる、請求項３２又は３３に記載の方法。
【請求項３５】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６に記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である、請求項３２又は３３に記載の方法。
【請求項３６】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２６を含む、請求項３２～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２６からなる、請求項３２～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標である、請求項１２～２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３であるか、又は配列番号４１に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１２～２５、及び３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つからなる、請求項３８又は３９に記載の方法。
【請求項４１】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７に記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である、請求項３８又は３９に記載の方法。
【請求項４２】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２７を含む、請求項３８～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２７からなる、請求項３８～４２いずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７

７４６０５３７であるか、又は配列番号３９に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２であるか、又は配列番号４０に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３であるか、又は配列番号４１に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
核酸構築物をマウス細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込む方法であって、前記マウス細胞に、
（ａ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、前記ヌクレアーゼ剤は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、
（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び
（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに
（ｂ）前記核酸構築物であって、前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は、目的の産物をコードする、前記核酸構築物を投与することを含み、
前記ヌクレアーゼ剤は、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入される、方法。
【請求項５１】
マウス細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座から目的の産物を発現させる方法であって、前記マウス細胞に、
（ａ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、前記ヌクレアーゼ剤は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、
（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び
（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに
（ｂ）核酸構築物であって、前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は、前記目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤は前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物は前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入されて、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座を作製し、前記目的の産物は、前記修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現する、方法。

【請求項５２】

前記マウス細胞は肝臓細胞である、請求項５０又は５１に記載の方法。

【請求項５３】

前記マウス細胞は肝細胞である、請求項５０～５２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５４】

前記マウス細胞は、インビトロ又はエクスビボである、請求項５０～５３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５５】

前記マウス細胞は、インビボで対象に存在する、請求項５０～５３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５６】

核酸構築物を、マウス対象のマウス細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込む方法であって、前記マウス対象に、

（ａ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、前記ヌクレアーゼ剤は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、

（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、

（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び

（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに

（ｂ）前記核酸構築物であって、前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は、目的の産物をコードする、前記核酸構築物を投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤は、前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入される、方法。

【請求項５７】

マウス対象のマウス細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座から目的の産物を発現させる方法であって、前記マウス対象に、

（ａ）ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、前記ヌクレアーゼ剤は、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、

（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、

（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び

（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに

（ｂ）核酸構築物であって、前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は、前記目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み、

前記ヌクレアーゼ剤は前記ヌクレアーゼ標的部位を切断し、前記核酸構築物は前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入されて、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座を作製し、前記目的の産物は、前記修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現する、方法。

【請求項５８】
前記マウス細胞は肝臓細胞である、請求項５６又は５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記マウス細胞は肝細胞である、請求項５６～５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
前記ヌクレアーゼ剤は、
（ａ）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、
（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、又は、
（ｃ）（ｉ）Ｃａｓタンパク質若しくは前記Ｃａｓタンパク質をコードする核酸、及び
（ｉｉ）ガイドＲＮＡ若しくは前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、前記ガイドＲＮＡが、前記Ｃａｓタンパク質に結合し、前記Ｃａｓタンパク質に前記ガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる、請求項４６３～４６５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６１】
前記ヌクレアーゼ剤は、
（ａ）Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする核酸、及び
（ｂ）ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、前記ガイドＲＮＡが、前記Ｃａｓタンパク質に結合し、前記Ｃａｓタンパク質に前記ガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる、請求項４６３～４６５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項６２】
前記方法は、ＲＮＡの形態で前記ガイドＲＮＡを投与することを含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
前記ガイドＲＮＡは少なくとも１つの修飾を含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記少なくとも１つの修飾は２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記少なくとも１つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項６３又は６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記ガイドＲＮＡは単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、請求項６１～６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７】
前記Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９タンパク質である、請求項６１～６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８】
前記Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、又はＮｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する、請求項６７に記載の方法。
【請求項６９】
前記Ｃａｓタンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する、請求項６７に記載の方法。
【請求項７０】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸は、哺乳動物細胞又はマウス細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項６１～６９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７１】
前記方法は、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を投与することを含み、前記核酸は、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む、請求項６１～７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡは、少なくとも１つの修飾を含む、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
前記Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする前記１つ以上のＤＮＡは、脂質ナノ粒子と会合している、請求項６１～７２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７４】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、
（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び
（ｉｉｉ）マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される、請求項５０～７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標である、請求項６１～７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６であるか、又は配列番号４０５に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項６１～７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つからなる、請求項７５又は７６に記載の方法。
【請求項７８】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標である、請求項６１～７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６であるか、又は配列番号４０６に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項６１～７４、及び７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８０】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は

（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つからなる、請求項７８又は７９に記載の方法。
【請求項８１】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標である、請求項６１～７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８２】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２であるか、又は配列番号４０７に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項６１～７４、及び８１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８３】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つからなる、請求項８１又は８２に記載の方法。
【請求項８４】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標である、請求項５０～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８５】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６であるか、又は配列番号４０５に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項５０～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標である、請求項５０～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６であるか、又は配列番号４０６に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項５０～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標である、請求項５０～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８９】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２であるか、又は配列番号４０７に記載の配列を含むか、それから

本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項５０～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９０】
前記核酸構築物は、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記１つ以上の核酸と同時に投与される、請求項１～８９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９１】
前記核酸構築物は、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記１つ以上の核酸と同時に投与されない、請求項１～８９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９２】
前記核酸構築物は、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記１つ以上の核酸の前に投与される、請求項９１に記載の方法。
【請求項９３】
前記核酸構築物は、前記ヌクレアーゼ剤又は前記ヌクレアーゼ剤をコードする前記１つ以上の核酸の後に投与される、請求項９１に記載の方法。
【請求項９４】
前記目的の産物は目的のポリペプチドである、請求項１～９３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９５】
前記目的のポリペプチドは治療用ポリペプチドを含む、請求項９４に記載の方法。
【請求項９６】
前記目的のポリペプチドは分泌ポリペプチドである、請求項９４又は９５に記載の方法。
【請求項９７】
前記目的のポリペプチドは細胞内ポリペプチドである、請求項９４又は９５に記載の方法。
【請求項９８】
前記プロモーターは、肝臓細胞において活性である、請求項１～９７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９９】
前記プロモーターは組織特異的プロモーターである、請求項１～９８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１００】
前記プロモーターは構成的プロモーターである、請求項１～９８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０１】
前記プロモーターは誘導性プロモーターである、請求項１～９９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０２】
前記核酸構築物はホモロジーアームを含まない、請求項１～１０１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０３】
前記核酸構築物は、非相同末端結合を介して前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１０４】
前記核酸構築物はホモロジーアームを含む、請求項１～１０１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０５】
前記核酸構築物は、相同組換え修復を介して前記標的ゲノム遺伝子座に挿入される、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】

前記核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである、請求項１～１０５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０７】
前記核酸構築物は一本鎖ＤＮＡである、請求項１０６に記載の方法。
【請求項１０８】
前記核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある、請求項１～１０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０９】
前記核酸構築物は前記核酸ベクター内にある、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
前記核酸ベクターはウイルスベクターである、請求項１０９に記載の方法。
【請求項１１１】
前記核酸ベクターはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである、請求項１０９又は１１０に記載の方法。
【請求項１１２】
前記ＡＡＶベクターは一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
前記ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、ＡＡＶ－ＤＪベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する、請求項１１１又は１１２に記載の方法。
【請求項１１４】
前記ＡＡＶベクターは組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである、請求項１１１～１１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１５】
前記ＡＡＶベクターは一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである、請求項１１４に記載の方法。
【請求項１１６】
請求項１～１１５のいずれか一項に記載の方法によって作製された細胞。
【請求項１１７】
ゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込まれた核酸構築物を含むヒト細胞であって、
前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は目的の産物をコードし、
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、
（ｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び
（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される、ヒト細胞。
【請求項１１８】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、
（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び
（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される、請求項１１７に記載のヒト細胞。
【請求項１１９】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標である、請求項１１７又は１１８に記載のヒト細胞。
【請求項１２０】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７

７４６０５３７であるか、又は配列番号３９に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１１７～１１９のいずれか一項に記載のヒト細胞。
【請求項１２１】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標である、請求項１１７又は１１８に記載のヒト細胞。
【請求項１２２】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２であるか、又は配列番号４０に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１１７、１１８、及び１２１のいずれか一項に記載のヒト細胞。
【請求項１２３】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標である、請求項１１７又は１１８に記載のヒト細胞。
【請求項１２４】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３であるか、又は配列番号４１に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１１７、１１８、及び１２３のいずれか一項に記載のヒト細胞。
【請求項１２５】
ゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込まれた核酸構築物を含むマウス細胞であって、
前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は目的の産物をコードし、
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、
（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び
（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される、マウス細胞。
【請求項１２６】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、
（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び
（ｉｉｉ）マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される、請求項１２５に記載のマウス細胞。
【請求項１２７】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標である、請求項１２５又は１２６に記載のマウス細胞。
【請求項１２８】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６であるか、又は配列番号４０５に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１２５～１２７のいずれか一項に記載のマウス細胞。
【請求項１２９】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標である、請求項１２５又は１２６に記載のマウス細胞。
【請求項１３０】

前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６であるか、又は配列番号４０６に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１２５、１２６、及び１２９のいずれか一項に記載のマウス細胞。

【請求項１３１】

前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標である、請求項１２５又は１２６に記載のマウス細胞。

【請求項１３２】

前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２であるか、又は配列番号４０７に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１２５、１２６、及び１３１のいずれか一項に記載のマウス細胞。

【請求項１３３】

前記細胞は肝臓細胞である、請求項１１６～１３２のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１３４】

前記細胞は肝細胞である、請求項１１６～１３３のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１３５】

前記目的の産物が発現する、請求項１１６～１３４のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１３６】

前記目的の産物は目的のポリペプチドである、請求項１１６～１３５のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１３７】

前記目的のポリペプチドは治療用ポリペプチドを含む、請求項１３６に記載の細胞。

【請求項１３８】

前記目的のポリペプチドは分泌ポリペプチドである、請求項１３６又は１３７に記載の細胞。

【請求項１３９】

前記目的のポリペプチドは細胞内ポリペプチドである、請求項１３６又は１３７に記載の細胞。

【請求項１４０】

前記プロモーターは、肝臓細胞において活性である、請求項１１６～１３９のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１４１】

前記プロモーターは組織特異的プロモーターである、請求項１１６～１４０のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１４２】

前記プロモーターは構成的プロモーターである、請求項１１６～１４０のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１４３】

前記プロモーターは誘導性プロモーターである、請求項１１６～１４１のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１４４】

ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡを含む組成物であって、前記ガイドＲＮＡは、ゲノムセーフハーバー遺伝子座内のガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントと、Ｃａｓタンパク質に結合するタンパク質結合セグメントと、を含み、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、

（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、

（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び

（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される、組成物。
【請求項１４５】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、
（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び
（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される、請求項１４４に記載の組成物。
【請求項１４６】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標である、請求項１４４又は１４５に記載の組成物。
【請求項１４７】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７であるか、又は配列番号３９に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１４４～１４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４８】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つからなる、請求項１４６又は１４７に記載の組成物。
【請求項１４９】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５に記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である、請求項１４６又は１４７に記載の組成物。
【請求項１５０】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２５を含む、請求項１４６～１４９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５１】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２５からなる、請求項１４６～１５０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５２】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標である、請求項１４４又は１４５に記載の組成物。
【請求項１５３】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２であるか、又は配列番号４０に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１４４、１４５、及び１５２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５４】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若

しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つからなる、請求項１５２又は１５３に記載の組成物。
【請求項１５５】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６に記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である、請求項１５２又は１５３に記載の組成物。
【請求項１５６】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２６を含む、請求項１５２～１５５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５７】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２６からなる、請求項１５２～１５６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１５８】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標である、請求項１４４又は１４５に記載の組成物。
【請求項１５９】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３であるか、又は配列番号４１に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１４４、１４５、及び１５８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６０】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つからなる、請求項１５８又は１５９に記載の組成物。
【請求項１６１】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７に記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一である、請求項１５８又は１５９に記載の組成物。
【請求項１６２】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２７を含む、請求項１５８～１６１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１６３】
前記ＤＮＡ標的化セグメントは配列番号２７からなる、請求項１５８～１６２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６４】
ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡを含む組成物であって、前記ガイドＲＮＡは、ゲノムセーフハーバー遺伝子座内のガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントと、Ｃａｓタンパク質に結合するタンパク質結合セグメントと、を含み、前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、
（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び
（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される、組成物。
【請求項１６５】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、
（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び
（ｉｉｉ）マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される、請求項１６４に記載の組成物。
【請求項１６６】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標である、請求項１６４又は１６５に記載の組成物。
【請求項１６７】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６であるか、又は配列番号４０５に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１６４～１６６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１６８】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つからなる、請求項１６６又は１６７に記載の組成物。
【請求項１６９】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標である、請求項１６４又は１６５に記載の組成物。
【請求項１７０】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６であるか、又は配列番号４０６に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１６４、１６５、及び１６９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７１】

（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つからなる、請求項１６９又は１７０に記載の組成物。
【請求項１７２】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標である、請求項１６４又は１６５に記載の組成物。
【請求項１７３】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２であるか、又は配列番号４０７に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項１６４、１６５、及び１７２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７４】
（Ｉ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は
（ＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は
（ＩＩＩ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つを含み、かつ／又は
（ＩＶ）前記ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つからなる、請求項１７２又は１７３に記載の組成物。
【請求項１７５】
前記組成物は、前記ガイドＲＮＡをコードする前記ＤＮＡを含む、請求項１４４～１７４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７６】
前記ガイドＲＮＡをコードする前記ＤＮＡは核酸ベクター内にある、請求項１７５に記載の組成物。
【請求項１７７】
前記核酸ベクターはウイルスベクターである、請求項１７６に記載の組成物。
【請求項１７８】
前記核酸ベクターはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである、請求項１７６又は１７７に記載の組成物。
【請求項１７９】
前記ＡＡＶベクターは一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである、請求項１７８に記載の組成物。
【請求項１８０】
前記ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、ＡＡＶ－ＤＪベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する、請求項１７８又は１７９に記載の組成物。
【請求項１８１】
前記ＡＡＶベクターは組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである、請求項１７８～１８０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１８２】
前記ＡＡＶベクターは一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである、請求項１８１に記載の組成物。
【請求項１８３】
前記組成物は、ＲＮＡの形態で前記ガイドＲＮＡを含む、請求項１４４～１７４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８４】
前記ガイドＲＮＡは少なくとも１つの修飾を含む、請求項１８３に記載の組成物。
【請求項１８５】
前記少なくとも１つの修飾は２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項１８４に記載の組成物。
【請求項１８６】
前記少なくとも１つの修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含む、請求項１８４又は１８５に記載の組成物。
【請求項１８７】
前記ガイドＲＮＡは単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、請求項１４４～１８６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８８】
前記Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を更に含む、請求項１４４～１８７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１８９】
前記組成物は前記Ｃａｓタンパク質を含む、請求項１８８に記載の組成物。
【請求項１９０】
前記組成物は、前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸を更に含む、請求項１８８に記載の組成物。
【請求項１９１】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸は、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項１９０に記載の組成物。
【請求項１９２】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸は、前記Ｃａｓタンパク質をコードするＤＮＡを含む、請求項１９０又は１９１に記載の組成物。
【請求項１９３】
前記ガイドＲＮＡをコードする前記ＤＮＡは核酸ベクター内にある、請求項１９２に記載の組成物。
【請求項１９４】
前記核酸ベクターはウイルスベクターである、請求項１９３に記載の組成物。
【請求項１９５】
前記核酸ベクターはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである、請求項１９３又は１９４に記載の組成物。
【請求項１９６】
前記ＡＡＶベクターは一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである、請求項１９５に記載の組成物。
【請求項１９７】
前記ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、ＡＡＶ－ＤＪベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する、請求項１９５又は１９６に記載の組成物。
【請求項１９８】
前記ＡＡＶベクターは組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである、請求項１９５～１９７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１９９】
前記ＡＡＶベクターは一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである、請求項１９８に記載の組成物。
【請求項２００】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸は、前記Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む、請求項１９０又は１９１に記載の組成物。
【請求項２０１】
前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記ｍＲＮＡは少なくとも１つの修飾を含む、請求項２００に記載の組成物。
【請求項２０２】
前記Ｃａｓタンパク質又は前記Ｃａｓタンパク質をコードする前記核酸、及び前記ガイドＲＮＡ又は前記ガイドＲＮＡをコードする前記１つ以上のＤＮＡは、脂質ナノ粒子と会合している、請求項１４４～２０１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０３】
前記Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９タンパク質である、請求項１４４～２０２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０４】
前記Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、又はＮｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する、請求項２０３に記載の組成物。
【請求項２０５】
前記Ｃａｓタンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する、請求項２０３に記載の組成物。
【請求項２０６】
前記組成物は核酸構築物を更に含み、前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は目的の産物をコードする、請求項１４４～２０２のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０７】
前記目的の産物は目的のポリペプチドである、請求項２０６に記載の組成物。
【請求項２０８】
前記目的のポリペプチドは治療用ポリペプチドを含む、請求項２０７に記載の組成物。
【請求項２０９】
前記目的のポリペプチドは分泌ポリペプチドである、請求項２０７又は２０８に記載の組成物。
【請求項２１０】
前記目的のポリペプチドは細胞内ポリペプチドである、請求項２０７又は２０８に記載の組成物。
【請求項２１１】
前記プロモーターは、肝臓細胞において活性である、請求項２０６～２１０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１２】
前記プロモーターは組織特異的プロモーターである、請求項２０６～２１１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１３】
前記プロモーターは構成的プロモーターである、請求項２０６～２１１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１４】
前記プロモーターは誘導性プロモーターである、請求項２０６～２１１のいずれか一項

に記載の組成物。
【請求項２１５】
前記核酸構築物はホモロジーアームを含まない、請求項２０６～２１４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１６】
前記核酸構築物はホモロジーアームを含む、請求項２０６～２１４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１７】
前記核酸構築物は一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである、請求項２０６～２１６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１８】
前記核酸構築物は一本鎖ＤＮＡである、請求項２１７に記載の組成物。
【請求項２１９】
前記核酸構築物は核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある、請求項２０６～２１８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２０】
前記核酸構築物は前記核酸ベクター内にある、請求項２１９に記載の組成物。
【請求項２２１】
前記核酸ベクターはウイルスベクターである、請求項２２０に記載の組成物。
【請求項２２２】
前記核酸ベクターはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである、請求項２２０又は２２１に記載の組成物。
【請求項２２３】
前記ＡＡＶベクターは一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである、請求項２２２に記載の組成物。
【請求項２２４】
前記ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、ＡＡＶ－ＤＪベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する、請求項２２２又は２２３に記載の組成物。
【請求項２２５】
前記ＡＡＶベクターは組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである、請求項２２２～２２４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２６】
前記ＡＡＶベクターは一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである、請求項２２５に記載の組成物。
【請求項２２７】
組み込まれた核酸構築物を含むゲノムセーフハーバー遺伝子座を含む核酸であって、
前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は目的の産物をコードし、
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、
（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び
（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される、核酸。
【請求項２２８】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、
（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び

（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される、請求項２２７に記載の核酸。
【請求項２２９】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標である、請求項２２７又は２２８に記載の核酸。
【請求項２３０】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７であるか、又は配列番号３９に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項２２７～２２９のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項２３１】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標である、請求項２２７又は２２８に記載の核酸。
【請求項２３２】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２であるか、又は配列番号４０に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項２２７、２２８、及び２３１のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項２３３】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標である、請求項２２７又は２２８に記載の核酸。
【請求項２３４】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３であるか、又は配列番号４１に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項２２７、２２８、及び２３３のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項２３５】
組み込まれた核酸構築物を含むゲノムセーフハーバー遺伝子座を含む核酸であって、
前記核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、前記核酸は目的の産物をコードし、
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、
（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び
（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される、核酸。
【請求項２３６】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、
（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、
（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び
（ｉｉｉ）マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される、請求項２３５に記載の核酸。
【請求項２３７】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標である、請求項２３５又は２３６に記載の核酸。
【請求項２３８】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６であるか、又は配列番号４０５に記載の配列を含むか、そ

れから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項２３５～２３７のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項２３９】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標である、請求項２３５又は２３６に記載の核酸。
【請求項２４０】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６であるか、又は配列番号４０６に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項２３５、２３６、及び２３９のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項２４１】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標である、請求項２３５又は２３６に記載の核酸。
【請求項２４２】
前記ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２であるか、又は配列番号４０７に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる、請求項２３５、２３６、及び２４１のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項２４３】
前記目的の産物は目的のポリペプチドである、請求項２２７～２４２のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項２４４】
前記目的のポリペプチドは治療用ポリペプチドを含む、請求項２４３に記載の核酸。
【請求項２４５】
前記目的のポリペプチドは分泌ポリペプチドである、請求項２４３又は２４４に記載の核酸。
【請求項２４６】
前記目的のポリペプチドは細胞内ポリペプチドである、請求項２４３又は２４４に記載の核酸。
【請求項２４７】
前記プロモーターは、肝臓細胞において活性である、請求項２２７～２４６のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項２４８】
前記プロモーターは組織特異的プロモーターである、請求項２２７～２４７のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項２４９】
前記プロモーターは構成的プロモーターである、請求項２２７～２４７のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項２５０】
前記プロモーターは誘導性プロモーターである、請求項２２７～２４８のいずれか一項に記載の核酸。
【請求項２５１】
目的の組織又は細胞型において１つ以上のゲノムセーフハーバー遺伝子座を同定する方法であって、
（ａ）前記目的の組織又は細胞型においてアクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することと、
（ｂ）安全基準、機能的サイレンシング基準、及び構造的アクセス可能性基準に基づいて、工程（ａ）で同定したゲノム遺伝子座を選択することと、
（ｃ）ガイドＲＮＡの利用可能性、有効性、及び特異性に基づいて、工程（ｂ）で同定

したゲノム遺伝子座を選択することと、を含む、方法。
【請求項２５２】
工程（ａ）は、ハイスループット配列決定によるトランスポザーゼアクセス可能クロマチンについてのアッセイを使用して、アクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することを含む、請求項２５１に記載の方法。
【請求項２５３】
工程（ａ）は、ＤＮａｓｅ　Ｉ高感受性部位配列決定を使用して、アクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することを含む、請求項２５１又は２５２に記載の方法。
【請求項２５４】
工程（ａ）は、ハイスループット配列決定及びＤＮａｓｅ　Ｉ高感受性部位配列決定によるトランスポザーゼアクセス可能クロマチンについてのアッセイを使用して、アクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することを含む、請求項２５１～２５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５５】
工程（ｂ）は、安全基準、機能的サイレンシング基準、及び構造的アクセス可能性基準に基づいて、工程（ａ）で同定したゲノム遺伝子座を選択することを含む、請求項２５１～２５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５６】
工程（ｂ）の前記安全基準は、ゲノム遺伝子座が任意のがん関連遺伝子から３００ｋｂ超、任意のｍｉＲＮＡ又は低分子ＲＮＡから３００ｋｂ超、かつ任意の遺伝子の５’末端から５０ｋｂ超である場合にのみ前記ゲノム遺伝子座を選択することを含む、請求項２５１～２５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５７】
工程（ｂ）の前記機能的サイレンシング基準は、ゲノム遺伝子座が任意の複製起点から５０ｋｂ超、かつ任意の超保存エレメントから５０ｋｂ超である場合にのみ前記ゲノム遺伝子座を選択することを含む、請求項２５１～２５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５８】
工程（ｂ）の前記構造的アクセス可能性基準は、ゲノム遺伝子座がコピー数可変領域にない場合にのみ前記ゲノム遺伝子座を選択することを含む、請求項２５１～２５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５９】
工程（ｃ）の有効性は、前記目的の組織又は細胞型における有効性を編集することを含む、請求項２５１～２５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６０】
工程（ｃ）で選択した前記ゲノム遺伝子座の前記クロマチン環境をマーカーについて分析して、調節領域、ヘテロクロマチン領域、クロマチン三次元構成に関与する領域、又は転写活性領域であると予測される領域内にある任意のゲノム遺伝子座を不適格とすることを更に含む、請求項２５１～２５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６１】
前記調節領域の前記マーカーは、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、及びＨ３Ｋ４ｍｅ３を含む、請求項２６０に記載の方法。
【請求項２６２】
前記ヘテロクロマチン領域の前記マーカーはＨ３Ｋ９ｍｅ３を含む、請求項２６０又は２６１に記載の方法。
【請求項２６３】
前記クロマチン三次元構成に関与する領域の前記マーカーはＣＴＣＦを含む、請求項２６０～２６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６４】
前記転写活性領域の前記マーカーは、Ｈ３Ｋ３６ｍｅ３、ＰｏｌＲ２Ａ、ＲＮＡＳｅｑ－、及びＲＮＡＳｅｑ＋を含む、請求項２６０～２６３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６５】
工程（ａ）は、ハイスループット配列決定及びＤＮａｓｅ　Ｉ高感受性部位配列決定によるトランスポザーゼアクセス可能クロマチンについてのアッセイを使用して、アクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することを含み、
工程（ｂ）は、安全基準、機能的サイレンシング基準、及び構造的アクセス可能性基準に基づいて、工程（ａ）で同定したゲノム遺伝子座を選択することを含み、工程（ｂ）の前記安全基準は、ゲノム遺伝子座が任意のがん関連遺伝子から３００ｋｂ超、任意のｍｉＲＮＡ又は低分子ＲＮＡから３００ｋｂ超、かつ任意の遺伝子の５’末端から５０ｋｂ超である場合にのみ前記ゲノム遺伝子座を選択することを含み、工程（ｂ）の前記機能的サイレンシング基準は、ゲノム遺伝子座が任意の複製起点から５０ｋｂ超、かつ任意の超保存エレメントから５０ｋｂ超である場合にのみ前記ゲノム遺伝子座を選択することを含み、工程（ｂ）の前記構造的アクセス可能性基準は、ゲノム遺伝子座がコピー数可変領域にない場合にのみ前記ゲノム遺伝子座を選択することを含み、
工程（ｃ）で選択した前記ゲノム遺伝子座の前記クロマチン環境をマーカーについて分析して、調節領域、ヘテロクロマチン領域、クロマチン三次元構成に関与する領域、又は転写活性領域であると予測される領域内にある任意のゲノム遺伝子座を不適格とすることを更に含み、前記調節領域の前記マーカーは、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、及びＨ３Ｋ４ｍｅ３を含み、前記ヘテロクロマチン領域の前記マーカーはＨ３Ｋ９ｍｅ３を含み、前記クロマチン三次元構成に関与する領域の前記マーカーはＣＴＣＦを含み、前記転写活性領域の前記マーカーは、Ｈ３Ｋ３６ｍｅ３、ＰｏｌＲ２Ａ、ＲＮＡＳｅｑ－、及びＲＮＡＳｅｑ＋を含む、請求項２５１～２６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６６】
前記方法は、目的のヒト組織又は細胞型において１つ以上のゲノムセーフハーバー遺伝子座を同定するためのものである、請求項２５１～２６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６７】
前記目的の組織又は細胞型は肝臓である、請求項２５１～２６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６８】
前記目的の組織又は細胞型は造血細胞である、請求項２５１～２６６のいずれか一項に記載の方法。
【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、２０２２年４月２９日に出願された米国特許出願第６３／３３６，６６３号の利益を主張し、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
ＥＦＳ　ＷＥＢを介してＸＭＬファイルとして提出された配列表の参照
ファイル５９１８０６ＳＥＱＬＩＳＴ．ｘｍｌに記載された配列表は５０４キロバイトであり、２０２３年４月２７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】
現在の遺伝子治療法は、導入遺伝子のエピソーム発現及び／又は特定のゲノム遺伝子座への挿入に依存する。エピソーム法は、希釈又はサイレンシングのために肝臓に限定されることが判明している。特定の遺伝子座における組み込みは、導入遺伝子の持続的発現を可能にする。しかしながら、この手法がヒト設定において有効かつ安全であることは依然として判明していない。ＡＡＶＳ１、ＣＣＲ５、及びＲｏｓａ２６などヒトにおけるカノニカルゲノムセーフハーバー遺伝子座は、全て遺伝子内にあり、マウスゲノムセーフハーバー遺伝子座ほど研究が進んでいない。加えて、組織が異なると、定められた遺伝子座について異なるクロマチン状態を有するので、カノニカルゲノムセーフハーバーは、一部の

組織においてサイレンシングされ得る。したがって、組織特異的ゲノムセーフハーバー遺伝子座が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００４】

目的の産物をコードする核酸を、細胞、細胞の集団、若しくは対象におけるゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入するため、又は目的の産物をコードする核酸を、細胞、細胞の集団、若しくは対象におけるゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現させるための組成物及び方法が提供される。ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入された目的の産物のコード配列を含む核酸構築物を含む細胞又は細胞の集団も提供される。特定の細胞又は組織型において使用するためのゲノムセーフハーバー遺伝子座を同定する方法も提供される。

【０００５】

一態様では、ヒト細胞など細胞（例えば、哺乳動物細胞）内のゲノムセーフハーバー遺伝子座に核酸構築物を組み込む方法、ヒト細胞など細胞（例えば、哺乳動物細胞）内のゲノムセーフハーバー遺伝子座から目的の産物を発現させる方法、ヒト対象のヒト細胞など対象（例えば、哺乳動物対象）の細胞（例えば、哺乳動物細胞）内のゲノムセーフハーバー遺伝子座に核酸構築物を組み込む方法、及びヒト対象のヒト細胞など対象（例えば、哺乳動物対象）の細胞（例えば、哺乳動物細胞）内のゲノムセーフハーバー遺伝子座から目的の産物を発現させる方法が提供される。

【０００６】

核酸構築物を、ヒト細胞など細胞（例えば、哺乳動物細胞）内のゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込む方法が提供される。そのような方法は、細胞（例えば、ヒト細胞）に、（ａ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、ヌクレアーゼ剤は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに（ｂ）核酸構築物であって、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み得、ヌクレアーゼ剤はヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物はゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入される。ヒト細胞など細胞（例えば、哺乳動物細胞）内のゲノムセーフハーバー遺伝子座から目的の産物を発現させる方法も提供される。そのような方法は、細胞（例えば、ヒト細胞）に、（ａ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、ヌクレアーゼ剤は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに（ｂ）核酸構築物であって、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み得、ヌクレアーゼ剤はヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物はゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入されて、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座を作製し、目的の産物は、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現する。いくつかのそのような方法では、細胞（例えばヒト細胞）は肝臓細胞である。いくつかのそのような方法では、細胞（例えばヒト細胞）は肝細胞である。いくつかのそのような方法では、細胞（例えばヒト細胞）は、インビトロ又はエクスビボである。いくつかのそのような方法では、細胞（例えばヒト細胞）は、インビボで対象に存在する。また、核酸構築物を、ヒト対象のヒト細胞など対象（例えば、哺乳動物対象）の細胞（例え

ば、哺乳動物細胞）内のゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込む方法も提供される。そのような方法は、対象（例えば、ヒト対象）に、（ａ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、ヌクレアーゼ剤は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに（ｂ）核酸構築物であって、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み得、ヌクレアーゼ剤はヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物はゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入される。ヒト対象のヒト細胞など対象（例えば、哺乳動物対象）の細胞（例えば、哺乳動物細胞）内のゲノムセーフハーバー遺伝子座から目的の産物を発現させる方法も提供される。そのような方法は、対象（例えば、ヒト対象）に、（ａ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、ヌクレアーゼ剤は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに（ｂ）核酸構築物であって、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み得、ヌクレアーゼ剤はヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物はゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入されて、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座を作製し、目的の産物は、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現する。いくつかのそのような方法では、細胞（例えばヒト細胞）は肝臓細胞である。いくつかのそのような方法では、細胞（例えばヒト細胞）は肝細胞である。

【０００７】

いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７であるか、又は配列番号３９に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２であるか、又は配列番号４０に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３であるか、又は配列番号４１に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。

【０００８】

いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、（ａ）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、又は（ｃ）（ｉ）Ｃａｓタンパク質若しくはＣａｓタンパク質をコードする核酸、及び（ｉ

ｉ）ガイドＲＮＡ若しくはガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる。

【０００９】

いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、（ａ）Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及び（ｂ）ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような方法では、本方法は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを投与することを含む。いくつかのそのような方法では、ガイドＲＮＡは、少なくとも１つの修飾を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも１つの修飾は、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、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結合を含む。いくつかのそのような方法では、ガイドＲＮＡは、単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質である。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質は、ＣａｓＸタンパク質である。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質は、ＣａｓΦタンパク質である。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃｐｆ１タンパク質である。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、又はＮｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかのそのような方法では、本方法は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、少なくとも１つの修飾を含む。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡは、脂質ナノ粒子と会合している。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７であるか、又は配列番号３９に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７

個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５を含む。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５からなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４５に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４５に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４５を含む。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４５からなる。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２であるか、又は配列番号４０に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６を含む。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６からなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４６に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４６に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４６を含む。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番

号４６からなる。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３であるか、又は配列番号４１に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７を含む。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７からなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４７に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４７に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４７を含む。いくつかのそのような方法では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４７からなる。

【００１０】

核酸構築物をマウス細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込む方法も提供される。いくつかのそのような方法は、マウス細胞に、（ａ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、ヌクレアーゼ剤は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに（ｂ）核酸構築物であって、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み得、ヌクレアーゼ剤はヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物はゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入される。マウス細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座から目的の産物を発現させる方法も提供される。いくつかのそのような方法は、マウス細胞に、（ａ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、ヌクレアーゼ剤は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム

位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに（ｂ）核酸構築物であって、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤はヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物はゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入されて、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座を作製し、目的の産物は、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現する。いくつかのそのような方法では、マウス細胞は、肝臓細胞である。いくつかのそのような方法では、マウス細胞は、肝細胞である。いくつかのそのような方法では、マウス組織は、インビトロ又はエクスビボである。いくつかのそのような方法では、マウス細胞は、インビボで対象に存在する。核酸構築物をマウス対象のマウス細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込む方法も提供される。いくつかのそのような方法は、マウス対象に、（ａ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、ヌクレアーゼ剤は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに（ｂ）核酸構築物であって、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤はヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物はゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入される。マウス対象のマウス細胞内のゲノムセーフハーバー遺伝子座から目的の産物を発現させる方法も提供される。いくつかのそのような方法は、マウス対象に、（ａ）ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸であって、ヌクレアーゼ剤は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座におけるヌクレアーゼ標的部位を標的とし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸、並びに（ｂ）核酸構築物であって、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は目的の産物をコードする、核酸構築物を投与することを含み、ヌクレアーゼ剤はヌクレアーゼ標的部位を切断し、核酸構築物はゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入されて、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座を作製し、目的の産物は、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現する。いくつかのそのような方法では、マウス細胞は、肝臓細胞である。いくつかのそのような方法では、マウス細胞は、肝細胞である。

【００１１】

いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び（ｉｉｉ）ヒト４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６であるか、又は配列番号４０５に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。い

くつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６であるか、又は配列番号４０６に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２であるか、又は配列番号４０７に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。

【００１２】

いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、（ａ）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、又は（ｃ）（ｉ）Ｃａｓタンパク質若しくはＣａｓタンパク質をコードする核酸、及び（ｉｉ）ガイドＲＮＡ若しくはガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような方法では、ヌクレアーゼ剤は、（ａ）Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及び（ｂ）ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡを含み、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントを含み、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせる。いくつかのそのような方法では、本方法は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを投与することを含む。いくつかのそのような方法では、ガイドＲＮＡは、少なくとも１つの修飾を含む。いくつかのそのような方法では、少なくとも１つの修飾は、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような方法では、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結合を含む。いくつかのそのような方法では、ガイドＲＮＡは、単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質である。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、又はＮｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、哺乳動物細胞又はマウス細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかのそのような方法では、本方法は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を投与することを含み、核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、少なくとも１つの修飾を含む。いくつかのそのような方法では、Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡは、脂質ナノ粒子と会合している。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び（ｉｉｉ）ヒト４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６であるか、又は配列番号４０５に記載の配列を含むか、それから本質

的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６であるか、又は配列番号４０６に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標である。いくつかのそのような方法では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２であるか、又は配列番号４０７に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つからなる。いくつかのそのような方法では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のいず

れか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のいずれか１つからなる。

【００１３】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸と同時に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸と同時に投与されない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸の前に投与される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤又はヌクレアーゼ剤をコードする１つ以上の核酸の後に投与される。

【００１４】

いくつかのそのような方法では、目的の産物は、目的のポリペプチドである。いくつかのそのような方法では、目的のポリペプチドは、治療用ポリペプチドを含む。いくつかのそのような方法では、目的のポリペプチドは、分泌ポリペプチドである。いくつかのそのような方法では、目的のポリペプチドは、細胞内ポリペプチドである。

【００１５】

いくつかのそのような方法では、プロモーターは、肝臓細胞において活性である。いくつかのそのような方法では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。いくつかのそのような方法では、プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかのそのような方法では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。

【００１６】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、非相同末端結合を介して標的ゲノム遺伝子座に挿入される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含む。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、相同組換え修復を介して標的ゲノム遺伝子座に挿入される。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡである。

【００１７】

いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある。いくつかのそのような方法では、核酸構築物は、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような方法では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような方法では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、ＡＡＶ－ＤＪベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである。いくつかのそのような方法では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである。

【００１８】

別の態様では、上記方法のいずれかによって作製された細胞（例えば、ヒト細胞など哺乳動物細胞）が提供される。別の態様では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込まれた核酸構築物を含む細胞（例えば、ヒト細胞など哺乳動物細胞）が提供される。いくつかのそのような細胞では、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は、目的の産物をコードし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲ

ノム座標、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される。いくつかのそのような細胞では、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は、目的の産物をコードし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される。

【００１９】

いくつかのそのような細胞では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかのそのような細胞では、細胞は、マウス細胞である。いくつかのそのような方法では、細胞は、肝臓細胞（例えば、ヒト肝臓細胞）である。いくつかのそのような細胞では、細胞は、肝細胞（例えば、ヒト肝細胞）である。

【００２０】

いくつかのそのような細胞では、目的の産物が発現する。いくつかのそのような細胞では、目的の産物は、目的のポリペプチドである。いくつかのそのような細胞では、目的のポリペプチドは、治療用ポリペプチドを含む。いくつかのそのような細胞では、目的のポリペプチドは、分泌ポリペプチドである。いくつかのそのような細胞では、目的のポリペプチドは、細胞内ポリペプチドである。いくつかのそのような細胞では、プロモーターは、肝臓細胞において活性である。いくつかのそのような細胞では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。いくつかのそのような細胞では、プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかのそのような細胞では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。

【００２１】

いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標である。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７であるか、又は配列番号３９に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標である。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２であるか、又は配列番号４０に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標である。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３であるか、又は配列番号４１に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。

【００２２】

いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び（ｉｉｉ）ヒト４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標である。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１

４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６であるか、又は配列番号４０５に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標である。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６であるか、又は配列番号４０６に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標である。いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２であるか、又は配列番号４０７に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。

【００２３】

別の態様では、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡを含む組成物が提供され、ガイドＲＮＡは、ゲノムセーフハーバー遺伝子座内のガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントと、Ｃａｓタンパク質に結合するタンパク質結合セグメントと、を含み、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される。別の態様では、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡを含む組成物が提供され、ガイドＲＮＡは、ゲノムセーフハーバー遺伝子座内のガイドＲＮＡ標的配列を標的とするＤＮＡ標的化セグメントと、Ｃａｓタンパク質に結合するタンパク質結合セグメントと、を含み、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される。

【００２４】

いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標である。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７であるか、又は配列番号３９に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくと

も９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５を含む。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２５からなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４５に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４５に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４５を含む。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４５からなる。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標である。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２であるか、又は配列番号４０に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６を含む。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２６からなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４６に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４６に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４６を含む。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４６からなる。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標である。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座

は、ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３であるか、又は配列番号４１に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７を含む。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号２７からなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４７に記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４７に記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一である。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４７を含む。いくつかのそのような組成物では、ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号４７からなる。

【００２５】

いくつかのそのような細胞では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び（ｉｉｉ）ヒト４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標である。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６であるか、又は配列番号４０５に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８

個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標である。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６であるか、又は配列番号４０６に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標である。いくつかのそのような組成物では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２であるか、又は配列番号４０７に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つからなる。いくつかのそのような組成物では、（Ｉ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、若しくは少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含み、かつ／又は（ＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のいずれか１つに記載の配列に対して少なくとも９０％、若しくは少なくとも９５％同一であり、かつ／又は（ＩＩＩ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のいずれか１つを含み、かつ／又は（ＩＶ）ＤＮＡ標的化セグメントは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のいずれか１つからなる。

【００２６】

いくつかのかかる組成物では、組成物はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡを含む。いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター

である。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、ＡＡＶ－ＤＪベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである。いくつかのそのような組成物では、組成物は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを含む。いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、少なくとも１つの修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、少なくとも１つの修飾は、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかのそのような組成物では、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結合を含む。いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡは、単一のガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である。

【００２７】

いくつかのかかる組成物では、組成物は、Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸を更に含む。いくつかのそのような組成物では、組成物はＣａｓタンパク質を含む。いくつかのそのような組成物では、組成物は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含む。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、哺乳動物細胞又はヒト細胞における発現のためにコドン最適化されている。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするＤＮＡを含む。いくつかのそのような組成物では、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、ＡＡＶ－ＤＪベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡは、少なくとも１つの修飾を含む。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質又はＣａｓタンパク質をコードする核酸、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする１つ以上のＤＮＡは、脂質ナノ粒子と会合している。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質である。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質は、ＣａｓＸタンパク質である。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質は、ＣａｓΦタンパク質である。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃｐｆ１タンパク質である。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ Ｃａｓ９タンパク質、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ Ｃａｓ９タンパク質、又はＮｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する。いくつかのそのような組成物では、Ｃａｓタンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９タンパク質に由来する。

【００２８】

いくつかのそのような組成物では、組成物は、核酸構築物を更に含み、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は、目的の産物をコードする。いくつかのそのような組成物では、目的の産物は、目的のポリペプチドである。いくつかの

そのような組成物では、目的のポリペプチドは、治療用ポリペプチドを含む。いくつかのそのような組成物では、目的のポリペプチドは、分泌ポリペプチドである。いくつかのそのような組成物では、目的のポリペプチドは、細胞内ポリペプチドである。いくつかのそのような組成物では、プロモーターは、肝臓細胞において活性である。いくつかのそのような組成物では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。いくつかのそのような組成物では、プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかのそのような組成物では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、ホモロジーアームを含む。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡ又は二本鎖ＤＮＡである。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡである。

【００２９】

いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター又は脂質ナノ粒子内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸構築物は、核酸ベクター内にある。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかのそのような組成物では、核酸ベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、ＡＡＶ８ベクター、ＡＡＶ３Ｂベクター、ＡＡＶ５ベクター、ＡＡＶ６ベクター、ＡＡＶ７ベクター、ＡＡＶ９ベクター、ＡＡＶｒｈ．７４ベクター、ＡＡＶ－ＤＪベクター、又はＡＡＶｈｕ．３７ベクターに由来する。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）ベクターである。いくつかのそのような組成物では、ＡＡＶベクターは、一本鎖ｒＡＡＶ８ベクターである。

【００３０】

別の態様では、組み込まれた核酸構築物を含むゲノムセーフハーバー遺伝子座を含む核酸が提供される。いくつかのそのような核酸では、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は目的の産物をコードし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標、（ｉｉ）ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標から選択される。いくつかのそのような核酸では、核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み、核酸は目的の産物をコードし、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標、（ｉｉ）マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標から選択される。

【００３１】

いくつかのそのような核酸では、目的の産物は、目的のポリペプチドである。いくつかのそのような核酸では、目的のポリペプチドは、治療用ポリペプチドを含む。いくつかのそのような核酸では、目的のポリペプチドは、分泌ポリペプチドである。いくつかのそのような核酸では、目的のポリペプチドは、細胞内ポリペプチドである。いくつかのそのような核酸では、プロモーターは、肝臓細胞において活性である。いくつかのそのような核酸では、プロモーターは、組織特異的プロモーターである。いくつかのそのような核酸では、プロモーターは、構成的プロモーターである。いくつかのそのような核酸では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。

【００３２】

いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び（ｉｉｉ）ヒト

９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体上の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７のゲノム座標である。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７であるか、又は配列番号３９に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体上の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２のゲノム座標である。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２であるか、又は配列番号４０に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体上の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３のゲノム座標である。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３であるか、又は配列番号４１に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。

【００３３】

いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び（ｉｉｉ）ヒト４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体上の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６のゲノム座標である。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６であるか、又は配列番号４０５に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体上の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６のゲノム座標である。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６であるか、又は配列番号４０６に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体上の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２のゲノム座標である。いくつかのそのような核酸では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２であるか、又は配列番号４０７に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、若しくはそれからなる。

【００３４】

別の態様では、目的の組織又は細胞型において１つ以上のゲノムセーフハーバー遺伝子座を同定する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、（ａ）目的の組織又は細胞型においてアクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することと、（ｂ）安全基準、機能的サイレンシング基準、及び／又は構造的アクセス可能性基準に基づいて、工程（ａ）で同定したゲノム遺伝子座を選択することと、（ｃ）ガイドＲＮＡの利用可能性、有効性、及び特異性に基づいて、工程（ｂ）で同定したゲノム遺伝子座を選択することと、を含む。いくつかのそのような方法では、工程（ａ）は、ハイスループット配列決定によるトランスポザーゼアクセス可能クロマチンについてのアッセイを使用して、アクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することを含む。いくつかのそのような方法では、工程（ａ）は、ＤＮａｓｅ　Ｉ高感受性部位配列決定を使用して、アクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することを含む。いくつかのそのような方法では、工程（ａ）は、ハイスループット配列決定及びＤＮａｓｅ　Ｉ高感受性部位配列決定によるトランスポザーゼアクセス可能クロマチンについてのアッセイを使用して、アクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することを含む。いくつかのそのような方法では、工程（ｂ）は、安全基準、機能的サイレンシング基準

、及び構造的アクセス可能性基準に基づいて、工程（ａ）で同定したゲノム遺伝子座を選択することを含む。いくつかのそのような方法では、工程（ｂ）の安全基準は、ゲノム遺伝子座が任意のがん関連遺伝子から３００ｋｂ超、任意のｍｉＲＮＡ又は低分子ＲＮＡから３００ｋｂ超、かつ任意の遺伝子の５’末端から５０ｋｂ超である場合にのみ、ゲノム遺伝子座を選択することを含む。いくつかのそのような方法では、工程（ｂ）の機能的サイレンシング基準は、ゲノム遺伝子座が任意の複製起点から５０ｋｂ超、かつ任意の超保存エレメントから５０ｋｂ超である場合にのみ、ゲノム遺伝子座を選択することを含む。いくつかのそのような方法では、工程（ｂ）の構造的アクセス可能性基準は、ゲノム遺伝子座がコピー数可変領域にない場合にのみゲノム遺伝子座を選択することを含む。いくつかのそのような方法では、工程（ｃ）の有効性は、目的の組織又は細胞型における有効性を編集することを含む。いくつかのそのような方法では、方法は、工程（ｃ）で選択したゲノム遺伝子座のクロマチン環境をマーカーについて分析して、調節領域、ヘテロクロマチン領域、クロマチン三次元構成に関与する領域、又は転写活性領域であると予測される領域内にある任意のゲノム遺伝子座を不適格とすることを更に含む。いくつかのそのような方法では、調節領域のマーカーは、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、及びＨ３Ｋ４ｍｅ３を含む。いくつかのそのような方法では、ヘテロクロマチン領域のマーカーは、Ｈ３Ｋ９ｍｅ３を含む。いくつかのそのような方法では、クロマチン三次元構成に関与する領域のマーカーは、ＣＴＣＦを含む。いくつかのそのような方法では、転写活性領域のマーカーは、Ｈ３Ｋ３６ｍｅ３、ＰｏｌＲ２Ａ、ＲＮＡＳｅｑ－、及びＲＮＡＳｅｑ＋を含む。いくつかのそのような方法では、工程（ａ）は、ハイスループット配列決定及びＤＮａｓｅ　Ｉ高感受性部位配列決定によるトランスポザーゼアクセス可能クロマチンについてのアッセイを使用してアクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することを含み、工程（ｂ）は、安全基準、機能的サイレンシング基準、及び構造的アクセス可能性基準に基づいて、工程（ａ）で同定したゲノム遺伝子座を選択することを含み、工程（ｂ）の安全基準は、ゲノム遺伝子座が任意のがん関連遺伝子から３００ｋｂ超、任意のｍｉＲＮＡ又は低分子ＲＮＡから３００ｋｂ超、かつ任意の遺伝子の５’末端から５０ｋｂ超である場合にのみ、ゲノム遺伝子座を選択することを含み、工程（ｂ）の機能的サイレンシング基準は、ゲノム遺伝子座が任意の複製起点から５０ｋｂ超、かつ任意の超保存エレメントから５０ｋｂ超である場合にのみ、ゲノム遺伝子座を選択することを含み、工程（ｂ）の構造的アクセス可能性基準は、ゲノム遺伝子座がコピー数可変領域にない場合にのみゲノム遺伝子座を選択することを含み、方法は、工程（ｃ）で選択したゲノム遺伝子座のクロマチン環境をマーカーについて分析して、調節領域、ヘテロクロマチン領域、クロマチン三次元構成に関与する領域、又は転写活性領域であると予測される領域内にある任意のゲノム遺伝子座を不適格とすることを更に含み、調節領域のマーカーは、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、及びＨ３Ｋ４ｍｅ３を含み、ヘテロクロマチン領域のマーカーは、Ｈ３Ｋ９ｍｅ３を含み、クロマチン三次元構成に関与する領域のマーカーは、ＣＴＣＦを含み、転写活性領域のマーカーは、Ｈ３Ｋ３６ｍｅ３、ＰｏｌＲ２Ａ、ＲＮＡＳｅｑ－、及びＲＮＡＳｅｑ＋を含む。いくつかのそのような方法では、方法は、目的のヒト組織又は細胞型において１つ以上のゲノムセーフハーバー遺伝子座を同定するためのものである。いくつかのそのような方法では、目的の組織又は細胞型は肝臓である。いくつかのそのような方法では、目的の組織又は細胞型は造血細胞である。

【図面の簡単な説明】

【００３５】

【図１】肝臓特異的遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座を同定するために使用される系統的手法を示す。

【００３６】

【図２】３人の異なるドナーに由来する初代ヒト肝細胞におけるスクリーニング後の２０個の遺伝子座をカバーする３３個のｇＲＮＡの編集効率を示す。ＡＡＶＳ１、ＲＯＳＡ２６、及びＣＣＲ５を標的とする対照ｇＲＮＡの編集効率も示す。

【００３７】

【図３Ａ】クロマチンマークについてＣｈｉｐ　Ｓｅｑデータに基づいてクロマチン環境を分析して、調節領域（Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３）、ヘテロクロマチン領域（Ｈ３Ｋ９ｍｅ３）、又はクロマチン構成（ＣＴＣＦシグナル）に関与すると予測される領域に含まれる任意の潜在的なセーフハーバーを分析には不適格とするための、６個の潜在的な肝臓特異的遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座（それぞれ、Ｌ－ＳＨ４、Ｌ－ＳＨ１１、Ｌ－ＳＨ１７、Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０）の手動キュレーションを示す。
【図３Ｂ】クロマチンマークについてＣｈｉｐ　Ｓｅｑデータに基づいてクロマチン環境を分析して、調節領域（Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３）、ヘテロクロマチン領域（Ｈ３Ｋ９ｍｅ３）、又はクロマチン構成（ＣＴＣＦシグナル）に関与すると予測される領域に含まれる任意の潜在的なセーフハーバーを分析には不適格とするための、６個の潜在的な肝臓特異的遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座（それぞれ、Ｌ－ＳＨ４、Ｌ－ＳＨ１１、Ｌ－ＳＨ１７、Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０）の手動キュレーションを示す。
【図３Ｃ】クロマチンマークについてＣｈｉｐ　Ｓｅｑデータに基づいてクロマチン環境を分析して、調節領域（Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３）、ヘテロクロマチン領域（Ｈ３Ｋ９ｍｅ３）、又はクロマチン構成（ＣＴＣＦシグナル）に関与すると予測される領域に含まれる任意の潜在的なセーフハーバーを分析には不適格とするための、６個の潜在的な肝臓特異的遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座（それぞれ、Ｌ－ＳＨ４、Ｌ－ＳＨ１１、Ｌ－ＳＨ１７、Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０）の手動キュレーションを示す。
【図３Ｄ】クロマチンマークについてＣｈｉｐ　Ｓｅｑデータに基づいてクロマチン環境を分析して、調節領域（Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３）、ヘテロクロマチン領域（Ｈ３Ｋ９ｍｅ３）、又はクロマチン構成（ＣＴＣＦシグナル）に関与すると予測される領域に含まれる任意の潜在的なセーフハーバーを分析には不適格とするための、６個の潜在的な肝臓特異的遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座（それぞれ、Ｌ－ＳＨ４、Ｌ－ＳＨ１１、Ｌ－ＳＨ１７、Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０）の手動キュレーションを示す。
【図３Ｅ】クロマチンマークについてＣｈｉｐ　Ｓｅｑデータに基づいてクロマチン環境を分析して、調節領域（Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３）、ヘテロクロマチン領域（Ｈ３Ｋ９ｍｅ３）、又はクロマチン構成（ＣＴＣＦシグナル）に関与すると予測される領域に含まれる任意の潜在的なセーフハーバーを分析には不適格とするための、６個の潜在的な肝臓特異的遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座（それぞれ、Ｌ－ＳＨ４、Ｌ－ＳＨ１１、Ｌ－ＳＨ１７、Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０）の手動キュレーションを示す。
【図３Ｆ】クロマチンマークについてＣｈｉｐ　Ｓｅｑデータに基づいてクロマチン環境を分析して、調節領域（Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３）、ヘテロクロマチン領域（Ｈ３Ｋ９ｍｅ３）、又はクロマチン構成（ＣＴＣＦシグナル）に関与すると予測される領域に含まれる任意の潜在的なセーフハーバーを分析には不適格とするための、６個の潜在的な肝臓特異的遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座（それぞれ、Ｌ－ＳＨ４、Ｌ－ＳＨ１１、Ｌ－ＳＨ１７、Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０）の手動キュレーションを示す。
【００３８】
【図４Ａ】１００ｎｇのＣａｓ９　ｍＲＮＡ及び２５ｎＭのｓｇＲＮＡのトランスフェクションの９６時間後（図４Ａ）又は脂質ナノ粒子を介したＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡの投与（１μｇ／ｍＬの用量）の９６時間後（図４Ｂ）の９６ウェルプレート内の初代ヒト肝細胞におけるＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０ゲノム遺伝子座における編集効率を示す。編集効率を評価するために、次世代配列決定（ＮＧＳ）を使用して、挿入／欠失（インデル）を有する細胞のパーセンテージを決定した。
【図４Ｂ】１００ｎｇのＣａｓ９　ｍＲＮＡ及び２５ｎＭのｓｇＲＮＡのトランスフェク

ションの９６時間後（図４Ａ）又は脂質ナノ粒子を介したＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡの投与（１μｇ／ｍＬの用量）の９６時間後（図４Ｂ）の９６ウェルプレート内の初代ヒト肝細胞におけるＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０ゲノム遺伝子座における編集効率を示す。編集効率を評価するために、次世代配列決定（ＮＧＳ）を使用して、挿入／欠失（インデル）を有する細胞のパーセンテージを決定した。

【００３９】

【図５】Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡのＬＮＰ媒介送達並びにＣＭＶプロモーターによって駆動されるホタルルシフェラーゼ（ＦＬｕｃ）コード配列を含むＡＡＶ－ＤＪの共送達後のＨｅｐＧ２細胞におけるＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０ゲノム遺伝子座における編集効率を示す。編集効率を評価するために、ＮＧＳを使用して、挿入／欠失（インデル）を有する細胞のパーセンテージを決定した。

【００４０】

【図６】Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡ（Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、又はＬ－ＳＨ２０を標的とする）のＬＮＰ媒介送達並びにＣＭＶプロモーターによって駆動されるＦＬｕｃコード配列を保有するＡＡＶ－ＤＪの送達後のＨｅｐＧ２細胞におけるＦＬｕｃシグナルを示す。陰性対照は、未処理サンプル、ＡＡＶ－ＤＪのみのサンプル（組み込みなし）、及びｓｇＲＮＡが非標的化ｓｇＲＮＡであるサンプル（組み込みなし）を含んだ。２３継代後、エピソームＡＡＶ－ＤＪ　ＦＬｕｃは希釈され、セーフハーバーに組み込まれたＡＡＶ－ＤＪのみが維持される。

【００４１】

【図７】ＣＭＶプロモーターによって駆動されるＦＬｕｃコード配列を保有するＡＡＶ－ＤＪ、並びにＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡを含む１μｇ／ｍＬのＬＮＰの送達後の初代ヒト肝細胞におけるＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０ゲノム遺伝子座における編集効率を示す。編集効率を評価するために、ＮＧＳを使用して、挿入／欠失（インデル）を有する細胞のパーセンテージを決定した。

【００４２】

【図８】Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡ（Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、又はＬ－ＳＨ２０を標的とする）を含む１μｇ／ｍＬのＬＮＰ、並びに10^3、10^4、又は10^5の感染多重度（ＭＯＩ）でＣＭＶプロモーターによって駆動されるＦＬｕｃコード配列を保有するＡＡＶ－ＤＪの送達後の初代ヒト肝細胞におけるＦＬｕｃシグナルを示す。ｓｇＲＮＡが非標的化ｓｇＲＮＡであるサンプルを対照として使用した。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＦＬｕｃ核酸構築物の送達の７２時間後にＦＬｕｃシグナルを評価した。

【００４３】

【図９】ヒト化肝臓マウスモデルにおけるＣＭＶ－ＦＬｕｃドナーのＣＲＩＳ　ＰＲ／Ｃａｓ９媒介性挿入のためにＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０を標的とするｓｇＲＮＡを試験するための概略図を示す。

【００４４】

【図１０】ＡＡＶ－ＤＪベクターを用いてヒト初代肝細胞に挿入される、ＣＭＶプロモーターによって駆動される導入遺伝子（ＦＬｕｃ）を示す。

【００４５】

【図１１】ヒト化肝臓マウスモデルにおいて潜在的なセーフハーバー遺伝子座を標的とする安全性プロファイルを検査するための概略図を示す。

【００４６】

【図１２】初代ヒト肝細胞の生着２５週後の免疫不全ＦＲＧマウスから血清中ＥＬＩＳＡによって検出されたヒトアルブミン（ｈＡＬｂ）のレベルを示す。

【００４７】

【図１３】ヒト化肝臓マウスモデルにおけるＦＬｕｃの長期発現を示す。初代ヒト肝細胞の生着１２ヶ月後のＦＲＧマウスにおけるＦＬｕｃ発現についてアッセイするために、ＩＶＩＳイメージングを行った。潜在的なセーフハーバー遺伝子座Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０へのＦＬｕｃ導入遺伝子の挿入のための核酸構築物を、ＡＡＶ－Ｄ

Ｊベクターを用いて初代ヒト肝細胞に送達した。画像はＩＶＩＳ分析から再構成した。
【００４８】
【図１４Ａ】ヒト化肝臓マウスモデルにおけるセーフハーバー遺伝子座Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０の標的化における安全性を示す。初代ヒト肝細胞の生着後の免疫不全ＦＲＧマウスの血清において、肝酵素の明白な調節不全は観察されなかった。肝臓マーカーＡＬＴ（図１４Ａ）、ＡＳＴ（図１４Ｂ）、及びＡＬＰ（図１４Ｃ）は、処置群間で一致していた。ビリルビンレベル（図１４Ｄ）は、処置群において減少していた。体重は、処置群間で一貫したままであった（図１４Ｅ）。
【図１４Ｂ】ヒト化肝臓マウスモデルにおけるセーフハーバー遺伝子座Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０の標的化における安全性を示す。初代ヒト肝細胞の生着後の免疫不全ＦＲＧマウスの血清において、肝酵素の明白な調節不全は観察されなかった。肝臓マーカーＡＬＴ（図１４Ａ）、ＡＳＴ（図１４Ｂ）、及びＡＬＰ（図１４Ｃ）は、処置群間で一致していた。ビリルビンレベル（図１４Ｄ）は、処置群において減少していた。体重は、処置群間で一貫したままであった（図１４Ｅ）。
【図１４Ｃ】ヒト化肝臓マウスモデルにおけるセーフハーバー遺伝子座Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０の標的化における安全性を示す。初代ヒト肝細胞の生着後の免疫不全ＦＲＧマウスの血清において、肝酵素の明白な調節不全は観察されなかった。肝臓マーカーＡＬＴ（図１４Ａ）、ＡＳＴ（図１４Ｂ）、及びＡＬＰ（図１４Ｃ）は、処置群間で一致していた。ビリルビンレベル（図１４Ｄ）は、処置群において減少していた。体重は、処置群間で一貫したままであった（図１４Ｅ）。
【図１４Ｄ】ヒト化肝臓マウスモデルにおけるセーフハーバー遺伝子座Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０の標的化における安全性を示す。初代ヒト肝細胞の生着後の免疫不全ＦＲＧマウスの血清において、肝酵素の明白な調節不全は観察されなかった。肝臓マーカーＡＬＴ（図１４Ａ）、ＡＳＴ（図１４Ｂ）、及びＡＬＰ（図１４Ｃ）は、処置群間で一致していた。ビリルビンレベル（図１４Ｄ）は、処置群において減少していた。体重は、処置群間で一貫したままであった（図１４Ｅ）。
【図１４Ｅ】ヒト化肝臓マウスモデルにおけるセーフハーバー遺伝子座Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０の標的化における安全性を示す。初代ヒト肝細胞の生着後の免疫不全ＦＲＧマウスの血清において、肝酵素の明白な調節不全は観察されなかった。肝臓マーカーＡＬＴ（図１４Ａ）、ＡＳＴ（図１４Ｂ）、及びＡＬＰ（図１４Ｃ）は、処置群間で一致していた。ビリルビンレベル（図１４Ｄ）は、処置群において減少していた。体重は、処置群間で一貫したままであった（図１４Ｅ）。
【００４９】
【図１５】Ｈ＆Ｅ、ヒトＦＡＨ、ヒトＡＳＧＲ１、及びＫｉ６７について染色されたヒト化肝臓マウスの肝臓組織を示す。肝臓における増殖のマーカーであるＨ＆Ｅ又はＫｉ６７では有意な染色は観察されず、腫瘍形成又は活性な発癌性形質転換がないことが示唆された。ヒトＦＡＨ及びヒトＡＳＧＲ１についての染色は、マウス肝臓の高度のヒト化を示す。
【００５０】
【図１６】ヒトセーフハーバー遺伝子座Ｌ－ＳＨ５を含有するヒト染色体領域（矢印によって示す）と、同じアライメント順序を有する対応するマウス染色体のブロックとの間のアライメントブロックを示す。
【００５１】
【図１７】ヒトセーフハーバー遺伝子座Ｌ－ＳＨ１８を含有するヒト染色体領域（矢印によって示す）と、同じアライメント順序を有する対応するマウス染色体のブロックとの間のアライメントブロックを示す。
【００５２】
【図１８】ヒトセーフハーバー遺伝子座Ｌ－ＳＨ２０を含有するヒト染色体領域（矢印によって示す）と、同じアライメント順序を有する対応するマウス染色体のブロックとの間のアライメントブロックを示す。

【発明を実施するための形態】
【００５３】
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」、及び「ペプチド」という用語は、コードされたアミノ酸及び非コードのアミノ酸並びに化学的又は生化学的に修飾又は誘導体化されたアミノ酸を含む、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、特定の機能又は構造を有するタンパク質又はポリペプチドの任意の部分を指す。
【００５４】
タンパク質は、「Ｎ末端」及び「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）を有するアミノ酸を末端に有する、タンパク質又はポリペプチドの開始に関する。「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（タンパク質又はポリペプチド）の最後に関する。
【００５５】
本明細書で互換的に使用される、「核酸」及び「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、又はそれらの類似体若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、及び多重鎖ＤＮＡ又はＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、並びにプリン塩基、ピリミジン塩基、又は他の天然、化学的に修飾された、生化学的に修飾された、非天然、若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。
【００５６】
１つのモノヌクレオチドペントース環の５’リン酸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」及び「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」と称される。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’リン酸に連結されていない場合、「３’末端」と称される。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’及び３’末端を有するとも言われ得る。直線状又は環状ＤＮＡ分子のいずれかにおいて、別個の要素は、「上流」又は「下流」の５’若しくは３’要素であると称される。
【００５７】
「ゲノムに組み込まれた」という用語は、ヌクレオチド配列が細胞のゲノムに組み込まれるように、細胞のゲノムに導入されている核酸を指す。細胞のゲノムへの核酸の安定した組み込みのために、任意のプロトコルが使用され得る。
【００５８】
「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも１つの要素を含み、かつウイルスベクター粒子へのパッケージングに十分な、又はそれを許容する要素を含む、組換え核酸を指す。ベクター及び／又は粒子は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又は他の核酸を、インビトロ、エクスビボ、又はインビボで細胞に移入する目的で利用することができる。ウイルスベクターの多くの形態が既知である。
【００５９】
細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク質、及び核酸に関して「単離された」という用語は、細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク質、及び核酸の実質的に純粋な調製物までを含み、通常インサイチュで存在し得る他の細菌、ウイルス、細胞、又は他の成分に関して比較的精製されている細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク質、及び核酸を含む。「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せず、化学的に合成され、それにより他の細胞、組織（例えば、肝臓サンプル）、タンパク

質、及び核酸が実質的に混入していない、又はそれらに天然に付随する（例えば、他の細胞タンパク質、ポリヌクレオチド、若しくは他の成分）ほとんどの他の成分（例えば、細胞成分）から分離若しくは精製されている細胞、組織、タンパク質及び核酸も含む。

【００６０】

「野生型」という用語は、（突然変異体、病変した、改変したなどとは対照的に）正常な状態又は文脈に見出されるような構造及び／又は活性を有する実体を含む。野生型遺伝子及びポリペプチドは、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。

【００６１】

「内因性配列」という用語は、細胞又は動物内で天然に存在する核酸配列を指す。例えば、ヒトの内因性Ｒｏｓａ２６配列は、ヒトのＲｏｓａ２６遺伝子座で天然に存在する天然のＲｏｓａ２６配列を指す。

【００６２】

「外因性」分子又は配列には、その形態で細胞に通常は存在しない分子又は配列が含まれる。通常の存在には、細胞の特定の発生段階及び環境条件に関する存在が含まれる。外因性分子又は配列には、例えば、内因性配列のヒト化バージョンなどの、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、又は細胞内であるが、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、内因性分子又は配列は、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又は配列を含む。

【００６３】

核酸又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、核酸又はタンパク質が、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、核酸のセグメント又はタンパク質のセグメントに関して使用される場合の「異種」という用語は、核酸又はタンパク質が、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、又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、又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、又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、核酸又はタンパク質は、異種標識又は異種分泌又は局在化配列を含み得る。

【００６４】

「コドン最適化」（すなわち、「コドン最適化された」配列）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又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、目的のポリペプチド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、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、又は他の任意の宿主細胞を含む、所与の原核細胞又は真核細胞においてより高い頻度で使用される代替コドンへと修飾され得る。コドン使用表は、例えば、「コドン使用データベース」において容易に利用可能である。これらの表は、様々な方法で適用され得る。Ｎａｋａｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２８（１）：２９２を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。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を参照されたい）もまた利用可能である。

【００６５】

「遺伝子座」という用語は、遺伝子（又は有意な配列）、ＤＮＡ配列、ポリペプチドコード配列、又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、「Ｒｏｓａ２６遺伝子座」は、Ｒｏｓａ２６遺伝子の特定の位置、Ｒｏｓａ２６ＤＮＡ配列、又はそのような配列が存在するとして同定された生物のゲノムの染色体上Ｒｏｓａ２６位置を指し得る。「Ｒｏｓａ２６遺伝子座」は、例えば、エンハンサー、プロモーター、５’及び／又は３’非翻訳領域（ＵＴＲ）、又はそれらの組み合わせを含む、Ｒｏｓａ２６遺伝子の調節エレメントを含み得る。

【００６６】

「遺伝子」という用語は、自然に存在する場合、少なくとも１つのコード領域及び少なくとも１つの非コード領域を含有する可能性のある染色体中のＤＮＡ配列を指す。遺伝子が完全長のＲＮＡ（５’及び３’の非翻訳配列を含む）に対応するように、産物（例えば、非限定的に、ＲＮＡ産物及び／又はポリペプチド産物）をコードする染色体中のＤＮＡ配列は、非コードイントロンで中断されたコード領域並びに５’端及び３’端の両方のコード領域に隣接して位置する配列を含み得る。更に、調節配列を含む他の非コード配列（例えば、非限定的に、プロモーター、エンハンサー、及び転写因子結合部位）、ポリアデニル化シグナル、配列内リボソーム進入部位、サイレンサー、絶縁配列、及びマトリックス結合領域も遺伝子に存在してもよい。これらの配列は、遺伝子のコード領域に近接（例えば、非限定的に、１０ｋｂ以内）している、又は離れた部位にあってもよく、それらは遺伝子の転写及び翻訳のレベル又は速度に影響を及ぼす。

【００６７】

「対立遺伝子」という用語は、遺伝子の変異体形態を指す。いくつかの遺伝子は、染色体上の同じ位置、又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、２つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合と記載される。

【００６８】

「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追加的に含み得る。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細胞型（例えば、ヒト細胞、ヒト肝臓細胞、又はヒト肝臓肝細胞）のうちの１つ以上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）、又は空間的に制限されたプロモーター（例えば、細胞特異的又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、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１３／１７６７７２号において見出すことができる。

【００６９】

「作動可能な連結」又は「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、かつ成分のうちの少なくとも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、プロモーター及び別の配列要素）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又は不在に応じてコード配列の転写のレベルを制御する場合、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、そのような配列が互いに近接していること、又はトランスに作用する（例えば、調節配列が、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。

【００７０】

本明細書で提供される方法及び組成物は、様々な異なる成分を用いる。記載全体のいくつかの成分は、活性な変異体及び断片を有し得る。「機能的」という用語は、生物学的活

性又は機能を示すタンパク質又は核酸（又はその断片、若しくは変異体）の生来の能力を指す。機能的断片又は変異体の生物学的機能は、元の分子と比較して同じである、又は実際に変更され得る（例えば、それらの特異性又は選択性又は有効性に関して）が、分子の基本的な生物学的機能を保持する。

【００７１】

「変異体」という用語は、集団で最も一般的な配列とは（例えば、１ヌクレオチドだけ）異なるヌクレオチド配列、又は集団で最も一般的な配列とは（例えば、１アミノ酸だけ）異なるタンパク質配列を指す。

【００７２】

「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、又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、完全長核酸よりも短い、又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、タンパク質断片に言及する場合、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）、又は内部断片（すなわち、タンパク質のＮ末端及びＣ末端の各々の一部の除去）であり得る。断片は、例えば、核酸断片に言及する場合、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）、又は内部断片（すなわち、核酸の５’末端及び３’末端の各々の一部の除去）であり得る。

【００７３】

２つのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」又は「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、電荷又は疎水性）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、分子の機能的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、上方に調整され得る。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」又は「類似性」を有すると言われている。この調整を行うための手段は周知である。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、カリフォルニア州マウンテンビュー）で実行されるように計算される。

【００７４】

「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、付加又は欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。パーセンテージは、同一の核酸塩基又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マッチする位置の数を得ること、マッチする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、及び結果に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。特に明記しない限り（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全長である。

【００７５】

特に明記しない限り、配列同一性／類似性値は、以下のパラメータ、すなわち、５０のＧＡＰ重み及び３の長さ重み、並びに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％同一性及び％類似性；８のＧＡＰ重み及び２の長さ重み、並びに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

一性及び％類似性；又はその任意の同等のプログラムを使用するＧＡＰバージョン１０を使用して得られる値を含む。「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又はアミノ酸残基のマッチ及び同一の配列同一性パーセント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。

【００７６】

「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、又は極性の、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、又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、アルギニンとリジンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間、又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。追加的に、リジン、アルギニン、若しくはヒスチジンなどの塩基性残基の別のものへの置換、又はアスパラギン酸若しくはグルタミン酸などのある酸性残基の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、若しくはメチオニンの極性（親水性）残基、例えば、システイン、グルタミン、グルタミン酸、若しくはリジンへの置換、及び／又は極性残基の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を以下で要約する。

【００７７】

【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
リジン	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
トレオニン	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

【００７８】

「相同」配列（例えば、核酸配列）には、例えば、既知の参照配列に対して少なくとも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％、若しくは１００％同一であるような、既知の参照配列に対して同一、又は実質的に同様である配列が含まれる。相同配列は、例えば、オルソログ配列及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）又は遺伝子重複事象（パラロガス遺伝子）のいずれかを介して、共通の祖先ＤＮＡ配列から派生する。「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における遺伝子が含まれる。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得る。

【００７９】

「インビトロ」という用語は、人工環境、及び人工環境（例えば、試験管又は単離された細胞若しくは細胞株）内で生じるプロセス又は反応を含む。「インビボ」という用語は、天然環境（例えば、細胞又は生物又は身体）、及び天然環境内で生じるプロセス又は反応を含む。「エクスビボ」という用語は、個体の身体から除去される細胞、及びそのような細胞内で生じるプロセス又は反応を含む。

【００８０】

１つ以上の列挙された要素を「含む（comprising）」又は「含む（including）」組成物又は方法は、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）」又は「含む（includes）」組成物は、タンパク質を単独で、又は他の成分と組み合わせて含有し得る。「から本質的になる」という移行句は、特許請求の範囲の範囲が、特許請求の範囲に列挙された特定の要素、及び特許請求される発明の基本的かつ新規の特性に実質的に影響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、本発明の特許請求の範囲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。

【００８１】

「任意選択的な」又は「任意選択的に」は、それに続いて記載された事象又は状況が起こっても起こらなくてもよいことであり、説明が、事象又は状況が起こる場合の例及びそれが起こらない場合の例を含むことを意味する。

【００８２】

値の範囲の指定は、その範囲内の、又はその範囲を定義する全ての整数、及びその範囲内の整数によって定義される全ての部分範囲を含む。例えば、５～１０個のヌクレオチドは、５、６、７、８、９、又は１０個のヌクレオチドとして理解され、一方、５～１０％は、５％及び１０％までの全ての可能な値を含むと理解される。

【００８３】

２０個のヌクレオチド配列のうちの少なくとも１７個のヌクレオチドは、提供される配列の１７、１８、１９、又は２０個のヌクレオチドを含むと理解され、それによって、明確に理解されるように、１つが具体的に提供されない場合であっても上限を提供する。同様に、最大３ヌクレオチドは、０、１、２、又は３ヌクレオチドを包含すると理解され、１つが具体的に提供されない場合であっても下限を提供する。「少なくとも」、「最大」、又は他の同様の言語が数を修飾する場合、それは、一連の各数を修飾すると理解することができる。

【００８４】

本明細書で使用される場合、「以下」又は「未満」は、句に隣接する値、及び文脈から論理的に０までの論理的なより低い値又は整数として理解される。例えば、「２以下のヌクレオチド塩基対」の二重鎖領域は、２、１、又は０ヌクレオチド塩基対を有する。一連の数又は範囲の前に「以下」又は「未満」が存在する場合、その一連又は範囲内の数の各々が修飾されていることが理解される。

【００８５】

本明細書で使用される場合、値の最大量が１００％（例えば、１００％阻害）で表される場合、その値は検出方法によって制限されることが理解される。例えば、１００％阻害は、アッセイの検出レベル未満のレベルに対する阻害として理解される。

【００８６】

文脈から特に明らかでない限り、「約」という用語は、記載された値の±５％である値を包含する。特定の実施形態では、「約」という用語は、当該技術分野内で許容される変動若しくは誤差、例えば、平均からの２標準偏差、又は測定を行うために使用される方法の感度、又は当該技術分野において許容される値のパーセント、例えば、年齢を伴うものを包含すると理解される。一連の最初の値の前に「約」が存在する場合、一連の各値を修飾すると理解することができる。

【００８７】
「及び／又は」という用語は、関連するリストされる項目のうちの１つ以上の任意及び全ての可能な組み合わせ、並びに代替物（「又は」）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。
【００８８】
「又は」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。
【００８９】
冠詞「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」の単数形は、文脈が特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」又は「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み得る。
【００９０】
統計的に有意なとは、ｐ≦０．０５を意味する。
【００９１】
本出願中の配列と、示されたアクセッション番号又はアクセッション番号中の位置との間に矛盾がある場合、本出願中の配列が優勢である。
【００９２】
Ｉ．概要
現在の遺伝子治療法は、導入遺伝子のエピソーム発現及び／又は特定のゲノム遺伝子座への挿入に依存する。エピソーム法は、希釈又はサイレンシングのために肝臓に限定されることが判明している。特定の遺伝子座における組み込みは、導入遺伝子の持続的発現を可能にする。しかしながら、この手法がヒト設定において有効かつ安全であることは依然として判明していない。ＡＡＶＳ１、ＣＣＲ５、及びＲｏｓａ２６などヒトにおけるカノニカルゲノムセーフハーバー遺伝子座は、全て遺伝子内にあり、マウスゲノムセーフハーバー遺伝子座ほど研究が進んでいない。加えて、組織が異なると、定められた遺伝子座について異なるクロマチン状態を有するので、カノニカルゲノムセーフハーバーは、一部の組織においてサイレンシングされ得る。ヒトにおけるカノニカルゲノムセーフハーバー遺伝子座の全ては、更なる欠点を有する。メチル化機構は、いくつかの細胞系統においてＡＡＶＳ１遺伝子座における導入遺伝子をサイレンシングすることができ、ＣＣＲ５のノックアウトは、西ナイルウイルス及び日本脳炎による感染に対する感受性の増加をもたらすことができ、ヒトＲｏｓａ２６遺伝子座は、マウスオルソログほど研究が進んでいない。したがって、組織特異的ゲノムセーフハーバー遺伝子座が必要とされている。
【００９３】
目的の産物をコードする核酸を、細胞、細胞の集団、若しくは対象（例えば、それを必要とする対象）におけるゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入するため、又は目的の産物をコードする核酸を、細胞、細胞の集団、若しくは対象（例えば、それを必要とする対象）におけるゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現させるための組成物及び方法が提供される。ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入された目的の産物のコード配列を含む核酸構築物を含む細胞若しくは細胞の集団、又は対象も提供される。特定の細胞又は組織型において使用するためのゲノムセーフハーバー遺伝子座（例えば、遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座）を同定する方法も本明細書において提供される。
【００９４】
ＩＩ．核酸構築物をゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入するための、並びに細胞及び対象におけるゲノムセーフハーバー遺伝子座から目的の産物を発現させるための組成物
ゲノムセーフハーバー遺伝子座への目的の産物のコード配列の挿入、及び／又はゲノムセーフハーバー遺伝子座からの目的の産物のコード配列の発現を可能にする核酸構築物及び組成物が本明細書において提供される。核酸構築物及び組成物は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座への組み込み及び／又は細胞若しくは対象におけるゲノムセーフハーバー遺伝子座からの発現のための方法おいて使用され得る。ヌクレアーゼ剤（例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とする）又はヌクレアーゼ剤をコードする核酸も提供されて、

ゲノムセーフハーバー遺伝子座への核酸構築物の組み込みを容易にする。ゲノムセーフハーバー遺伝子座又はヌクレアーゼ剤をコードする核酸の近傍又は内部を標的とするヌクレアーゼ剤も提供されて、ゲノムセーフハーバー遺伝子座への核酸構築物の組み込みを容易にする。

【００９５】

Ａ．ゲノムセーフハーバー遺伝子座を同定するゲノムセーフハーバー遺伝子座法

組み込まれた外因性ＤＮＡと宿主ゲノムとの間の相互作用は、組み込みの信頼性及び安全性を制限する可能性があり、標的化遺伝子修飾によるものではなく、代わりに周囲の内因性遺伝子に対する組み込みの意図しない影響による明白な表現型効果をもたらす可能性がある。例えば、ランダムに挿入された導入遺伝子は、位置効果及びサイレンシングの影響を受けやすく、その発現が信頼できず、予測できないものになる可能性がある。同様に、外因性ＤＮＡの染色体遺伝子座への組み込みは、周囲の内因性遺伝子及びクロマチンに影響を及ぼし、それによって細胞の挙動及び表現型を変化させる可能性がある。

【００９６】

本明細書で使用される標的ゲノム遺伝子座は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座であり得る。ゲノムセーフハーバー遺伝子座には、導入遺伝子又は他の外因性核酸インサートが、細胞の挙動又は表現型を明白に変えることなく（すなわち、宿主細胞に有害な影響を与えることなく）、目的の組織で安定かつ確実に発現できる染色体遺伝子座が含まれる。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、挿入された遺伝子配列の発現が、隣接する遺伝子からのリードスルー発現によって乱されない遺伝子座であり得る。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、内因性遺伝子の構造又は発現に悪影響を及ぼすことなく、外因性ＤＮＡが予測可能な方法で組み込まれて機能できる染色体遺伝子座を含み得る。ゲノムセーフハーバー遺伝子座を高効率で標的化することができ、セーフハーバー遺伝子座を明白な表現型を伴わずに破壊することができる。ゲノムセーフハーバー遺伝子座には、遺伝子外領域又は遺伝子内領域、例えば、必須ではない、不要な、又は明白な表現型の結果なしに破壊できる遺伝子内の遺伝子座を含めることができる。

【００９７】

本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、肝臓機能を変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、アラニンアミノトランスフェラーゼ（アラニントランスアミナーゼ又はＡＬＴ）レベルを変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）レベルを変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、アルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）レベルを変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、体重を変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、肝臓など標的臓器などにおいて（例えば、Ｋｉ６７染色によって評価される）増殖を変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、肝臓など標的器官などにおいて（例えば、Ｈ＆Ｅ染色によって評価されるように）発癌性形質転換を引き起こさないゲノム遺伝子座であり得る。

【００９８】

本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、外因性核酸インサートが肝臓において安定かつ確実に発現し得るように、肝臓においてオープンクロマチン構成を有するゲノム遺伝子座であり得る。あるいは、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、外因性核酸インサートが当該組織又は細胞型において安定かつ確実に発現し得るように、別の組織又は細胞型（例えば、造血幹細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、及び／又はマクロファージなどの造血細胞

）においてオープンクロマチン構成を有するゲノム遺伝子座であり得る。
【００９９】
本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座（すなわち、遺伝子の外側に存在する）であり得る。具体的な例では、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、肝臓においてオープンクロマチン構成を有する遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座である。
【０１００】
具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、任意のがん関連遺伝子から３００ｋｂ超（例えば、挿入発癌を防止するため）、任意のｍｉＲＮＡ又は低分子ＲＮＡから３００ｋｂ超（例えば、遺伝子発現及び細胞発生の調節を保存するため）、任意の遺伝子の５’末端から５０ｋｂ超（例えば、内因性遺伝子発現の撹乱を回避するため）、任意の複製起点から５０ｋｂ超、任意の超保存エレメント（例えば、ヒト、マウス、及びラットゲノムにおいて完全に保存されている非コード遺伝子内又は遺伝子間領域）から５０ｋｂ超、コピー数可変領域の外側、及びオープンクロマチン（例えば、ＡＴＡＣ－Ｓｅｑ分析によって決定される（例えば、ヒト肝臓生検サンプルにおいて））であるものであり得る。加えて、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、調節領域（例えば、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、及び／又はＨ３Ｋ４ｍｅ３マーカー）、ヘテロクロマチン領域（例えば、Ｈ３Ｋ９ｍｅ３マーカー）、又はクロマチン構成（例えば、ＣＴＣＦシグナル）に関与すると予測される領域と重複しないものであり得る。
【０１０１】
例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座（例えば、遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座）を同定する方法は、（ａ）目的の組織又は細胞型においてアクセス可能なゲノム遺伝子座（すなわち、クロマチン部位）をと（例えば、ＡＴＡＣ－Ｓｅｑデータセットに依存して）同定することと、（ｂ）安全基準、機能的サイレンシング基準、及び／又は構造的アクセス可能性基準に基づいて、工程（ａ）で同定したゲノム遺伝子座を除外することと、（ｃ）ｇＲＮＡの利用可能性、有効性（編集効率）、及び特異性（オフターゲット分析）に基づいて、工程（ｂ）で同定した遺伝子座を除外することと、を含み得る。そのような方法は、クロマチンマークについてクロマチン環境を分析して、調節領域（例えば、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、及び／若しくはＨ３Ｋ４ｍｅ３）、ヘテロクロマチン領域（例えば、Ｈ３Ｋ９ｍｅ３）、又はクロマチン三次元構成（例えば、ＣＴＣＦシグナル）に関与すると予測される領域に含まれる任意の潜在的なセーフハーバーを分析には不適格とすることを更に含み得る。
【０１０２】
真核生物クロマチンは、ヌクレオソームのアレイにしっかりとパッケージングされており、各ヌクレオソームは、ＤＮＡに巻き付き、リンカーＤＮＡによって分離されたヒストン八量体コアからなる。ヌクレオソームコアは、共有結合修飾によって翻訳後修飾され得るか、又はヒストンバリアントによって置換され得るヒストンタンパク質からなる。ゲノム全体にわたるヌクレオソームの配置は、転写因子及び基転写機構への結合部位のインビボ利用可能性を改変し、したがって転写、ＤＮＡ修復、複製、及び組換えなどのＤＮＡ依存プロセスに影響を及ぼすことによって、重要な調節機能を有する。アクセス可能なゲノム遺伝子座は、オープンクロマチンの領域である。オープンクロマチン領域は、タンパク質因子によって結合され得、ＤＮＡ複製、核構成、及び遺伝子転写において様々な役割を果たし得るヌクレオソーム枯渇領域である。工程（ａ）は、例えば、ＡＴＡＣ－Ｓｅｑ分析などトランスポザーゼアクセス可能クロマチンについてのアッセイを使用してアクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することを含み得る。ＡＴＡＣ－Ｓｅｑは、ハイスループット配列決定によるトランスポザーゼアクセス可能クロマチンについてのアッセイを表す。例えば、Ｂｕｅｎｒｏｓｔｒｏ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ１０（１２）：１２１３－１２１８及びＢｕｅｎｒｏｓｔｒｏ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１０９：２１．２９．１－２１．２９．９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組

み込まれる。ＡＴＡＣ－Ｓｅｑ法は、高活性トランスポザーゼＴｎ５を使用した次世代配列決定（ＮＧＳ）ライブラリー構築に依存する。ＮＧＳアダプターはトランスポザーゼ上にロードされ、これにより、クロマチンの断片化と、オープンクロマチン領域へのこれらのアダプターの組み込みとが同時に可能になる。生成されるライブラリーは、ＮＧＳによって配列決定され得、オープンクロマチン又はアクセス可能なクロマチンを有するゲノムの領域は、バイオインフォマティクスを使用して分析される。第１の工程として、細胞を採取する。採取後、細胞を非イオン性界面活性剤で溶解して純粋な核を得る。次いで、得られたクロマチンを断片化し、同時に、Ｔｎ５トランスポザーゼを用いて配列決定アダプターでタグメント化して、ＡＴＡＣ－Ｓｅｑライブラリーを生成する。精製後、バーコード化したプライマーを使用してＰＣＲによってライブラリーを増幅することができる。次いで、得られたライブラリーをｑＰＣＲ又は次世代配列決定によって分析することができる。ＡＴＡＣ－ｓｅｑは、ゲノムのオープン領域に配列決定アダプターを挿入する高活性変異体Ｔｎ５トランスポザーゼを用いてオープンクロマチンをプロービングすることによって、アクセス可能なＡＴＡＣ領域を同定する。天然に存在するトランスポザーゼは低レベルの活性を有するが、ＡＴＡＣ－ｓｅｑは、突然変異した高活性トランスポザーゼを用いる。タグメンテーションと呼ばれるプロセスにおいて、Ｔｎ５トランスポザーゼは、二本鎖ＤＮＡを切断し、配列決定アダプターでタグ付けする。次いで、タグ付けされたＤＮＡ断片を精製し、ＰＣＲ増幅し、次世代配列決定を使用して配列を決定する。次いで、配列決定リードを使用して、アクセス可能性が増加した領域を推測し、また、転写因子結合部位及びヌクレオソーム位置の領域をマッピングすることができる。領域のリードの数は、単一ヌクレオチド分解能において、クロマチンがどの程度オープンであるかに相関する。

【０１０３】

工程（ａ）はまた、例えば、ＤＮａｓｅ　Ｉ高感受性部位配列決定（ＤＮａｓｅ－Ｓｅｑ）を使用してアクセス可能なゲノム遺伝子座を同定することを含み得る。ＤＮａｓｅ－ｓｅｑは、ＤＮａｓｅ　Ｉによる切断に対する感受性を有する領域のゲノムワイドな配列決定に基づいて調節領域の位置を同定するために使用される方法である。この方法は、ヌクレオソーム枯渇ＤＮＡを選択的に消化するためにＤＮａｓｅ　Ｉを利用するが、ヌクレオソーム及びより高次の構造でしっかり包囲されたＤＮＡ領域はより強い耐性を有する。ハイスループット法は、ＤＮａｓｅ消化断片を捕捉し、ハイスループット次世代配列決定によってそれらを配列決定することによって、全ゲノムにわたってＤＮａｓｅ　Ｉ高感受性部位を同定する。

【０１０４】

工程（ｂ）において、安全基準は、ゲノム遺伝子座が、任意のがん関連遺伝子から３００ｋｂ超（例えば、挿入発癌を防止するため）、任意のｍｉＲＮＡ若しくは低分子ＲＮＡから３００ｋｂ超（例えば、遺伝子発現及び細胞発生の調節を保存するため）、かつ／又は任意の遺伝子の５’末端から５０ｋｂ超（例えば、内因性遺伝子発現の撹乱を回避するため）である場合にのみ、ゲノム遺伝子座を選択することを含み得る。機能的サイレンシング基準は、ゲノム遺伝子座が、任意の複製起点から５０ｋｂ超、かつ／又は任意の超保存エレメント（例えば、ヒト、マウス、及びラットゲノムにおいて完全に保存されている非コード遺伝子内又は遺伝子間領域）から５０ｋｂ超である場合にのみ、ゲノム遺伝子座を選択することを含み得る。構造的アクセス可能性基準は、ゲノム遺伝子座がコピー数可変領域にない場合にのみゲノム遺伝子座を選択することを含み得る。

【０１０５】

工程（ｃ）では、ｇＲＮＡ利用可能性、有効性（編集効率）、及び特異性（オフターゲット分析）に基づいて、遺伝子座をフィルタリングすることができる。ｇＲＮＡ利用可能性は、ＰＡＭ要件を考慮して、ガイドＲＮＡに適した標的配列が存在することを意味する。有効性は、目的の組織又は細胞型におけるｇＲＮＡの編集効率を意味する。編集効率の任意の適切な閾値を設定することができる。例えば、遺伝子座又はｇＲＮＡは、編集効率が少なくとも約１０％、少なくとも約１１％、少なくとも約１２％、少なくとも約１３％

、少なくとも約１４％、少なくとも約１５％、少なくとも約１６％、少なくとも約１７％、少なくとも約１８％、少なくとも約１９％、又は少なくとも約２０％である場合に選択され得る。一例では、ｇＲＮＡ有効性は、初代細胞（例えば、初代肝細胞）において測定される。別の例では、ｇＲＮＡ有効性は、インビボで目的の組織において測定される。具体的な例では、ｇＲＮＡ有効性は、複数人の異なるドナー由来の初代細胞（例えば、２人又は３人の異なるドナーなど複数人の異なるドナー由来の初代肝細胞）において測定される。ｇＲＮＡ特異性に関する任意の適切な閾値を使用することができる。例えば、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列と完全にマッチするか、又は１つのミスマッチのみを有する他の配列がゲノム中に存在しない場合に選択され得る。別の例では、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡ標的配列と完全にマッチするか、又は１つ若しくは２つのミスマッチのみを有する他の配列がゲノム中に存在しない場合に選択され得る。

【０１０６】

そのような方法は、マーカー（例えば、シグナル又はクロマチンマーク）についてクロマチン環境を分析して、調節領域（例えば、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、及び／若しくはＨ３Ｋ４ｍｅ３）、ヘテロクロマチン領域（例えば、Ｈ３Ｋ９ｍｅ３）、クロマチン構成（例えば、ＣＴＣＦシグナル）に関与する、又は転写活性を有する領域（例えば、Ｈ３Ｋ３６ｍｅ３、ＰｏｌＲ２Ａ、ＲＮＡＳｅｑ－、及びＲＮＡＳｅｑ＋）であると予測される領域に含まれる任意の潜在的なセーフハーバーを分析には不適格とみなすことを含み得る。例えば、転写因子結合、ゲノムワイドＤＮＡメチル化、ヒストンマークによって推測されるプロモーター／エンハンサーシグネチャー、及びクロマチンアクセス可能性に関するＣｈＩＰ－Ｓｅｑデータを使用することができる。ヒストンテール上の翻訳後修飾は、転写状態と密接に相関する。例えば、ヒストンＨ３リジン４のトリメチル化（Ｈ３Ｋ４ｍｅ３）は、活性遺伝子プロモーターを示す。ヒストン３のリジン４上のモノメチル化（Ｈ３Ｋ４ｍｅ１）は、エンハンサーに連結されたマークである。Ｈ３Ｋ４ｍｅ１が濃縮され、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３が枯渇した領域、又はＨ３Ｋ４ｍｅ１及びＨ３Ｋ２７ａｃの両方が濃縮された領域を同定することは、エンハンサーを発見するための実行可能な方法であることが証明されている。Ｈ３Ｋ２７ａｃは、プライムされたエンハンサーから活性を識別する活性化マークである。Ｈ３Ｋ９ｍｅ３は、長期抑制を受ける領域を示す。ＣＴＣＦの主要な役割は、クロマチンの３Ｄ構造の調節にあると考えられている。ＣＴＣＦは、ＤＮＡの鎖を一緒に結合し、したがってクロマチンループを形成し、ＤＮＡを核ラミナのような細胞構造に固定する。それはまた、活性ＤＮＡとヘテロクロマチンＤＮＡとの間の境界を規定する。ＤＮＡの三次元構造が遺伝子の調節に影響を及ぼすので、ＣＴＣＦの活性は遺伝子の発現に影響を及ぼす。ＣＴＣＦは、インスレーター、エンハンサーとプロモーターとの間の相互作用をブロックする配列の活性の主要部分であると考えられている。ＣＴＣＦ結合はまた、遺伝子発現を促進し、また抑制することが示されている。ＣＴＣＦがそのルーピング活性を介してのみ遺伝子発現に影響を及ぼすか否か、又はそれがいくつかの他の未知の活性を有するか否かは未知である。Ｈ３Ｋ３６ｍｅ３は、遺伝子本体を示し、干渉されている転写単位がないことを実験的に示す。ＰｏｌＲ２Ａは転写活性を示し、この領域に由来する転写物が存在しないことを示すために使用される。ＲＮＡＳｅｑ－はＤＮＡのマイナス鎖の転写活性を示し、ＲＮＡＳｅｑ＋はＤＮＡのプラス鎖の転写活性を示し、両者は当該領域からの転写がないことを示すために使用される。ＲＮＡ－Ｓｅｑ（ＲＮＡ配列決定）は、生体サンプル中のＲＮＡの有無及び量を明らかにするために次世代配列決定（ＮＧＳ）を使用する配列決定技法である。ｍＲＮＡをサンプルから抽出し、断片化し、安定なｄｓ－ｃＤＮＡにコピーする。ｄｓ－ｃＤＮＡは、ハイスループットのショートリード配列決定法を用いて配列決定される。次に、これらの配列を参照ゲノム配列と整列させて、どのゲノム領域が転写されているかを再構築することができる。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座への核酸構築物の組み込みは、肝臓毒性を引き起こさない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座への核酸構築物の組み込みは、隣接遺伝子における発

現を変化させない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座への核酸構築物の組み込みは、肝臓毒性を引き起こさず、かつ隣接遺伝子における発現を変化させない。

【０１０８】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７（本明細書ではＬ－ＳＨ５と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２（本明細書ではＬ－ＳＨ１８と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３（本明細書ではＬ－ＳＨ２０と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。本出願を通して、参照されるゲノム座標は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎウェブサイトで利用可能なＧｅｎｏｍｅ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ＣｏｎｓｏｒｔｉｕｍからのヒトゲノムのＧＲＣｈ３８（ｈｇ３８とも称される）アセンブリにおけるゲノムアノテーションに基づいている。Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ＣｏｎｓｏｒｔｉｕｍからのヒトゲノムのＧＲＣｈ３８（ｈｇ３８とも称される）アセンブリにおけるゲノムアノテーションに基づいたＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０の例示的な配列は、それぞれ配列番号３９、４０、及び４１に記載されている。あるアセンブリと別のアセンブリとの間でゲノム座標を変換するためのツール及び方法は、当該分野で公知であり、本明細書に提供されるゲノム座標を、ヒトゲノムの別のアセンブリにおける対応する座標に変換するために使用され得、同じ機関によって又は同じアルゴリズムを使用して生成された以前のアセンブリへの変換（例えば、ＧＲＣｈ３８からＧＲＣｈ３７へ）、及び異なる機関又はアルゴリズムによって生成されたアセンブリへの変換（例えば、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍによって生成されたＧＲＣｈ３８からＮＣＢＩ３３へ）などである。当該分野で公知の利用可能な方法及びツールとしては、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎウェブサイトで利用可能なＮＣＢＩ Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｍａｐｐｉｎｇ Ｓｅｒｖｉｃｅ、ＵＣＳＣ Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｒｏｗｅｒウェブサイトで利用可能なＵＣＳＣ ＬｉｆｔＯｖｅｒ、及びＥｎｓｅｍｂｌ．ｏｒｇウェブサイトで利用可能なＡｓｓｅｍｂｌｙ Ｃｏｎｖｅｒｔｅｒが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０９】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、以下のゲノム座標、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７（Ｌ－ＳＨ５に対応）又は、非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）ヒト６番染色体の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２（Ｌ－ＳＨ１８に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３（Ｌ－ＳＨ２０に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０

．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１１０】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号３９に記載の配列又はその変異体を含み得る。シンテニー領域は、単一の祖先ゲノム領域に由来する。例えば、シンテニー領域は、異なる生物に由来し得、種分化に由来する。

【０１１１】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０１１２】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４１に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０１１３】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１１４】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によ

って特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１１５】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１１６】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ５と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ１８と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ２０と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。本出願を通して、参照されるゲノム座標は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎウェブサイトで利用可能なＧｅｎｏｍｅ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ＣｏｎｓｏｒｔｉｕｍからのマウスゲノムのＧＲＣｍ３８（ｍｍ１０とも称される）アセンブリにおけるゲノムアノテーションに基づいている。Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ ＣｏｎｓｏｒｔｉｕｍからのマウスゲノムのＧＲＣｍ３８（ｍｍ１０とも称される）アセンブリにおけるゲノムアノテーションに基づいたＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０の例示的な配列は、それぞれ配列番号４０５、４０６、及び４０７に記載されている。あるアセンブリと別のアセンブリとの間でゲノム座標を変換するためのツール及び方法は、当該分野で公知であり、本明細書に提供されるゲノム座標を、マウスゲノムの別のアセンブリにおける対応する座標に変換するために使用され得、同じ機関によって又は同じアルゴリズムを使用して生成された以前のアセンブリへの変換、及び異なる機関又はアルゴリズムによって生成されたアセンブリへの変換などである。当該分野で公知の利用可能な方法及びツールとしては、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎウェブサイトで利用可能なＮＣＢＩ Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｍａｐｐｉｎｇ Ｓｅｒｖｉｃｅ、ＵＣＳＣ Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｒｏｗｅｒウェブサイトで利用可能なＵＣＳＣ ＬｉｆｔＯｖｅｒ、及びＥｎｓｅｍｂｌ．ｏｒｇウェブサイトで利用可能なＡｓｓｅｍｂｌｙ Ｃｏｎｖｅｒｔｅｒが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１７】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、以下のゲノム座標、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６（マウスＬ－ＳＨ５に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシン

テニー領域）、（ｉｉ）マウス１７番染色体の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６（マウスＬ－ＳＨ１８に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２（マウスＬ－ＳＨ２０に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１１８】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスの染色体、又はヒト若しくは非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０５に記載の配列又はその変異体を含み得る。シンテニー領域は、単一の祖先ゲノム領域に由来する。例えば、シンテニー領域は、異なる生物に由来し得、種分化に由来する。

【０１１９】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスの染色体、又はヒト若しくは非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０６に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０１２０】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスの染色体、又はヒト若しくは非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０７に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０１２１】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（マウス１４番染色体の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、

±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１２２】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（マウス１７番染色体の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１２３】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（マウス４番染色体の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１２４】

Ｂ．目的の産物をコードする核酸構築物

本明細書に記載の組成物及び方法は、プロモーターに作動可能に連結された目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）のコード配列を含む核酸構築物の使用を含む。そのような核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、本明細書の他の場所に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座）への、又は本明細書の他の場所に開示されるヌクレアーゼ剤若しくはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系によって作製される切断部位への挿入のためのものであり得る。切断部位という用語は、ヌクレアーゼ剤（例えば、ガイドＲＮＡと複合体を形成したＣａｓ９タンパク質）によってニック又は二本鎖切断が作製されるＤＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、二本鎖切断は、ガイドＲＮＡと複合体化されたＣａｓ９タンパク質、例えば、ＳｐＣａｓ９ガイドＲＮＡと複合体化されたＳｐＣａｓ９タンパク質によって作製される。

【０１２５】

本明細書に開示される核酸構築物の長さは、変動し得る。構築物は、例えば、約１ｋｂ～約５ｋｂ、例えば、約１ｋｂ～約４．５ｋｂ又は約１ｋｂ～約４ｋｂであり得る。例示的な核酸構築物は、約１ｋｂ～約５ｋｂの長さ、又は約１ｋｂ～約４ｋｂの長さである。代替的に、核酸構築物は、約１ｋｂ～約１．５ｋｂ、約１．５ｋｂ～約２ｋｂ、約２ｋｂ～約２．５ｋｂ、約２．５ｋｂ～約３ｋｂ、約３ｋｂ～約３．５ｋｂ、約３．５ｋｂ～約４ｋｂ、約４ｋｂ～約４．５ｋｂ、又は約４．５ｋｂ～約５ｋｂの長さであり得る。代替的に、核酸構築物は、例えば、５ｋｂ以下、４．５ｋｂ以下、４ｋｂ以下、３．５ｋｂ以下、３ｋｂ以下、又は２．５ｋｂ以下の長さであり得る。

【０１２６】

構築物は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）を含み得、一本鎖、二本鎖、又は部分的に一本鎖及び部分的に二本鎖であり得、直線状又は環状（例えば、ミニ

サークル）形態で宿主細胞に導入され得る。例えば、米国特許出願公開第２０１０／００４７８０５号、同第２０１１／０２８１３６１号、及び同第２０１１／０２０７２２１号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。直線状の形態で導入された場合、構築物の末端は、既知の方法によって（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）保護され得る。例えば、１つ以上のジデオキシヌクレオチド残基を、直線状分子の３’末端に付加し得る、及び／又は自己相補的オリゴヌクレオチドを、一方又は両方の末端に結合し得る。例えば、Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８４：４９５９－４９６３及びＮｅｈｌｓ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７２：８８６－８８９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。外因性ポリヌクレオチドを分解から保護するための追加の方法としては、末端アミノ基（複数可）の付加、並びに例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、及びＯ－メチルリボース又はデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間結合の使用が挙げられるが、これらに限定されない。構築物は、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクター分子の一部として細胞に導入され得る。構築物は、ウイルス要素を省いてもよい。更に、構築物は、ネイキッド核酸として導入され得る、リポソーム、ポリマー、若しくはポロキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として導入され得る、又はウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス）によって送達され得る。

【０１２７】

本明細書に開示される構築物は、必要に応じて１つ以上の好適な構造的特徴を含むように、及び／又は１つ以上の機能的利益を付与するように、いずれか又は両方の末端で修飾され得る。例えば、構造的修飾は、本明細書に開示される構築物を宿主細胞に送達するために使用される方法（例えば、ウイルスベクター送達の使用又は送達のための脂質ナノ粒子へのパッケージング）に応じて変動し得る。そのような修飾には、例えば、逆位末端反復（ＩＴＲ）、ヘアピン、ループなどの末端構造、及びトロイドなどの他の構造が含まれる。例えば、本明細書に開示される構築物は、１つ、２つ、若しくは３つのＩＴＲを含み得る、又は２つ以下のＩＴＲを含み得る。構造的修飾の様々な方法が既知である。

【０１２８】

構築物は、目的の産物の発現を駆動するプロモーター及び／又はエンハンサー、例えば、エピソーム中で又は組み込み時に目的の産物の発現を駆動する構成的プロモーター又は誘導性若しくは組織特異的（例えば、肝臓特異的）プロモーターを含む。非限定的な例示的な構成的プロモーターには、サイトメガロウイルス即時初期プロモーター（cytomegalovirus、ＣＭＶ）、シミアンウイルス（ＳＶ４０）プロモーター、アデノウイルス主要後期（major latepromoter、ＭＬＰ）プロモーター、ラス肉腫ウイルス（Rous sarcoma virus、ＲＳＶ）プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（mousemammary tumor virus、ＭＭＴＶ）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（phosphoglycerate kinase、ＰＧＫ）プロモーター、伸長因子－アルファ（elongationfactor-alpha、ＥＦ１ａ）プロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、チューブリンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、その機能的断片、又は前述のいずれかの組み合わせが含まれる。例えば、プロモーターは、ＣＭＶプロモーター又は切断型ＣＭＶプロモーターであり得る。別の例では、プロモーターは、ＥＦ１ａプロモーターであり得る。肝臓に適したプロモーターとしては、例えば、アルブミン（ＡＬＢ）プロモーター又はトランスサイレチン（ＴＴＲ）プロモーターを挙げることができる。肝臓に適したエンハンサーとしては、例えば、ＳＥＲＰＩＮＡ１エンハンサーを挙げることができる。非限定的な例示的な誘導性プロモーターには、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、又はアルコールによって誘導性であるプロモーターが含まれる。誘導性プロモーターは、Ｔｅｔ－Ｏｎ（登録商標）プロモーター（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）などの低い基底（非誘導）発現レベルを有するものであってもよい。

【０１２９】
いくつかの例では、核酸構築物は、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸のホモロジー非依存性挿入において機能する。そのような核酸構築物は、例えば、非分裂細胞（例えば、相同組換え（homologous recombination、ＨＲ）ではなく、非相同末端結合（non-homologous end joining、ＮＨＥＪ）が、二本鎖ＤＮＡ切断が修復される主要な機構である細胞）又は分裂細胞（活発に分裂している細胞）において機能し得る。そのような構築物は、例えば、ホモロジー非依存性ドナー構築物であり得る。好ましい実施形態では、プロモーター及び他の調節配列は、ヒトにおける使用に適切であり、例えば、ヒト細胞（例えば、ヒト肝臓細胞）における調節因子によって認識され、そしてヒトにおける使用のために規制当局に受容可能である。

【０１３０】
本明細書に開示される構築物は、任意の特定の使用のために必要に応じて、及び／又は１つ以上の所望の機能を付与する、任意の好適な構造的特徴を含む又は除外するように修飾され得る。例えば、本明細書に開示されるいくつかの構築物は、ホモロジーアームを含まない。本明細書に開示されるいくつかの構築物は、非相同末端結合によって、ヌクレアーゼ剤の標的ＤＮＡ配列中の標的ゲノム遺伝子座又は切断部位への挿入が可能である（例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座への挿入が可能である）。例えば、そのような構築物は、本明細書に開示されるヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系、例えば、ＳｐｙＣａｓ９　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）による切断後の平滑末端二本鎖切断に挿入され得る。具体的な例では、構築物は、ＡＡＶを介して送達され得、非相同末端結合による挿入が可能であり得る（例えば、構築物は、ホモロジーアームを含まないものであり得る）。

【０１３１】
特定の例では、構築物は、ホモロジー非依存性標的化組み込みを介して挿入され得る。例えば、核酸構築物又は構築物中の目的の産物コード配列（例えば、目的のポリペプチドコード配列）及びプロモーターは、ヌクレアーゼ剤の標的部位（例えば、標的化挿入のための標的ＤＮＡ配列中（例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座中）と同じ標的部位、及び標的化挿入のための標的ＤＮＡ配列を切断するために使用される同じヌクレアーゼ剤）によって各側に隣接され得る。次いで、ヌクレアーゼ剤は、隣接する標的部位を切断することができる。具体的な例では、構築物は、ＡＡＶ媒介送達で送達され、隣接する標的部位の切断は、ＡＡＶの逆位末端反復（ＩＴＲ）を除去することができる。いくつかの例では、標的化挿入のための標的ＤＮＡ配列（例えば、隣接するプロトスペーサー隣接モチーフを含むｇＲＮＡ標的配列などセーフハーバー遺伝子座中の標的ＤＮＡ配列）は、目的の産物コード配列（例えば、目的のポリペプチドコード配列）及びプロモーターが切断部位又は標的ＤＮＡ配列にある向きで挿入される場合にはもはや存在しないが、目的の産物コード配列（例えば、目的のポリペプチドコード配列）が切断部位又は標的ＤＮＡ配列に逆の向きで挿入される場合には再形成される。

【０１３２】
本明細書に開示される構築物は、ポリアデニル化配列（例えば、目的の産物コード配列の下流又は３’）を含み得る。好適なポリアデニル化テール配列を設計する方法は、周知である。ポリアデニル化テール配列は、例えば、目的のポリペプチドコード配列の産物の下流の「ポリＡ」ストレッチとしてコードされ得る。ポリＡテールは、例えば、少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は１００個のアデニン、及び任意選択的に最大３００個のアデニンを含み得る。具体的な例では、ポリＡテールは、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００個のアデニンヌクレオチドを含む。好適なポリアデニル化テール配列及び／又はポリアデニル化シグナル配列を設計する方法は、周知である。例えば、ポリアデニル化シグナル配列ＡＡＵＡＡＡは哺乳動物系において一般的に使用されるが、ＵＡＵＡＡＡ又はＡＵ／ＧＵＡＡＡなどの変異体が同定されている。例えば、Ｐｒｏｕｄｆｏｏｔ（２０１１）Ｇｅｎｅｓ　＆　Ｄｅｖ．２５（１７）：１７７０－８２を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる

。ポリアデニル化シグナル配列という用語は、転写の終結及びｍＲＮＡ転写物へのポリＡテールの付加を指示する任意の配列を指す。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）テー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、切断及びポリアデニル化の効率を高めるのに役立つ多様な補助配列が隣接している場合がある。コア配列は、ポリＡ認識モチーフ又はポリＡ認識配列と呼ばれ、切断及びポリアデニル化特異性因子（cleavage and polyadenylation-specificity factor、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又はＡＡＵＡＡＡ）、並びに定義が不十分であり、切断刺激因子（cleavagestimulation factor、ＣｓｔＦ）によって結合される下流領域（Ｕ又はＧ及びＵが豊富）で構成される。使用され得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（humangrowth hormone、ＨＧＨ）ポリアデニル化シグナル、シミアンウイルス４０（simian virus 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（bovinegrowth hormone、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、又は真核細胞における遺伝子発現の調節に好適であることが既知の任意の転写終結配列が含まれる。一例では、ポリアデニル化シグナルは、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）後期ポリアデニル化シグナルである。別の例では、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）ポリアデニル化シグナルである。

【０１３３】

（１）目的の産物及び目的のポリペプチド

目的の任意の産物は、本明細書中に開示される核酸構築物によってコードされ得る。例えば、目的の産物は、治療用ＲＮＡ又は治療用ポリペプチドなど目的の治療用産物であり得る。

【０１３４】

一例では、目的の産物は、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＲＮＡｉ剤、又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系で使用するためのガイドＲＮＡなど目的のＲＮＡである。例えば、目的のＲＮＡは、治療用ＲＮＡであり得る。

【０１３５】

「ＲＮＡｉ剤」は、配列特異的方法で、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）などの標的ＲＮＡの翻訳の分解又は阻害を容易にすることができる小さい二本鎖ＲＮＡ又はＲＮＡ様（例えば、化学的に修飾されたＲＮＡ）オリゴヌクレオチド分子を含む組成物である。ＲＮＡｉ剤のオリゴヌクレオチドは、結合したヌクレオシドのポリマーであり、各々を独立して修飾することも、修飾しないこともできる。ＲＮＡｉ剤は、ＲＮＡ干渉メカニズムを介して機能する（すなわち、哺乳類細胞のＲＮＡ干渉経路機構（ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体又はＲＩＳＣ）との相互作用を介してＲＮＡ干渉を誘導する）。ＲＮＡｉ剤は、その用語が本明細書で使用されるように、主にＲＮＡ干渉メカニズムを介して作用すると考えられているが、開示されたＲＮＡｉ剤は、任意の特定の経路又は作用メカニズムに拘束又は限定されない。本明細書に開示されるＲＮＡｉ剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、これらに限定されないが、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、及びダイサー基質が含まれる。本明細書に記載のＲＮＡｉ剤のアンチセンス鎖は、標的ＲＮＡの配列（すなわち、標準的な命名法を使用して一連の文字で記載された核酸塩基又はヌクレオチドの連続又は順序）に少なくとも部分的に相補的である。

【０１３６】

一本鎖ＡＳＯ及びＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）は、オリゴヌクレオチドがワトソン－クリックの塩基対を介して標的ＲＮＡに結合するという基本原理を共有している。理論に縛られることを望まないが、ＲＮＡｉの間に、低分子ＲＮＡ二重鎖（ＲＮＡｉ剤）がＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（RNA-induced silencing complex、ＲＩＳＣ）と結合し、

一方の鎖（パッセンジャー鎖）が失われ、残りの鎖（ガイド鎖）が失われるＲＩＳＣと協力して相補的ＲＮＡに結合する。次に、ＲＩＳＣの触媒成分であるアルゴノート２（Ａｇｏ２）が標的ＲＮＡを切断する。ガイド鎖は常に相補的センス鎖又はタンパク質（ＲＩＳＣ）のいずれかに関連付けられている。対照的に、ＡＳＯは生き残り、一本鎖として機能する必要がある。ＡＳＯは標的ＲＮＡに結合し、リボソーム又はスプライシング因子などの他の因子がＲＮＡに結合するのをブロックするか、又はヌクレアーゼなどのタンパク質を動員する。所望の作用メカニズムに基づいて、ＡＳＯに対して様々な修飾と標的領域が選択される。ギャップマーは、ＤＮＡの中央の８～１０塩基ギャップに隣接する各末端に２～５個の化学修飾ヌクレオチド（例えば、ＬＮＡ又は２’－ＭＯＥ）を含むＡＳＯオリゴヌクレオチドである。標的ＲＮＡに結合した後、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッドはＲＮａｓｅ　Ｈの基質として機能する。

【０１３７】

別の例では、目的の産物は、目的のポリペプチドである。一例では、目的のポリペプチドは、治療用ポリペプチドである。例えば、治療用ポリペプチドは、対象において欠如しているか、又は欠損しているポリペプチドであり得る。一例では、目的のポリペプチドは、酵素である。

【０１３８】

一例では、目的のポリペプチドは、抗体又は抗原結合タンパク質である。別の例では、目的のポリペプチドは、外因性Ｔ細胞受容体又はキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）である。別の例では、目的のポリペプチドは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系において使用するためのＣａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９）である。

【０１３９】

本明細書に開示される場合、「抗原結合タンパク質」には、抗原に結合する任意のタンパク質が含まれる。抗原結合タンパク質の例としては、抗体、抗体の抗原結合断片、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ｓｃＦｖ、ビスｓｃＦｖ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、Ｖ－ＮＡＲ、ＶＨＨ、ＶＬ、Ｆ（ａｂ）、Ｆ（ａｂ）$_2$、ＤＶＤ（デュアル可変ドメイン抗原結合タンパク質）、ＳＶＤ（単一可変ドメイン抗原結合タンパク質）、二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）、又はデイビスボディが含まれる（全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，５８６，７１３号）。

【０１４０】

「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互接続された４つのポリペプチド鎖、２つの重鎖（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖を含む免疫グロブリン分子を含む。各重鎖は、重鎖可変ドメイン及び重鎖定常領域（C_H）を含む。重鎖の定数領域は、C_H1、C_H2、及びC_H3の３つのドメインを含む。各軽鎖は、軽鎖可変ドメイン及び軽鎖定常領域（C_L）を含む。重鎖及び軽鎖可変ドメインは、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれるより保存された領域が散在する、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変性の領域に更に分割され得る。各重鎖及び軽鎖可変ドメインは、アミノ末端からカルボキシ末端に次の順序、すなわちＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４で配置された３個のＣＤＲ及び４個のＦＲを含む（重鎖ＣＤＲはＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３と略され得、軽鎖ＣＤＲはＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３と略され得る）。「高親和性」抗体という用語は、約10^{-9}Ｍ以下（例えば、1×10^{-9}Ｍ、1×10^{-10}Ｍ、約1×10^{-11}Ｍ、又は約1×10^{-12}Ｍ）のその標的エピトープに対するK_Dを有する抗体を指す。一実施形態では、K_Dは、表面プラズモン共鳴、例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ（商標）によって測定される。別の実施形態では、K_DはＥＬＩＳＡによって測定される。

【０１４１】

抗原結合タンパク質又は抗体は、例えば、中和抗原結合タンパク質又は抗体、あるいは広域中和抗原結合タンパク質又は抗体であり得る。中和抗体は、細胞が生物学的に持つあらゆる効果を中和することにより、抗原又は感染体から細胞を防御する抗体である。広域

中和抗体（ｂＮＡｂ）は、特定の細菌又はウイルスの複数の株に影響を及ぼす。例えば、広域中和抗体は、保存された機能的標的に焦点を合わせ、保存された細菌又はウイルスタンパク質の脆弱な部位（例えば、インフルエンザウイルスタンパク質血球凝集素の脆弱な部位）を攻撃することができる。感染又はワクチン接種の際に免疫系によって作られた抗体は、細菌又はウイルスの表面上の容易にアクセス可能なループに焦点を合わせる傾向があり、それらはしばしば大きな配列及び立体配座の変動性を有する。これは、細菌又はウイルスの集団はこれらの抗体をすばやく回避することができ、抗体は機能に不可欠ではないタンパク質の部分を攻撃するという２つの理由で問題である。細菌又はウイルスの多くの株を攻撃するため「広域」と呼ばれ、細菌又はウイルスの主要な機能部位を攻撃して感染を阻止するため「中和」と呼ばれる、広域中和抗体は、これらの問題を克服できる。しかし残念ながら、これらの抗体は通常遅すぎて、疾患からの効果的な保護を提供しない。

【０１４２】

本明細書に開示される抗原結合タンパク質は、任意の抗原を標的とすることができる。「抗原」という用語は、分子全体であろうと分子内のドメインであろうと、その物質に結合特異性を有する抗体の産生を誘発することができる物質を指す。抗原という用語には、野生型宿主生物では自己認識によって抗体産生を誘発しないが、免疫学的寛容を破壊する適切な遺伝子工学を用いて宿主動物でそのような応答を誘発することができる物質も含まれる。

【０１４３】

一例として、標的抗原は、疾患関連抗原であり得る。「疾患関連抗原」という用語は、その存在が特定の疾患の発生又は進行と相関している抗原を指す。例えば、抗原は、疾患関連タンパク質（すなわち、その発現が疾患の発生又は進行と相関しているタンパク質）に存在し得る。任意選択で、疾患関連タンパク質は、特定のタイプの疾患で発現されるが、通常は健康な成人組織では発現されないタンパク質（すなわち、疾患特異的発現又は疾患限定発現を有するタンパク質）であり得る。しかしながら、疾患関連タンパク質は、疾患特異的又は疾患限定的な発現を示す必要はない。

【０１４４】

一例として、疾患関連抗原は、がん関連抗原であってよい。「がん関連抗原」という用語は、その存在が１つ以上のタイプのがんの発生又は進行と相関している抗原を指す。例えば、抗原は、がん関連タンパク質（すなわち、その発現が１つ以上のタイプのがんの発生又は進行と相関しているタンパク質）に存在してもよい。例えば、がん関連タンパク質は、発癌性タンパク質（すなわち、細胞成長を調節するタンパク質などの、がんの進行に寄与し得る活性を有するタンパク質）であり得るか、又は腫瘍抑制タンパク質（すなわち、通常、細胞周期の負の調節によって又はアポトーシスの促進などによって、がん形成の可能性を軽減するように作用するタンパク質）であり得る。任意選択で、がん関連タンパク質は、特定のタイプのがんで発現するが、通常は健康な成人組織では発現されないタンパク質（すなわち、がん特異的発現、がん限定発現、腫瘍特異的発現、又は腫瘍限定発現を有するタンパク質）であり得る。しかしながら、がん関連タンパク質は、がん特異的、がん限定、腫瘍特異的、又は腫瘍限定の発現を有する必要はない。がん特異的又はがん限定とみなされるタンパク質の例は、がん精巣抗原又はがん胎児性抗原である。がん精巣抗原（ＣＴＡ）は、異なる組織学的起源のヒト腫瘍で発現する腫瘍関連抗原の大きなファミリーであるが、男性の生殖細胞を除いて、正常組織では発現しない。がんでは、これらの発生抗原は再発現することができ、免疫活性化の場所として機能することができる。がん胎児性抗原（ＯＦＡ）は、通常、胎児の発育中にのみ存在するタンパク質であるが、特定の種類のがんの成人に見られる。

【０１４５】

別の例として、疾患関連抗原は、感染症関連抗原であり得る。「感染症関連抗原」という用語は、その存在が特定の感染症の発生又は進行と相関している抗原を指す。例えば、抗原は、感染症関連タンパク質（すなわち、その発現が感染症の発生又は進行と相関しているタンパク質）に存在し得る。任意選択で、感染症関連タンパク質は、特定のタイプの

感染症で発現されるが、通常は健康な成人組織では発現されないタンパク質（すなわち、感染症特異的発現又は感染症限定発現を有するタンパク質）であり得る。しかしながら、感染症関連タンパク質は、感染症特異的又は感染症限定的な発現を示す必要はない。例えば、抗原は、ウイルス抗原又は細菌抗原であり得る。そのような抗原には、例えば、免疫系によって認識され、免疫応答を誘発することができるウイルス又は細菌の表面上の分子構造（例えば、ウイルスタンパク質又は細菌タンパク質）が含まれる。

【０１４６】

「エピトープ」という用語は、抗原結合タンパク質（例えば、抗体）が結合する抗原上の部位を指す。エピトープは、１つ以上のタンパク質の三次フォールディングによって並置された隣接アミノ酸又は非隣接アミノ酸から形成することができる。隣接アミノ酸から形成されるエピトープ（線形エピトープとしても既知）は典型的には、変性溶媒に対する曝露で保持されるが、三次フォールディングによって形成されたエピトープ（配座異性エピトープとしても既知）は典型的には、変性溶媒での処置で失われる。エピトープは典型的には、少なくとも３、更に通常は、少なくとも５又は８～１０のアミノ酸を特有の空間配座で含む。エピトープの空間配座を決定する方法には、例えば、Ｘ線結晶学及び二次元核磁気共鳴が含まれる。例えば、Ｅｐｉｔｏｐｅ　Ｍａｐｐｉｎｇ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，ｉｎ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．６６，Ｇｌｅｎｎ　Ｅ．Ｍｏｒｒｉｓ，Ｅｄ．（１９９６）を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１４７】

「重鎖」又は「免疫グロブリン重鎖」という用語は、任意の生物からの免疫グロブリン重鎖定常領域配列を含む免疫グロブリン重鎖配列を含む。重鎖可変ドメインは、特に明記しない限り、３つの重鎖ＣＤＲ及び４つのＦＲ領域を含む。重鎖の断片には、ＣＤＲ、ＣＤＲ及びＦＲ、並びにそれらの組み合わせが含まれる。典型的な重鎖は、可変ドメインに続いて、（Ｎ末端からＣ末端まで）C_H1ドメイン、ヒンジ、C_H2ドメイン、及びC_H3ドメインを有する。重鎖の機能的断片は、エピトープを特異的に認識することができ（例えば、マイクロモル、ナノモル、又はピコモル範囲のK_Dでエピトープを認識する）、細胞から発現及び分泌することができ、少なくとも１つのＣＤＲを含む断片を含む。重鎖可変ドメインは、生殖細胞系列に存在するV_H、D_H、及びJ_Hセグメントのレパートリーに由来するV_H、D_H、及びJ_Hセグメントを一般に含む可変領域ヌクレオチド配列によってコードされる。様々な生物のＶ、Ｄ、及びＪ重鎖セグメントの配列、位置、及び命名法は、ワールドワイドウェブ（ｗｗｗ）のインターネット経由でＵＲＬ「ｉｍｇｔ．ｏｒｇ」からアクセスできるＩＭＧＴデータベースに見出すことができる。

【０１４８】

「軽鎖」という用語は、任意の生物からの免疫グロブリン軽鎖配列を含み、特に明記しない限り、ヒトカッパ（κ）及びラムダ（λ）軽鎖及びＶｐｒｅＢ、並びに代理軽鎖を含む。軽鎖可変ドメインには、特に指定がない限り、通常、３つの軽鎖ＣＤＲと４つのフレームワーク（ＦＲ）領域が含まれる。一般に、全長軽鎖は、アミノ末端からカルボキシル末端まで、ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４を含む可変ドメイン、及び軽鎖定常領域アミノ酸配列を含む。軽鎖可変ドメインは、生殖細胞系に存在する軽鎖Ｖ及びＪ遺伝子セグメントのレパートリーに由来する軽鎖V_L及び軽鎖J_L遺伝子セグメントを一般に含む軽鎖可変領域ヌクレオチド配列によってコードされる。様々な生物の軽鎖Ｖ及びＪ遺伝子セグメントの配列、位置、及び命名法は、ワールドワイドウェブ（ｗｗｗ）のインターネット経由でＵＲＬ「ｉｍｇｔ．ｏｒｇ」からアクセスできるＩＭＧＴデータベースに見出すことができる。軽鎖は、例えば、それらが出現するエピトープ結合タンパク質によって選択的に結合される第１又は第２のエピトープのいずれにも選択的に結合しないものを含む。軽鎖はまた、それらが現れるエピトープ結合タンパク質によって選択的に結合される１つ以上のエピトープに結合して認識するか、又は結合及び認識することで重鎖を補助するものを含む。

【０１４９】

本明細書で使用される「相補性決定領域」又は「ＣＤＲ」という用語は、通常（すなわち、野生型動物において）、免疫グロブリン分子（例えば、抗体又はＴ細胞受容体）の軽鎖又は重鎖の可変領域内の２つのフレームワーク領域の間に現れる、生物の免疫グロブリン遺伝子の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。ＣＤＲは、例えば、生殖細胞系列配列、又は例えば、ナイーブ又は成熟Ｂ細胞若しくはＴ細胞によって再構成された配列によって、コードされ得る。ＣＤＲは、体細胞変異（例えば、動物の生殖細胞系列にコードされている配列とは異なる）、ヒト化、及び／又はアミノ酸の置換、追加、又は欠失で修飾することができる。いくつかの状況（例えば、ＣＤＲ３の場合）では、ＣＤＲは、隣接していない（例えば、再構成されていない核酸配列において）が、Ｂ細胞核酸配列において、例えば、配列のスプライシング又は接続の結果として（例えば、ＶＤＪ組換えによる重鎖ＣＤＲ３の形成）隣接している２つ以上の配列（例えば、生殖系列配列）によってコードされ得る。

【０１５０】

「再構成されていない」という用語は、Ｖ遺伝子セグメント及びＪ遺伝子セグメント（重鎖の場合、Ｄ遺伝子セグメントも同様）が別々に維持されるが、結合して、Ｖ（Ｄ）Ｊレパートリーの単一のＶ、（Ｄ）、Ｊで構成される再構成されたＶ（Ｄ）Ｊ遺伝子を形成することができる免疫グロブリン遺伝子座の状態を含む。「再構成された」という用語は、Ｖセグメントが本質的に完全なV_H又はV_Lドメインをそれぞれコードする配置でＤ－Ｊ又はＪセグメントに直接隣接して配置される重鎖又は軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の構成を含む。

【０１５１】

抗原結合タンパク質は、ｓｃＦｖなどの一本鎖抗原結合タンパク質であってよい。代替的に、抗原結合タンパク質は一本鎖抗原結合タンパク質ではない。例えば、抗原結合タンパク質は、別々の軽鎖及び重鎖を含むことができる。重鎖コード配列は、軽鎖コード配列の上流にあり得るか、又は軽鎖コード配列は、重鎖コード配列の上流にあり得る。１つの具体的な例において、重鎖コード配列は、軽鎖コード配列の上流にある。例えば、重鎖コード配列は、V_H、D_H、及びJ_Hセグメントを含むことができ、軽鎖コード配列は、軽鎖V_L及び軽鎖J_L遺伝子セグメントを含むことができる。抗原結合タンパク質コード配列は、核酸構築物の外因性プロモーターに作動可能に連結することができる。同様に、核酸構築物の抗原結合タンパク質コード配列は、分泌のための外因性シグナル配列を含むことができる。具体的な例では、抗原結合タンパク質は、別個の軽鎖及び重鎖を含み、各鎖は、別個の外因性シグナル配列に作動可能に連結される。

【０１５２】

シグナル配列（すなわち、Ｎ末端シグナル配列）は、シグナル認識粒子（ＳＲＰ）に依存する方法で、新生分泌タンパク質及び膜タンパク質の小胞体（ＥＲ）へのターゲティングを媒介する。通常、シグナル配列は共翻訳的に切断され、シグナルペプチドと成熟タンパク質が生成される。使用できる外因性シグナル配列又はシグナルペプチドの例には、例えば、マウスアルブミン、ヒトアルブミン、マウスＲＯＲ１、ヒトＲＯＲ１、ヒトアズロシジン、Ｃｒｉｃｅｔｕｌｕｓ ｇｒｉｓｅｕｓ Ｉｇ κ鎖Ｖ ＩＩＩ領域ＭＯＰＣ６３様、及びヒトＩｇ κ鎖Ｖ ＩＩＩ領域ＶＧのようなシグナル配列／ペプチドが含まれる。他の既知のシグナル配列／ペプチドも使用することができる。具体的な例では、ＲＯＲ１シグナル配列が使用される。

【０１５３】

抗原結合タンパク質をコードする配列（例えば、重鎖コード配列及び軽鎖コード配列）中の１つ以上の核酸は、マルチシストロン性発現コンストラクトで一緒になり得る。例えば、重鎖及び軽鎖をコードする核酸は、バイシストロン性発現コンストラクトにおいて一緒になり得る。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方略には、例えば、２Ａペプチドの使用及び内部リボソーム進入部位（internal ribosome entry site、ＩＲＥＳ）の使用が

含まれる。一例として、そのようなマルチシストロン性ベクターは、１つ以上の内部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、そのような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、一般に１８～２２アミノ酸の長さを有する、小さな「自己切断」ペプチドであり、同じｍＲＮＡから等モルレベルの複数の遺伝子を産生する。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、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。「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、全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、及び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 Ｔｈｅｒ５：６２７－６３８を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。使用することができる２Ａペプチドの例としては、Ｔｈｏｓｅａ ａｓｉｇｎａウイルス２Ａ（Ｔ２Ａ）、ブタテッショウウイルス－１ ２Ａ（Ｐ２Ａ）、ウマ鼻炎Ａウイルス（ＥＲＡＶ）２Ａ（Ｅ２Ａ）、及びＦＭＤＶ ２Ａ（Ｆ２Ａ）が挙げられる。例示的なＴ２Ａ、Ｐ２Ａ、Ｅ２Ａ、及びＦ２Ａ配列としては、以下、すなわち、Ｔ２Ａ（ＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ、配列番号３１）、Ｐ２Ａ（ＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ、配列番号３２）、Ｅ２Ａ（ＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ、配列番号３３）、及びＦ２Ａ（ＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ、配列番号３４）が挙げられる。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。

【０１５４】

いくつかの核酸構築物において、フューリン切断部位をコードする核酸は、軽鎖コード配列と重鎖コード配列との間に含まれる。いくつかの核酸構築物において、リンカー（例えば、ＧＳＧ）をコードする核酸は、軽鎖コード配列と重鎖コード配列との間（例えば、２Ａペプチドコード配列のすぐ上流）に含まれる。例えば、フューリン切断部位を２Ａペプチドの上流に含めることができ、フューリン切断部位と２Ａペプチドの両方が軽鎖と重鎖の間に位置する（すなわち、上流鎖－フューリン切断部位－２Ａペプチド－下流鎖）。翻訳中、２Ａペプチド配列で第１の切断事象が発生する。しかしながら、２Ａペプチドのほとんどは、上流鎖のＣ末端に残存物として付着したままになり（例えば、軽鎖が重鎖の上流にある場合は軽鎖、重鎖が軽鎖の上流にある場合は重鎖）、下流鎖のＮ末端（又はシグナル配列が下流鎖の上流に含まれる場合はシグナル配列のＮ末端）に１つのアミノ酸が付加されている。フューリン切断部位で開始される第２の切断事象は、翻訳後プロセシングによってより天然の重鎖又は軽鎖を得るために、２Ａ残存物のない上流鎖を生成する。

【０１５５】

「キメラ抗原受容体」（ＣＡＲ）という用語は、標的細胞上に存在する成分に対する結合ドメイン、例えば、所望の抗原に対する抗体ベースの特異性を、Ｔ細胞受容体活性化細胞内ドメインと組み合わせて、特異的抗標的細胞性免疫活性を示すキメラタンパク質を生成する分子を指す。例えば、ＣＡＲは、Ｔ細胞抗原受容体複合体ゼータ鎖の細胞内シグナル伝達ドメインに融合された細胞外単鎖抗体結合ドメイン（ｓｃＦｖ）を含み得、Ｔ細胞において発現されると、モノクローナル抗体の特異性に基づいて抗原認識をリダイレクトする能力を有することができる。

【０１５６】

目的のポリペプチドは、分泌ポリペプチド（例えば、細胞によって分泌されるタンパク質及び／又は可溶性細胞外タンパク質として機能的に活性であるタンパク質）であり得る。あるいは、目的のポリペプチドは、細胞内ポリペプチド（例えば、可溶性細胞質ゾルポ

リペプチドを含む、細胞によって分泌されず、細胞内で機能的に活性であるタンパク質）であり得る。

【０１５７】

目的のポリペプチドは、野生型ポリペプチドであり得る。代替的に、目的のポリペプチドは、変異体又は突然変異体ポリペプチドであり得る。

【０１５８】

一例では、目的のポリペプチドは、肝臓タンパク質（例えば、肝臓において内因的に産生され、及び／又は肝臓において機能的に活性であるタンパク質）である。別の例では、目的のポリペプチドは、肝臓によって産生される循環タンパク質であり得る。別の例では、目的のポリペプチドは、非肝臓タンパク質であり得る。

【０１５９】

目的のポリペプチドは、外因性ポリペプチドであり得る。「外因性」ポリペプチドコード配列は、外因性供給源から宿主細胞ゲノム内の部位に（例えば、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座などゲノム遺伝子座において）導入されているコード配列を指し得る。すなわち、外因性ポリペプチドコード配列は、その挿入部位に関して外因性であり、そのような外因性コード配列から発現されたポリペプチドは、外因性ポリペプチドと称される。異種コード配列は、天然に存在し得、又は操作され得、野生型又は変異体であり得る。外因性コード配列は、外因性ポリペプチドをコードする配列以外のヌクレオチド配列（例えば、配列内リボソーム進入部位）を含み得る。外因性コード配列は、野生型又は変異体（例えば、突然変異体）として宿主ゲノム内に天然に存在するコード配列であり得る。例えば、宿主細胞は目的のコード配列を（野生型として、又は変異体として）含有するが、同じコード配列又はその変異体を外因性供給源として（例えば、高度に発現される遺伝子座での発現のために）導入することができる。外因性コード配列はまた、宿主ゲノム内に天然に存在しない、又は宿主ゲノム内に天然に存在しない外因性ポリペプチドを発現するコード配列であり得る。外因性コード配列は、外因性核酸配列（例えば、核酸配列は、レシピエント細胞に対して内因性ではない）を含み得る、又はその挿入部位に関して、及び／又はそのレシピエント細胞に関して外因性であり得る。

【０１６０】

目的のポリペプチドのコード配列は、宿主細胞での発現のためにコドン最適化され得る。例えば、コード配列は、コドン最適化され得る、又は目的のポリペプチドの１つ以上のアミノ酸（すなわち、同じアミノ酸配列）の１つ以上の代替コドンを使用してもよい。代替コドンは、本明細書で使用される場合、所与のアミノ酸についてのコドン使用の変動を指し、所与の発現系について好ましい又は最適化されたコドン（コドン最適化）であってもなくてもよい。好ましいコドン使用、又は所与の発現系において十分に許容されるコドンは既知である。

【０１６１】

（２）ベクター

本明細書に開示される核酸構築物は、発現のための、又は標的ゲノム遺伝子座（例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座）への組み込み及び標的ゲノム遺伝子座からの発現のためのベクターにおいて提供され得る。ベクターは、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を含み得る。ベクターはまた、本明細書の他の場所に開示されるヌクレアーゼ剤成分を含み得る。例えば、ベクターは、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系（Ｃａｓタンパク質及びｇＲＮＡをコードする核酸）、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系のうちの１つ以上の成分、又はそれらの組み合わせ（例えば、核酸構築物及びｇＲＮＡ）を含み得る。場合によっては、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物を含むベクターは、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤のいかなる成分も含まない（例えば、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含まず、ｇＲＮＡをコードする核酸を含まない）。いくつかのそのようなベクターは、標的ゲノム遺伝子座の標的部位に対応するホモロジーアームを含む。他のそのようなベクターは、いかなるホモロジーアームも含まない

。
【０１６２】
いくつかのベクターは、環状であってもよい。代替的に、ベクターは、直線状であってもよい。ベクターは、脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、又はウイルスキャプシドを介して送達されるようにパッケージされ得る。非限定的な例示的なベクターとしては、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体、ミニ染色体、トランスポゾン、ウイルスベクター、及び発現ベクターが挙げられる。
【０１６３】
ベクターは、例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターなどのウイルスベクターであり得る。ＡＡＶは任意の好適な血清型であってもよく、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）又は自己相補的ＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）であってもよい。他の例示的なウイルス／ウイルスベクターには、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、及び単純ヘルペスウイルスが含まれる。ウイルスは、分裂細胞、非分裂細胞、又は分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染し得る。ウイルスは、宿主ゲノムに組み込まれ得る、又は代替的に宿主ゲノムに組み込まれない。このようなウイルスは、免疫性が低減するようにも操作され得る。ウイルスは、複製可能であり得、複製欠損性であり得る（例えば、ビリオン複製及び／又はパッケージングの追加ラウンドに必要な１つ以上の遺伝子に欠損がある）。ウイルスは、一過性発現又はより長く持続する発現を引き起こし得る。ウイルスベクターは、それらの野生型対応物から遺伝的に改変され得る。例えば、ウイルスベクターは、クローニングを容易にするために、又はベクターの１つ以上の特性が変化するように、１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含み得る。そのような特性には、パッケージング容量、形質導入効率、免疫原性、ゲノム組み込み、複製、転写、及び翻訳が含まれ得る。いくつかの例では、ウイルスゲノムの一部は、ウイルスがより大きなサイズを有する外因性配列をパッケージングすることができるように欠失され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、増強された形質導入効率を有し得る。いくつかの例では、宿主においてウイルスによって誘導される免疫応答が低減されてもよい。いくつかの例では、宿主ゲノムへのウイルス配列の組み込みを促進するウイルス遺伝子（インテグラーゼなど）は、ウイルスが非組み込み型になるように変異され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、複製欠損であり得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、ベクター上のコード配列の発現を駆動するための外因性転写又は翻訳制御配列を含み得る。いくつかの例では、ウイルスは、ヘルパー依存性であり得る。例えば、ウイルスは、ベクターを増幅してウイルス粒子にパッケージングするのに必要とされるウイルス成分（ウイルスタンパク質など）を供給するために、１つ以上のヘルパー成分を必要とし得る。そのような場合、ウイルス成分をコードする１つ以上のベクターを含む１つ以上のヘルパー成分が、本明細書に記載のベクター系と共に宿主細胞又は宿主細胞の集団に導入され得る。他の例では、ウイルスは、ヘルパーフリーであり得る。例えば、ウイルスは、ヘルパーウイルスなしでベクターを増幅及びパッケージングすることができる。いくつかの例では、本明細書に記載のベクター系はまた、ウイルス増幅及びパッケージングに必要とされるウイルス成分をコードしてもよい。
【０１６４】
例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、約10^{12}～約10^{16}ｖｇ／ｍＬが挙げられる。他の例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、体重の約10^{12}～約10^{16}ｖｇ／ｋｇが挙げられる。
【０１６５】
アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、ヒト及び非ヒト霊長類（ＮＨＰ）を含む複数の種に固有である。現在までに、少なくとも１２種の天然血清型及び数百種の天然変異体が単離され、特徴付けられている。例えば、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．２１：２５５－２７２を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ＡＡＶ粒子は、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）ゲノムを含有する非エンベロープ二十面体タンパク質キャプシドから天然に構成される。ＤＮＡゲノ

ムには、ウイルスの複製起点及びパッケージングシグナルとして働く２つの逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接している。ｒｅｐ遺伝子は、ウイルス複製及びパッケージングに必要とされる４つのタンパク質をコードするが、ｃａｐ遺伝子は、ＡＡＶ血清型を規定する３つの構造的キャプシドサブユニット、及びいくつかの血清型においてビリオンアセンブリを促進するアセンブリ活性化タンパク質（ＡＡＰ）をコードする。

【０１６６】

組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）は、現在、遺伝子治療において使用される最も一般的に使用されるウイルスベクターの１つであり、治療用導入遺伝子を標的細胞にインビボで送達することによってヒト疾患を治療する。ｒＡＡＶベクターは、天然ＡＡＶに類似の二十面体キャプシドで構成されるが、ｒＡＡＶビリオンは、ＡＡＶタンパク質コード又はＡＡＶ複製配列をカプシドで包まない。これらのウイルスベクターは非複製性である。ｒＡＡＶベクターにおいて必要とされる唯一のウイルス配列は、２つのＩＴＲであり、これらは、ｒＡＡＶベクターの製造中にゲノム複製及びパッケージングを誘導するために必要とされる。ｒＡＡＶゲノムは、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠いており、インビボでそれらを非複製性にする。ｒＡＡＶベクターは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を、ＡＡＶ　ＩＴＲに隣接する意図された導入遺伝子カセットと組み合わせて、追加のウイルスヘルパータンパク質と共にトランスで発現させることによって生成される。

【０１６７】

ｒＡＡＶゲノムでは、遺伝子発現カセットは、ＩＴＲ配列の間に配置され得る。典型的には、ｒＡＡＶゲノムカセットは、導入遺伝子の発現を駆動するためのプロモーター、続いてポリアデニル化配列を含む。ｒＡＡＶ発現カセットに隣接するＩＴＲは、通常、単離され、組換えウイルスベクターに変換される最初の血清型であるＡＡＶ２に由来する。それ以来、ほとんどのｒＡＡＶ生成方法は、ＡＡＶ２Ｒｅｐベースのパッケージングシステムに依存している。例えば、Ｃｏｌｅｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．８：８７－１０４を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１６８】

組換えＡＡＶベクターの特定の血清型は、特定の組織に対するそのインビボ指向性に影響を及ぼす。ＡＡＶキャプシドタンパク質は、標的細胞への付着及び侵入を仲介し、続いてエンドソーム脱出及び核への輸送を担う。したがって、ｒＡＡＶベクターを開発する場合の血清型の選択は、どの細胞型及び組織にベクターがインビボで注射された場合に結合及び形質導入する可能性が最も高いかに影響を与える。ｒＡＡＶ８を含むｒＡＡＶのいくつかの血清型は、マウス、ＮＨＰ及びヒトにおいて全身的に送達された場合、肝臓に形質導入することができる。例えば、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．２１：２５５－２７２を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１６９】

核に入ると、ｓｓＤＮＡゲノムはビリオンから放出され、相補的ＤＮＡ鎖が合成されて二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）分子が生成される。二本鎖ＡＡＶゲノムは、それらのＩＴＲを介して自然に環状化し、染色体外で核内に存続するエピソームになる。したがって、エピソーム遺伝子療法プログラムのために、ｒＡＡＶ送達ｒＡＡＶエピソームは、非分裂細胞において長期のプロモーター駆動遺伝子発現を提供する。しかしながら、このｒＡＡＶ送達エピソームＤＮＡは、細胞が分裂するにつれて希釈される。対照的に、本明細書に記載の遺伝子療法は、長期の遺伝子発現を可能にする遺伝子挿入に基づく。

【０１７０】

ｓｓＤＮＡ　ＡＡＶゲノムは、２つのオープンリーディングフレーム、Ｒｅｐ及びＣａｐからなり、相補的ＤＮＡ鎖の合成を可能にする２つの逆位末端反復が隣接している。ＡＡＶトランスファープラスミドを構築する場合、導入遺伝子は、２つのＩＴＲの間に配置され、Ｒｅｐ及びＣａｐは、トランスで供給され得る。Ｒｅｐ及びＣａｐに加えて、ＡＡＶはアデノウイルスからの遺伝子を含有するヘルパープラスミドを必要とし得る。これら

の遺伝子（Ｅ４、Ｅ２ａ、及びＶＡ）はＡＡＶ複製を仲介する。例えば、トランスファープラスミド、Ｒｅｐ／Ｃａｐ、及びヘルパープラスミドをアデノウイルス遺伝子Ｅ１＋を含むＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトして、感染性ＡＡＶ粒子を生成し得る。代替的に、Ｒｅｐ、Ｃａｐ、及びアデノウイルスヘルパー遺伝子を組み合わせて単一のプラスミドとしてもよい。同様のパッケージングセル及び方法は、レトロウイルスなどの他のウイルスにも使用され得る。

【０１７１】

ＡＡＶの複数の血清型が同定されている。これらの血清型は、感染する細胞の種類（すなわち、それらの指向性）が異なり、特定の細胞型の優先的な形質導入を可能にする。ＡＡＶという用語は、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶｒｈ．６４Ｒ１、ＡＡＶｈｕ．３７、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．３２．３３、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－ＤＪ、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶＬＫ０３、ＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、及びそれらのハイブリッド、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、霊長類ＡＡＶ、非霊長類ＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶを含む。ＡＡＶの種々の血清型のゲノム配列、並びに天然末端反復（ＴＲ）、Ｒｅｐタンパク質、及びキャプシドサブユニットの配列は、当該技術分野で既知である。そのような配列は、文献又はＧｅｎＢａｎｋなどの公開データベースに見出すことができる。「ＡＡＶベクター」は、本明細書で使用される場合、ＡＡＶ起源ではない異種配列（すなわち、ＡＡＶに対して異種の核酸配列）を含むＡＡＶベクターを指し、典型的には、目的の異種ポリペプチドをコードする配列を含む。構築物は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶｒｈ．６４Ｒ１、ＡＡＶｈｕ．３７、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．３２．３３、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－ＤＪ、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶＬＫ０３、ＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、及びそれらのハイブリッド、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、霊長類ＡＡＶ、非霊長類ＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶキャプシド配列を含み得る。一般に、異種核酸配列（導入遺伝子）は、少なくとも１つ、及び一般に２つのＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）が隣接している。ＡＡＶベクターは、一本鎖（ｓｓＡＡＶ）又は自己相補的（ｓｃＡＡＶ）のいずれかであり得る。肝臓組織の血清型の例には、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶ－ＤＪ、及びＡＡＶｈｕ．３７が含まれ、特にＡＡＶ８が含まれる。具体的な例では、核酸構築物を含むＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）であり得る。本明細書に記載のｒＡＡＶ８ベクターは、キャプシドがＡＡＶ８由来であるベクターである。例えば、ＡＡＶ２由来のＩＴＲ及びＡＡＶ８のキャプシドを使用するＡＡＶベクターは、本明細書においてｒＡＡＶ８ベクターであるとみなされる。

【０１７２】

指向性は、キャプシド及び異なるウイルス血清型からのゲノムの混合である偽型付けによって更に洗練され得る。例えば、ＡＡＶ２／５は、血清型５のキャプシドにパッケージされた血清型２のゲノムを含むウイルスを示す。偽型ウイルスの使用は、形質導入効率を改善するだけでなく、指向性を変え得る。異なる血清型に由来するハイブリッドキャプシドはまた、ウイルスの指向性を改変するためにも使用され得る。例えば、ＡＡＶ－ＤＪは、８つの血清型からのハイブリッドキャプシドを含有しており、インビボで幅広い細胞型にわたって高い感染力を示す。ＡＡＶ－ＤＪ８は、ＡＡＶ－ＤＪの特性を示すが、脳への取り込みが増強された別の例である。ＡＡＶ血清型は、突然変異によっても修飾され得る。ＡＡＶ２の突然変異修飾の例には、Ｙ４４４Ｆ、Ｙ５００Ｆ、Ｙ７３０Ｆ、及びＳ６６２Ｖが含まれる。ＡＡＶ３の突然変異修飾の例には、Ｙ７０５Ｆ、Ｙ７３１Ｆ、及びＴ４９２Ｖが含まれる。ＡＡＶ６の突然変異修飾の例には、Ｓ６６３Ｖ及びＴ４９２Ｖが含まれる。他の偽型／修飾ＡＡＶ変異体には、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／６、ＡＡＶ２／７、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／９、ＡＡＶ２．５、ＡＡＶ８．２、及びＡＡＶ／ＳＡＳＴＧが含まれる。

【０１７３】
導入遺伝子の発現を加速するために、自己相補的ＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）変異体が使用され得る。ＡＡＶは細胞のＤＮＡ複製機構に依存して、ＡＡＶの一本鎖ＤＮＡゲノムの相補的鎖を合成するため、導入遺伝子の発現が遅れる可能性がある。この遅延に対処するために、感染時に自発的にアニーリングすることができる相補的配列を含むｓｃＡＡＶを使用することができ、宿主細胞のＤＮＡ合成の必要性を排除する。しかしながら、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターも使用され得る。
【０１７４】
パッケージング容量を増加させるために、長い導入遺伝子は、１つ目は３’スプライスドナー、２つ目は５’スプライスアクセプターである２つのＡＡＶトランスファープラスミドとの間で分割され得る。細胞の共感染時に、これらのウイルスはコンカテマーを形成し、一緒にスプライシングされ、完全長導入遺伝子を発現させ得る。これにより、より長い導入遺伝子の発現が可能になるが、発現の効率は低下する。容量を増加させるための同様の方法は、相同組換えを利用する。例えば、導入遺伝子は２つのトランスファープラスミドの間で分割され得るが、共発現が相同組換え及び完全長導入遺伝子の発現を誘導するように、実質的な配列の重複がある。
【０１７５】
Ｃ．ヌクレアーゼ剤及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系
本明細書に開示される方法及び組成物は、本明細書に開示される核酸構築物の挿入のために、クラスター化して規則的に散在する短回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）／ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）系、若しくは転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）系などのヌクレアーゼ剤、又はそのような系の成分を利用し、ゲノムセーフハーバー遺伝子座など標的遺伝子座内の標的ゲノム遺伝子座を修飾し得る。一般に、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ標的部位において二本鎖切断又はニック（すなわち、一本鎖切断）を誘導するための操作された切断系の使用を伴う。切断又はニッキングは、ヌクレアーゼ標的部位の特異的切断又はニッキングを誘導するための操作されたガイドＲＮＡを有する、操作されたＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系などの特異的ヌクレアーゼの使用を介して起こり得る。所望の標的配列においてニック又は二本鎖切断を誘導する任意のヌクレアーゼ剤が、本明細書に開示される方法及び組成物において使用され得る。ヌクレアーゼ剤を使用して、宿主ゲノム内の所望の遺伝子座（ゲノムセーフハーバー遺伝子座）に挿入の部位を作製し得、その部位に核酸構築物を挿入して目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）を発現させる。目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）は、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）が通常発現する遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座など、その挿入部位又は遺伝子座に関して外因性であり得る。
【０１７６】
一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系である。別の例では、ヌクレアーゼ剤は、１つ以上のＺＦＮを含む。更に別の例では、ヌクレアーゼ剤は、１つ以上のＴＡＬＥＮを含む。具体的な例では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系又はそのような系の成分は、細胞内の、本明細書の他の場所に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とする。より具体的な例では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系又はそのような系の成分は、細胞内の、本明細書に記載のＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、又はＬ－ＳＨ２０ゲノムセーフハーバー遺伝子座（例えば、ヒトＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、又はＬ－ＳＨ２０ゲノムセーフハーバー遺伝子座）を標的とする。より具体的な例では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系又はそのような系の成分は、細胞内の、本明細書に記載のヒトＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、又はＬ－ＳＨ２０ゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とする。具体的な例では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系又はそのような系の成分は、細胞内の、本明細書の他の場所に記載のマウスＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、又はＬ－ＳＨ２０ゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とする。
【０１７７】
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系には、Ｃａｓ遺伝子の発現に関与する、又はその活性を指示す

る転写物及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系、又はタイプＶ系（例えば、サブタイプＶ－Ａ又はサブタイプＶ－Ｂ）であり得る。本明細書に開示される方法及び組成物は、核酸の部位特異的結合又は切断のためにＣＲＩＳＰＲ複合体（Ｃａｓタンパク質と複合体を形成したガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む）を利用することによってＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を採用し得る。ゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、Ｃａｓタンパク質（又はＣａｓタンパク質をコードする核酸）及び１つ以上のガイドＲＮＡ（又は１つ以上のガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ）を含み、１つ以上のガイドＲＮＡの各々は、標的ゲノム遺伝子座における異なるガイドＲＮＡ標的配列を標的化する。

【０１７８】

本明細書に開示される組成物及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つ以上の成分が、それらの天然に存在する状態から改変若しくは変異されている、それらが自然界で天然に関連する少なくとも１つの他の成分を少なくとも実質的に含まない、又はそれらが天然に関連しない少なくとも１つの他の成分と関連するなどの、ヒトの手の関与を示す任意のものを含む。例えば、いくつかのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、天然に存在しないｇＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を一緒に含む天然に存在しないＣＲＩＳＰＲ複合体を用いる、天然に存在しないＣａｓタンパク質を用いる、又は天然に存在しないｇＲＮＡを用いる。

【０１７９】

（１）標的ゲノム遺伝子座

本明細の他の場所に記載のセーフハーバー遺伝子座など遺伝子を発現することができる、任意の標的ゲノム遺伝子座を使用することができる。本明細書で使用される標的ゲノム遺伝子座は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座であり得る。ゲノムセーフハーバー遺伝子座には、導入遺伝子又は他の外因性核酸インサートが、細胞の挙動又は表現型を明白に変えることなく（すなわち、宿主細胞に有害な影響を与えることなく）、目的の組織で安定かつ確実に発現できる染色体遺伝子座が含まれる。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、挿入された遺伝子配列の発現が、隣接する遺伝子からのリードスルー発現によって乱されない遺伝子座であり得る。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、内因性遺伝子の構造又は発現に悪影響を及ぼすことなく、外因性ＤＮＡが予測可能な方法で組み込まれて機能できる染色体遺伝子座を含み得る。ゲノムセーフハーバー遺伝子座を高効率で標的化することができ、セーフハーバー遺伝子座を明白な表現型を伴わずに破壊することができる。ゲノムセーフハーバー遺伝子座には、遺伝子外領域又は遺伝子内領域、例えば、必須ではない、不要な、又は明白な表現型の結果なしに破壊できる遺伝子内の遺伝子座を含めることができる。

【０１８０】

本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、肝臓機能を変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、アラニンアミノトランスフェラーゼ（アラニントランスアミナーゼ又はＡＬＴ）レベルを変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）レベルを変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、アルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）レベルを変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、体重を変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、肝臓など標的臓器などにおいて（例えば、Ｋｉ６７染色によって評価される）増殖を変化させないゲノム遺伝子座であり得る。本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、対象における組み込みのために標的化された場合、肝臓など標的器官などにおいて（例えば、Ｈ＆Ｅ

染色によって評価されるように）発癌性形質転換を引き起こさないゲノム遺伝子座であり得る。

【０１８１】

本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、外因性核酸インサートが肝臓において安定かつ確実に発現し得るように、肝臓においてオープンクロマチン構成を有するゲノム遺伝子座であり得る。あるいは、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、外因性核酸インサートが当該組織又は細胞型において安定かつ確実に発現し得るように、別の組織又は細胞型（例えば、造血幹細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、及び／又はマクロファージなどの造血細胞）においてオープンクロマチン構成を有するゲノム遺伝子座であり得る。

【０１８２】

本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座（すなわち、遺伝子の外側に存在する）であり得る。具体的な例では、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座は、肝臓においてオープンクロマチン構成を有する遺伝子外ゲノムセーフハーバー遺伝子座である。

【０１８３】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、任意のがん関連遺伝子から３００ｋｂ超（例えば、挿入発癌を防止するため）、任意のｍｉＲＮＡ又は低分子ＲＮＡから３００ｋｂ超（例えば、遺伝子発現及び細胞発生の調節を保存するため）、任意の遺伝子の５’末端から５０ｋｂ超（例えば、内因性遺伝子発現の撹乱を回避するため）、任意の複製起点から５０ｋｂ超、任意の超保存エレメント（例えば、ヒト、マウス、及びラットゲノムにおいて完全に保存されている非コード遺伝子内又は遺伝子間領域）から５０ｋｂ超、コピー数可変領域の外側、及びオープンクロマチン（例えば、ＡＴＡＣ－Ｓｅｑ分析によって決定される（例えば、ヒト肝臓生検サンプルにおいて））であるものであり得る。加えて、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、調節領域（例えば、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、及び／又はＨ３Ｋ４ｍｅ３マーカー）、ヘテロクロマチン領域（例えば、Ｈ３Ｋ９ｍｅ３マーカー）、又はクロマチン構成（例えば、ＣＴＣＦシグナル）に関与すると予測される領域と重複しないものであり得る。

【０１８４】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７（本明細書ではＬ－ＳＨ５と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２（本明細書ではＬ－ＳＨ１８と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３（本明細書ではＬ－ＳＨ２０と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。

【０１８５】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、以下のゲノム座標、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７（Ｌ－ＳＨ５に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）ヒト６番染色体の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２（Ｌ－ＳＨ１８に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３（Ｌ－ＳＨ２０に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類

）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１８６】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。シンテニー領域は、単一の祖先ゲノム領域に由来する。例えば、シンテニー領域は、異なる生物に由来し得、種分化に由来する。

【０１８７】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。

【０１８８】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。

【０１８９】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１９０】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１９１】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動

物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１９２】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ５と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ１８と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ２０と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。

【０１９３】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、以下のゲノム座標、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６（マウスＬ－ＳＨ５に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）マウス１７番染色体の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６（マウスＬ－ＳＨ１８に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２（マウスＬ－ＳＨ２０に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０１９４】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。シンテニー領域は、単一の祖先ゲノム領域に由来する。例えば、シンテニー領域は、異なる生物に由来し得、種分化に由来する。

【０１９５】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域

（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。
【０１９６】
別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。
【０１９７】
１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（マウス１４番染色体の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。
【０１９８】
別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（マウス１７番染色体の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。
【０１９９】
別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（マウス４番染色体の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。
【０２００】
（２）Ｃａｓタンパク質
Ｃａｓタンパク質は一般に、ガイドＲＮＡと相互作用することができる少なくとも１つのＲＮＡ認識又は結合ドメインを含む。Ｃａｓタンパク質はまた、ヌクレアーゼドメイン（例えば、ＤＮａｓｅドメイン又は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、及び他のドメインを含み得る。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。他のそのようなドメインを追加して、修飾Ｃａ

ｓタンパク質を作製し得る。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。切断は平滑末端又は付着末端を生成することができ、一本鎖又は二本鎖であってもよい。例えば、野生型Ｃａｓ９タンパク質は、典型的には、平滑切断産物を作製する。代替的に、野生型Ｃｐｆ１タンパク質（例えば、ＦｎＣｐｆ１）は、非標的化鎖におけるＰＡＭ配列から１８番目の塩基対の後及び標的化鎖における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製し得る（例えば、平滑末端を持つ二本鎖切断）、又は標的ゲノム遺伝子座で一本鎖切断を作製するニッカーゼであり得る。

【０２０１】

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又は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、及びＣｕ１９６６、並びにそれらのホモロジー又は修飾バージョンが含まれる。

【０２０２】

例示的なＣａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質又は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系からのものであり、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、及び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 ｓｐ．、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、Ｎｏｃａｒｄｉｏｐｓｉｓ ｄａｓｓｏｎｖｉｌｌｅｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｐｒｉｓｔｉｎａｅｓｐｉｒａｌｉｓ、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 ｓｐ．、Ｃｒｏｃｏｓｐｈａｅｒａ ｗａｔｓｏｎｉｉ、Ｃｙａｎｏｔｈｅｃｅ ｓｐ．、Ｍｉｃｒｏｃｙｓｔｉｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ａｃｅｔｏｈａｌｏｂｉｕｍ ａｒａｂａｔｉｃｕｍ、Ａｍｍｏｎｉｆｅｘ ｄｅｇｅｎｓｉｉ、Ｃａｌｄｉｃｅｌｕｌｏｓｉｒｕｐｔｏｒ ｂｅｃｓｃｉｉ、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｄｅｓｕｌｆｏｒｕｄｉｓ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ、Ｆｉｎｅｇｏｌｄｉａ ｍａｇｎａ、Ｎａｔｒａｎａｅｒｏｂｉｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｅｌｏｔｏｍａｃｕｌｕｍ ｔｈｅｒｍｏｐｒｏｐｉｏｎｉｃｕｍ、Ａｃｉｄｉｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｃａｌｄｕｓ、Ａｃｉｄｉｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｆｅｒｒｏｏｘｉｄａｎｓ、Ａｌｌｏｃｈｒｏｍａｔｉｕｍ ｖｉｎｏｓｕｍ、Ｍａｒｉｎｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ．、Ｎｉｔｒｏｓｏｃｏｃｃｕｓ ｈａｌｏｐｈｉｌｕｓ、Ｎｉｔｒｏｓｏｃｏｃｃｕｓ ｗａｔｓｏｎｉ、Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ ｈａｌｏｐｌａｎｋｔｉｓ、Ｋｔｅｄｏ

ｎｏｂａｃｔｅｒ ｒａｃｅｍｉｆｅｒ、Ｍｅｔｈａｎｏｈａｌｏｂｉｕｍ ｅｖｅｓｔｉｇａｔｕｍ、Ａｎａｂａｅｎａ ｖａｒｉａｂｉｌｉｓ、Ｎｏｄｕｌａｒｉａ ｓｐｕｍｉｇｅｎａ、Ｎｏｓｔｏｃ ｓｐ．、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｍａｘｉｍａ、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｐｌａｔｅｎｓｉｓ、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｓｐ．、Ｌｙｎｇｂｙａ ｓｐ．、Ｍｉｃｒｏｃｏｌｅｕｓ ｃｈｔｈｏｎｏｐｌａｓｔｅｓ、Ｏｓｃｉｌｌａｔｏｒｉａ ｓｐ．、Ｐｅｔｒｏｔｏｇａ ｍｏｂｉｌｉｓ、Ｔｈｅｒｍｏｓｉｐｈｏ ａｆｒｉｃａｎｕｓ、Ａｃａｒｙｏｃｈｌｏｒｉｓ ｍａｒｉｎａ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、又はＣａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ由来である。Ｃａｓ９ファミリーメンバーの追加の例は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１４／１３１８３３号に記載されている。化膿レンサ球菌からのＣａｓ９（ＳｐＣａｓ９）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ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。例示的なＳｐＣａｓ９タンパク質配列は、配列番号１（配列番号２に記載のＤＮＡ配列によってコードされている）に示されている。より小さなＣａｓ９タンパク質（例えば、ＳａＣａｓ９及びＣｊＣａｓ９及びＮｍｅ２Ｃａｓ９などのＣａｓ９及びガイドＲＮＡのガイドＲＮＡコード配列及び調節要素と組み合わせた場合にそのコード配列が最大ＡＡＶパッケージング容量と互換性があるＣａｓ９タンパク質）は、他の例示的なＣａｓ９タンパク質である。例えば、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ由来のＣａｓ９（ＳａＣａｓ９）（例えば、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。同様に、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ由来のＣａｓ９（ＣｊＣａｓ９）（例えば、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．Ｃｏｍｍｕｎ．８：１４５００を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ＳａＣａｓ９は、ＳｐＣａｓ９よりも小さく、ＣｊＣａｓ９は、ＳａＣａｓ９及び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、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。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又は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）又は代替ＰＡＭ（Ｅ１３６９Ｒ／Ｅ１４４９Ｈ／Ｒ１５５６Ａ置換）を認識するＲＨＡ Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｃａｓ９変異体は、他の例示的なＣａｓ９タンパク質である。これら及び他の例示的なＣａｓ９タンパク質は、例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｃｅｂｒｉａｎ－Ｓｅｒｒａｎｏ ａｎｄ Ｄａｖｉｅｓ（２０１７）Ｍａｍｍ．Ｇｅｎｏｍｅ ２８（７）：２４７－２６１を参照されたい。Ｃａｓ９コード配列、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ、及びＣａｓ９タンパク質配列の例は、国際公開第２０１３／１７６７７２号、国際公開第２０１４／０６５５９６号、国際公開第２０１６／１０６１２１号、国際公開第２０１９／０６７９１０号、国際公開第２０２０／０８２０４２号、米国特許出願公開第２０２０／０２７０６１７号、国際公開第２０２０／０８２０４１号、米国特許出願公開２０２０／０２６８９０６号、国際公開第２０２０／０８２０４６号、及び米国特許出願公開２０２０／０２８９６２８号に提供されており、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ＯＲＦ及びＣａｓ９アミノ酸配列の具体的な例は、国際公開第２０１９／０６７９１０号の段落［０４４９］の表３０に提供され、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びＯＲＦの具体的な例は、国際公開第２０１９／０６７９１０号の段落［０２１４］～［０２３４］に提供される。また、国際公開第２０２０／０８２０４６（Ａ２）号（ｐ

ｐ．８４－８５）及び国際公開第２０２０／０６９２９６号における表２４も参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２０３】

Ｃａｓタンパク質の別の例は、Ｃｐｆ１（プレボテラ（Prevotella）及びＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ １由来のＣＲＩＳＰＲ、Ｃａｓ１２ａ））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有する大きなタンパク質（約１３００個のアミノ酸）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インサートを含有するＣａｓ９とは対照的に、ＲｕｖＣ様ドメインは、Ｃｐｆ１配列において連続している。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ１６３（３）：７５９－７７１を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。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、Ａｃｉｄａｍｉｎｏ ｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎａｄａｉ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ ３、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ、及びＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅ由来のものである。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。

【０２０４】

Ｃａｓタンパク質の別の例は、ＣａｓＸ（Ｃａｓ１２ｅ）である。ＣａｓＸは、ＤＮＡ中に付着二本鎖切断を生成するＲＮＡ誘導型ＤＮＡエンドヌクレアーゼである。ＣａｓＸは、１０００未満のアミノ酸のサイズである。例示的なＣａｓＸタンパク質は、Ｄｅｌｔａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ（ＤｐｂＣａｓＸ又はＤｐｂＣａｓ１２ｅ）及びＰｌａｎｃｔｏｍｙｃｅｔｅｓ（ＰｌｍＣａｓＸ又はＰｌｍＣａｓ１２ｅ）由来である。Ｃｐｆ１と同様に、ＣａｓＸは、ＤＮＡ切断のために単一のＲｕｖＣ活性部位を使用する。例えば、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｎａｔｕｒｅ ５６６（７７４３）：２１８－２２３を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２０５】

Ｃａｓタンパク質の別の例は、ＣａｓΦ（ＣａｓＰｈｉ又はＣａｓ１２ｊ）であり、これはバクテリオファージにおいて特有に見出される。ＣａｓΦは、１０００未満のアミノ酸のサイズ（例えば、７００～８００のアミノ酸）である。ＣａｓΦ切断は、付着５’オーバーハングを生成する。ＣａｓΦにおける単一のＲｕｖＣ活性部位は、ｃｒＲＮＡプロセシング及びＤＮＡ切断が可能である。例えば、Ｐａｕｓｃｈ ｅｔ ａｌ．（２０２０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３６９（６５０１）：３３３－３３７を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２０６】

Ｃａｓタンパク質は、野生型タンパク質（すなわち、自然界で発生するもの）、修飾Ｃａｓタンパク質（すなわち、Ｃａｓタンパク質変異体）、又は野生型若しくは修飾Ｃａｓ

タンパク質の断片であり得る。Ｃａｓタンパク質はまた、野生型又は修飾Ｃａｓタンパク質の触媒活性に関して、活性な変異体又は断片であり得る。触媒活性に関する活性な変異体又は断片は、野生型若しくは修飾Ｃａｓタンパク質又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％、又はそれ以上の配列同一性を含み得、活性な変異体は、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又は二本鎖切断誘導活性を保持する。ニック誘導又は二本鎖切断誘導活性のためのアッセイは既知であり、一般に、切断部位を含有するＤＮＡ基質上のＣａｓタンパク質の全体的な活性及び特異性を測定する。

【０２０７】

修飾Ｃａｓタンパク質の一例は、修飾されたＳｐＣａｓ９－ＨＦ１タンパク質であり、これは、非特異的ＤＮＡ接触を減らすように設計された改変（Ｎ４９７Ａ／Ｒ６６１Ａ／Ｑ６９５Ａ／Ｑ９２６Ａ）を有するＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９の忠実度の高い変異体である。例えば、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｎａｔｕｒｅ ５２９（７５８７）：４９０－４９５を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。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させるように設計された修飾ｅＳｐＣａｓ９変異体（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、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。他のＳｐＣａｓ９変異体には、Ｋ８５５Ａ及びＫ８１０Ａ／Ｋ１００３Ａ／Ｒ１０６０Ａが含まれる。これら及びその他の修飾Ｃａｓタンパク質は、例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｃｅｂｒｉａｎ－Ｓｅｒｒａｎｏ及びＤａｖｉｅ（２０１７）Ｍａｍｍ．Ｇｅｎｏｍｅ ２８（７）：２４７－２６１を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。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配列を認識し得るＳｐＣａｓ９変異体である。例えば、Ｈｕ ｅｔ ａｌ．（２０１８）Ｎａｔｕｒｅ ５５６：５７－６３を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２０８】

Ｃａｓタンパク質は、核酸結合親和性、核酸結合特異性、及び酵素活性のうちの１つ以上を上昇又は低下させるように修飾され得る。Ｃａｓタンパク質はまた、安定性などの、タンパク質の他の活性又は特性を変更するように修飾され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質の１つ以上のヌクレアーゼドメインを修飾、欠失、又は不活性化することができる、あるいはＣａｓタンパク質を短縮して、タンパク質の機能に必須ではないドメインを除去する、又はＣａｓタンパク質の活性若しくは特性を最適化（例えば、増強又は低減）することができる。

【０２０９】

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。同様に、ＣａｓＸ及びＣａｓΦは、一般に、標的ＤＮＡの両方の鎖を切断する単一の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及びＨＮＨ様ヌクレアーゼドメインを含む。ＲｕｖＣドメイン及びＨＮＨドメインは各々、二本鎖ＤＮＡの異なる鎖を切断して、ＤＮＡに二本鎖切断を行い得る。例えば、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３７（６０９６）：８１６－８２１を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２１０】

もはや機能的でなくなるか、又は低減したヌクレアーゼ活性を低減するように、ヌクレアーゼドメインの１つ以上を欠失又は変異させ得る。例えば、Ｃａｓ９タンパク質でヌク

レアーゼドメインのうちの１つが欠失又は変異している場合、得られるＣａｓ９タンパク質はニッカーゼと称され得、二本鎖標的ＤＮＡ内で一本鎖切断を生成できるが、二本鎖切断は生成できない（すなわち、相補的鎖又は非相補的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）。Ｃａｓ９タンパク質でヌクレアーゼドメインのいずれも欠失又は変異していない場合、Ｃａｓ９タンパク質は二本鎖切断誘導活性を保持する。Ｃａｓ９をニッカーゼに変換する突然変異の例は、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９のＲｕｖＣドメインにおけるＤ１０Ａ（Ｃａｓ９の位置１０におけるアラニンからアスパラギン酸への）突然変異である。同様に、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９のＨＮＨドメインにおけるＨ９３９Ａ（アミノ酸位置８３９におけるヒスチジンからアラニンへ）、Ｈ８４０Ａ（アミノ酸位置８４０におけるヒスチジンからアラニン）、又はＮ８６３Ａ（アミノ酸位置Ｎ８６３におけるアスパラギンからアラニン）は、Ｃａｓ９をニッカーゼに変換することができる。Ｃａｓ９をニッカーゼに変換する突然変異の他の例としては、Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来のＣａｓ９に対する対応する突然変異が挙げられる。例えば、Ｓａｐｒａｎａｕｓｋａｓ ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３９（２１）：９２７５－９２８２及び国際公開第２０１３／１４１６８０号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような突然変異は、部位特異的変異誘発、ＰＣＲ媒介変異誘発、又は全遺伝子合成などの方法を使用して生成され得る。ニッカーゼを作製する他の突然変異の例は、例えば、国際公開第２０１３／１７６７７２号及び同第２０１３／１４２５７８号に見出すことができ、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２１１】

ｘＣａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例は、ＳｐＣａｓ９について上に記載されるものと同じである。Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９タンパク質の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も公知である。例えば、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９酵素（ＳａＣａｓ９）は、Ｃａｓニッカーゼを生成するために、位置Ｎ５８０での置換（例えば、Ｎ５８０Ａ置換）又は位置Ｄ１０での置換（例えば、Ｄ１０Ａ置換）を含んでもよい。例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１６／１０６２３６号を参照されたい。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又はＨ５８８Ａ）。Ｓｔ１Ｃａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である（例えば、Ｄ９Ａ、Ｄ５９８Ａ、Ｈ５９９Ａ、又はＮ６２２Ａ）。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又はＮ８７０Ａ）。ＣｊＣａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である（例えば、Ｄ８Ａ又はＨ５５９Ａの組み合わせ）。ＦｎＣａｓ９及びＲＨＡ ＦｎＣａｓ９の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である（例えば、Ｎ９９５Ａ）。

【０２１２】

Ｃｐｆ１タンパク質の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である。Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｕ１１２（ＦｎＣｐｆ１）、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ種ＢＶ３Ｌ６（ＡｓＣｐｆ１）、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６（ＬｂＣｐｆ１）、及びＭｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７（ＭｂＣｐｆ１ Ｃｐｆ１）由来のＣｐｆ１タンパク質に関して、そのような突然変異は、ＡｓＣｐｆ１の位置９０８、９９３又は１２６３あるいはＣｐｆ１オルソログ中の対応する位置、あるいはＬｂＣｐｆ１の位置８３２、９２５、９４７又は１１８０あるいはＣｐｆ１オルソログ中の対応する位置における突然変異を含み得る。そのような突然変異は、例えば、ＡｓＣｐｆ１の突然変異Ｄ９０８Ａ、Ｅ９９３Ａ、及びＤ１２６３Ａ若しくはＣｐｆ１オルソログにおける対応する突然変異、又はＬｂＣｐｆ１のＤ８３２Ａ、Ｅ９２５Ａ、Ｄ９４７Ａ、及びＤ１１８０Ａ若しくはＣｐｆ１オルソログにおける対応する突然変異のうちの１つ以上を含み得る。例えば、全ての目的のためにその全体

が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１６／０２０８２４３号を参照されたい。

【０２１３】

ＣａｓＸタンパク質の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である。Ｄｅｌｔａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ由来のＣａｓＸタンパク質に関して、Ｄ６７２Ａ、Ｅ７６９Ａ、及びＤ９３５Ａ（個々に又は組み合わせて）又は他のＣａｓＸオルソログにおける対応する位置は、不活性化されている。例えば、Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１９）Ｎａｔｕｒｅ　５６６（７７４３）：２１８－２２３を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２１４】

ＣａｓΦタンパク質の触媒ドメインにおける不活性化突然変異の例も既知である。例えば、Ｄ３７１Ａ及びＤ３９４Ａは、単独で又は組み合わせて、不活性化突然変異である。例えば、Ｐａｕｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３６９（６５０１）：３３３－３３７を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２１５】

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、Ｃａｓタンパク質を切断ドメインに融合させ得る。全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１４／０８９２９０号を参照されたく、Ｃａｓタンパク質はまた、安定性の上昇又は低下を提供する異種ポリペプチドに融合させることができる。融合ドメイン又は異種ポリペプチドは、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＣａｓタンパク質内に内部的に位置し得る。

【０２１６】

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せ得る。そのような異種ポリペプチドは、例えば、核を標的とするための単一部分ＳＶ４０　ＮＬＳ及び／又は二部分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保持シグナルなどを含み得る。例えば、Ｌａｎｇｅ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８２（８）：５１０１－５１０５を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような細胞内局在化シグナルは、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＣａｓタンパク質内のどこにでも配置され得る。ＮＬＳは、一続きの塩基性アミノ酸を含むことができ、単一部分配列又は二部分配列であり得る。任意選択的に、Ｃａｓタンパク質は、Ｎ末端にＮＬＳ（例えば、αインポーチンＮＬＳ又は単一部分ＮＬＳ）及びＣ末端にＮＬＳ（例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ又は二部分ＮＬＳ）を含む２つ以上のＮＬＳを含み得る。Ｃａｓタンパク質はまた、Ｎ末端に２つ以上のＮＬＳ及び／又はＣ末端に２つ以上のＮＬＳを含み得る。

【０２１７】

Ｃａｓタンパク質は、例えば、１～１０個のＮＬＳと融合され得る（例えば、１～５つのＮＬＳと融合される、１つのＮＬＳと融合され得る）。１つのＮＬＳが使用される場合、ＮＬＳは、ＣａｓタンパクＮ末端又はＣ末端で連結されてもよい。ＮＬＳはまた、Ｃａｓタンパク質配列内に挿入されてもよい。代替的に、Ｃａｓタンパク質は、２つ以上のＮＬＳと融合されてもよい。例えば、Ｃａｓタンパク質は、２、３、４、又は５つのＮＬＳと融合されてもよい。具体的な例では、Ｃａｓタンパク質は、２つのＮＬＳと融合されてもよい。特定の状況では、２つのＮＬＳは、同じ（例えば、２つのＳＶ４０　ＮＬＳ）又は異なっていてもよい。例えば、Ｃａｓタンパク質は、カルボキシ末端で連結された２つのＳＶ４０　ＮＬＳ配列に融合され得る。代替的に、Ｃａｓタンパク質は、２つのＮＬＳと融合され、１つはＮ末端で、１つはＣ末端で連結されてもよい。他の例では、Ｃａｓタンパク質は、３つのＮＬＳと融合され得る、又はＮＬＳなしで融合され得る。ＮＬＳは、例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号３）又はＰＫＫＫＲＲＶ（配列番号４）などの単一部分配列であり得る。ＮＬＳは、ヌクレオプラスミンのＮＬＳ

、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号５）などの二部分配列であり得る。具体的な例では、単一のＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号３）ＮＬＳは、Ｃａｓタンパク質のＣ末端で連結され得る。１つ以上のリンカーは、融合部位に任意選択的に含まれる。

【０２１８】

Ｃａｓタンパク質はまた、細胞透過性ドメイン又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型肝炎ウイルス由来のＴＬＭ細胞透過性モチーフ、ＭＰＧ、Ｐｅｐ－１、ＶＰ２２、単純ヘルペスウイルス由来の細胞透過性ペプチド、又はポリアルギニンペプチド配列に由来し得る。例えば、国際公開第２０１４／０８９２９０号及び同第２０１３／１７６７７２号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。細胞透過性ドメインは、Ｎ末端、Ｃ末端、又はＣａｓタンパク質内のどこにでも位置し得る。

【０２１９】

Ｃａｓタンパク質はまた、追跡又は精製を容易にするために、蛍光タンパク質、精製タグ、又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）、及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（glutathione-S-transferase、ＧＳＴ）、キチン結合タンパク質（chitin binding protein、ＣＢＰ）、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン（thioredoxin、ＴＲＸ）、ポリ（ＮＡＮＰ）、タンデムアフィニティー精製（tandemaffinity purification、ＴＡＰ）タグ、ｍｙｃ、ＡｃＶ５、ＡＵ１、ＡＵ５、Ｅ、ＥＣＳ、Ｅ２、ＦＬＡＧ、ヘマグルチニン（hemagglutinin、ＨＡ）、ｎｕｓ、Ｓｏｆｔａｇ　１、Ｓｏｆｔａｇ　３、Ｓｔｒｅｐ、ＳＢＰ、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ、ＨＳＶ、ＫＴ３、Ｓ、Ｓ１、Ｔ７、Ｖ５、ＶＳＶ－Ｇ、ヒスチジン（histidine、Ｈｉｓ）、ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質（biotincarboxyl carrier protein、ＢＣＣＰ）、及びカルモジュリンが含まれる。

【０２２０】

Ｃａｓタンパク質はまた、標識された核酸にテザリングされ得る。そのようなテザリング（すなわち、物理的連結）は、共有相互作用若しくは非共有相互作用を介して達成され得、テザリングは、直接（例えば、タンパク質又はインテイン修飾上のシステイン又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又は化学的結合を介して）、又はストレプトアビジン若しくはアプタマーなどの１つ以上の介在するリンカー又はアダプター分子を介して達成され得る。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　ａ

ｌ．（２００９）Ｃｈｅｍｂｉｏｃｈｅｍ．１０（９）：１５５１－１５５７、及びＫｈａｔｗａｎｉ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２０（１４）：４５３２－４５３９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。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及びニッケル－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、リジンアミン又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又は触媒若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又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、及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タンパク質のＣ末端、Ｎ末端、又は内部領域にテザリングされ得る。一例では、標識された核酸は、Ｃａｓタンパク質のＣ末端又はＮ末端にテザリングされる。同様に、Ｃａｓタンパク質は、標識された核酸の５’末端、３’末端、又は内部領域にテザリングされ得る。すなわち、標識された核酸は、任意の向き及び極性でテザリングされ得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、標識された核酸の５’末端又は３’末端にテザリングされ得る。

【０２２１】

Ｃａｓタンパク質は、任意の形態で提供され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、ｇＲＮＡと複合体を形成したＣａｓ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、Ｃａｓタンパク質は、ＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））又はＤＮＡなどの、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸の形態で提供され得る。任意選択的に、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞又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され得る。例えば、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、細菌細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、又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修飾され得る。Ｃａｓタンパク質をコードする核酸が細胞に導入されると、Ｃａｓタンパク質は、一過性に、条件付きで、又は構成的に細胞内で発現され得る。

【０２２２】

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、細胞内で活性のあるプロモーターに作動可能に連結され得る。代替的に、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、遺伝子又は他の目的の核酸配列（例えば、Ｃａｓ遺伝子）の発現を指示することができ、そのような目的の核酸配列を標的細胞に移入することができる任意の核酸構築物を含む。例えば、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、核酸は、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡを含むベクターとは別個であるベクター又はプラスミド内にあり得る。発現構築物において使用され得るプロモーターとしては、例えば、ヒト細胞、ヒト肝臓細胞、又はヒト肝細胞において活性なプロモーターが挙げられる。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、又は組織特異的プロモーターであり得る。任意選択的に、プロモーターは、一方向のＣａｓタンパク質及び他の方向のガイド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。そのような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）、及び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、並びに（２）ＤＳＥの５’末端に逆方向に融合されたＰＳＥ及びＴＡＴＡボックスを含む第２の基本的なＰｏｌ ＩＩＩプロモーターからなり得る。例えば、Ｈ１プロモーターでは、ＤＳＥはＰＳＥ及び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及び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、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１６／００７４５３５号を参照されたい。双方向プロモーターを使用してＣａｓタンパク質及びガイド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を可能にする。好ましい実施形態では、プロモーターは、ヒトにおける使用について規制当局によって承認されている。特定の実施形態では、プロモーターは、肝臓細胞における発現を駆動する。

【０２２３】

様々なプロモーターを使用して、Ｃａｓ発現又はＣａｓ９発現を駆動できる。いくつかの方法では、Ｃａｓ又はＣａｓ９コード配列がＡＡＶ構築物に適合することができるように小さなプロモーターが使用される。例えば、Ｃａｓ又はＣａｓ９及び１つ以上のｇＲＮＡ（例えば、１つのｇＲＮＡ又は２つのｇＲＮＡ又は３つのｇＲＮＡ又は４つのｇＲＮＡ）は、ＬＮＰ媒介送達（例えば、ＲＮＡの形態）又はアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介送達（例えば、ＡＡＶ８媒介送達）を介して送達することができる。例えば、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９であってもよく、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ（例えば、本明細書に記載のヒトＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、又はＬ－ＳＨ２０ゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とする）は、ＬＮＰ媒介送達又はＡＡＶ媒介送達を介して送達され得る。例えば、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９であってもよく、Ｃａｓ９ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡ（例えば、本明細書に記載のマウスＬ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、又はＬ－ＳＨ２０ゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とする）は、ＬＮＰ媒介送達又はＡＡＶ媒介送達を介して送達され得る。Ｃａｓ又はＣａｓ９及びｇＲＮＡ（複数可）は、単一のＡＡＶにおいて、又は２つの別個のＡＡＶを介して送達され得る。例えば、第１のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセットを担持し得、第２のＡＡＶは、ｇＲＮＡ発現カセットを担持し得る。同様に、第１のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセットを担持し、第２のＡＡＶは、２つ以上のｇＲＮＡ発現カセットを担持し得る。代替的に、単一のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたＣａｓ又はＣａｓ９コード配列）及びｇＲＮＡ発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたｇＲＮＡコード配列）を担持し得る。同様に、単一のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたＣａｓ又はＣａｓ９コード配列）及び２つ以上のｇＲＮＡ発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたｇＲＮＡコード配列）を担持し得る。Ｕ６プロモーター又は小さなｔＲＮＡ　Ｇｌｎなど、様々なプロモーターを使用してｇＲＮＡの発現が駆動され得る。同様に、Ｃａｓ９の発現を駆動するために様々なプロモーターが使用され得る。例えば、Ｃａｓ９コード配列がＡＡＶ構築物に適合することができるように小さなプロモーターが使用される。同様に、小さなＣａｓ９タンパク質（例えば、ＳａＣａｓ９又はＣｊＣａｓ９を使用して、ＡＡＶパッケージング容量を最大化する）。

【０２２４】

ｍＲＮＡとして提供されるＣａｓタンパク質は、安定性及び／又は免疫原性の特性を改善するために修飾され得る。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。Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡもキャップされ得る。Ｃａｓ　ｍＲＮＡは、ポリアデニル化（ポリＡ又はポリ（Ａ）又はポリアデニン）テールを更に含み得る。例えば、Ｃａｓ　ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡ内の１つ以上のヌクレオシドに対する修飾を含み得、Ｃａｓ　ｍＲＮＡはキャップされ得、Ｃａｓ　ｍＲＮＡはポリ（Ａ）テールを含み得る。

【０２２５】

（３）ガイドＲＮＡ

「ガイドＲＮＡ」又は「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、２つのセグメント：「ＤＮＡ標的化セグメント」（「ガイド配列」とも呼ばれる）及び「タンパク質結合セグメント」を含み得る。「セグメント」は

、分子のセクション又は領域、例えば、ＲＮＡ中のヌクレオチドの連続範囲を含む。Ｃａｓ９についてのものなどのいくつかのｇＲＮＡは、２つの別個のＲＮＡ分子：「アクチベーターＲＮＡ」（例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ）及び「ターゲッターＲＮＡ」（例えば、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ又はｃｒＲＮＡ）を含み得る。他のｇＲＮＡは、単一のＲＮＡ分子（単一のＲＮＡポリヌクレオチド）であり、これは「単一分子ｇＲＮＡ」、「単一ガイドＲＮＡ」、又は「ｓｇＲＮＡ」とも呼ばれ得る。例えば、国際公開第２０１３／１７６７７２号、国際公開第２０１４／０６５５９６号、国際公開第２０１４／０８９２９０号、国際公開第２０１４／０９３６２２号、国際公開第２０１４／０９９７５０号、国際公開第２０１３／１４２５７８号、及び国際公開第２０１４／１３１８３３号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ガイドＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）又はｃｒＲＮＡとトランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）との組み合わせのいずれかを指し得る。ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、単一のＲＮＡ分子（単一ガイドＲＮＡ又はｓｇＲＮＡ）として、又は２つの別個のＲＮＡ分子（二重ガイドＲＮＡ又はｄｇＲＮＡ）において関連付けられ得る。例えば、Ｃａｓ９の場合、単一ガイドＲＮＡは、（例えば、リンカーを介して）ｔｒａｃｒＲＮＡに融合されたｃｒＲＮＡを含み得る。例えば、Ｃｐｆ１及びＣａｓΦの場合、標的配列への結合を達成するために必要なのはｃｒＲＮＡだけである。「ガイドＲＮＡ」及び「ｇＲＮＡ」という用語は、二重分子（すなわち、モジュラー）ｇＲＮＡ及び単一分子ｇＲＮＡの両方を含む。本明細書に開示される方法及び組成物のうちのいくつかでは、ｇＲＮＡは、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９　ｇＲＮＡ又はその同等物である。本明細書に開示される方法及び組成物のうちのいくつかでは、ｇＲＮＡは、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９　ｇＲＮＡ又はその同等物である。

【０２２６】

例示的な２分子ｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ様（「ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」又は「ターゲッターＲＮＡ」又は「ｃｒＲＮＡ」又は「ｃｒＲＮＡリピート」）分子及び対応するｔｒａｃｒＲＮＡ様（「トランス活性化ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」又は「アクチベーターＲＮＡ」又は「ｔｒａｃｒＲＮＡ」）分子を含む。ｃｒＲＮＡは、ｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント（一本鎖）、及び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テール（例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９と共に使用するため）の例は、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵ（配列番号６）又はＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＵＵＵＵＧ（配列番号７）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。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６又は７の５’末端に結合して、ｃｒＲＮＡを形成することができる。

【０２２７】

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二重鎖の他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（例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９と共に使用するため）の例は、ＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵ（配列番号８）、ＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ（配列番号９）、又はＧＵＵＧＧＡＡＣＣＡＵＵＣＡＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（配列番号１０）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、又はそれからなる。

【０２２８】

ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの両方が必要とされる系では、ｃｒＲＮＡ及び対応するｔｒａｃｒＲＮＡは、ハイブリダイズしてｇＲＮＡを形成する。ｃｒＲＮＡのみが必要な系では、ｃｒＲＮＡはｇＲＮＡであり得る。ｃｒＲＮＡは追加的に、標的ＤＮＡの相補的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する場合、所与のｃｒＲＮＡ又は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、及びＣｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３９（６１２１）：８１９：８２３を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２２９】

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するように、標的ＤＮＡの相補的鎖上の配列に相補的である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動し、ｇＲＮＡ及び標的ＤＮＡが相互作用する標的ＤＮＡ内の位置を決定することができる。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。天然に存在するｃｒＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系及び生物に応じて異なるが、２１～４６ヌクレオチド長の２つの直接反復（direct repeat、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有することが多い（例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１４／１３１８３３号を参照されたい）。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に相補的であり、ハイブリダイズし、これが次に、Ｃａｓタンパク質に結合する。

【０２３０】

ＤＮＡ標的化セグメントは、例えば、少なくとも約１２、少なくとも約１５、少なくとも約１７、少なくとも約１８、少なくとも約１９、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、又は少なくとも約４０のヌクレオチド長を有し得る。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、又は約１２～約２０ヌクレオチド長を有し得る。例えば、ＤＮＡ標的化セグメントは、約１５～約２５個のヌクレオチド（例えば、約１７～約２０個のヌクレオチド、又は約１７個、１８個、１９個、若しくは２０個のヌクレオチド）であり得る。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００２４５２３号を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９の場合、典的なＤＮＡ標的化セグメントは、１６～２０ヌクレオチド長、又は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ヌクレオチド長又は少なくとも１８ヌクレオチド長である。

【０２３１】

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、より短い配列及びより長い配列も標的化セグメントに使用することができる（例えば、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、又は２５ヌクレオチド長などの、１５～２５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（又は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

％、又は１００％であり得る。ＤＮＡ標的化セグメント及び対応するガイド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標的化セグメント及び対応するガイドＲＮＡ標的配列には、１～４、１～３、１～２、１、２、３、又は４つのミスマッチが含まれ得る（例えば、ガイドＲＮＡ標的配列の全長が、少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個以上のヌクレオチドである）。例えば、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント及び対応するガイドＲＮＡ標的配列には、ガイドＲＮＡ標的配列の全長が、２０ヌクレオチドである、１～４、１～３、１～２、１、２、３、又は４つのミスマッチが含まれ得る。

【０２３２】

一例として、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、４５～４７、及び２２８～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、４５～４７、及び２２８～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、４５～４７、及び２２８～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、４５～４７、及び２２８～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、４５～４７、及び２２８～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、４５～４７、及び２２８～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、４５～４７、及び２２８～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、４５～４７、及び２２８～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２３３】

一例として、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー

遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続するヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチド（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２３４】

一例として、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７及び４５～４７のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。一例として、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７及び４５～４７のうちのいずれか１つに記載の配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチド（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７及び４５～４７のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、及び４５～４７のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフ

ハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、及び４５～４７のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、及び４５～４７のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、及び４５～４７のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５～２７、及び４５～４７のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２３５】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌク

レオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、及び２２８～２５６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２３６】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５、４５、２３５、２３７、及び２４６のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２３７】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５又は４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化

セグメント）を含む、それから本質的になる、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５又は４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５又は４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５又は４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５又は４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して

少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５又は４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５又は４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５又は４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４５に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２３８】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～３４４のうちのい

ずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～３４４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～３４４のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～３４４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～３４４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～３４４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１５～３４４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２３９】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウス

Ｌ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３１８、３２０、３２１、及び３４１のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２４０】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列

番号２６、４６、及び２５７～２８５のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、及び２５７～２８５のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２４１】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６、４６、２６８、２７１、及び２８０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグ

メント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２４２】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６又は４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含む、それから本質的になる、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６又は４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６又は４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６又は４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１

０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６又は４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６又は４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６又は４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２６又は４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替

的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４６に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２４３】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４５～３７４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４５～３７４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４５～３７４のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ５（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４５～３７４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４５～３７４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４５～３７４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２４４】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８

７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３４７、３６０、３６９、及び３７０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２４５】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のう

ちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、及び２８６～３１４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２４６】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のいずれか１つに記載の配

列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７、４７、２８８、２９６、３０５、３０６、及び３１０のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２４７】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７又は４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含む、それから本質的になる、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７又は４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７又は４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２

０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７又は４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７又は４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７又は４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７又は４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７又は

４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４７に記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２４８】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７５～４０４のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７５～４０４のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチ

ド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２４９】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメント（すなわち、ガイド配列）を含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを含むか、本質的にそれからかなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）に対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一であるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３７９、３８０、及び３８８のうちのいずれか１つに記載の配列（ＤＮＡ標的化セグメント）の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドと３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２５０】

ＴｒａｃｒＲＮＡは、任意の形態（例えば、完全長ｔｒａｃｒＲＮＡ又は活性部分ｔｒａｃｒＲＮＡ）であり得、様々な長さのものであり得る。それらには、一次転写物又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、又は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個、２６個、３２個、４５個、４８個、５４個、６３個、６７個、８５個、又はそれ以上のヌクレオチド）の全て又は一部を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来の野生型ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の例としては、１７１ヌクレオチド、８９ヌクレオチド、

７５ヌクレオチド、及び６５ヌクレオチドのバージョンが挙げられる。例えば、Ｄｅｌｔｃｈｅｖａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｎａｔｕｒｅ　４７１（７３４０）：６０２－６０７、国際公開第２０１４／０９３６６１号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）内のｔｒａｃｒＲＮＡの例には、ｓｇＲＮＡの＋４８、＋５４、＋６７、及び＋８５バージョン内に見出されるｔｒａｃｒＲＮＡセグメントが含まれ、ここで、「＋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。全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第８，６９７，３５９号を参照されたい。

【０２５１】

ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補的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％、又は１００％）であり得る。ＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補的鎖との間の相補性パーセントは、約２０個の連続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の相補的鎖との間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補的鎖の５’末端における１４個の連続ヌクレオチドにわたって１００％であってもよく、残りの部分にわたって０％と低くてもよい。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の相補的鎖との間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補的鎖の５’末端における７個の連続ヌクレオチドにわたって１００％であってもよく、残りの部分にわたって０％まで低くてもよい。そのような場合、ＤＮＡ標的化セグメントは、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個のヌクレオチドが標的ＤＮＡの相補的鎖に相補的である。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の相補的鎖との１、２、又は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（protospacer adjacent motif、ＰＡＭ）配列に対応する相補的鎖（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’末端におけるか、又はミスマッチは、ＰＡＭ配列に対応する相補的鎖の領域から、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、若しくは１９塩基対離れている）。

【０２５２】

ｇＲＮＡのタンパク質結合セグメントは、互いに相補的である２つのヌクレオチド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。対象の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指向する。

【０２５３】

単一ガイドＲＮＡは、ＤＮＡ標的化セグメント及び足場配列（すなわち、ガイドＲＮＡのタンパク質結合又はＣａｓ結合配列）を含み得る。例えば、そのようなガイド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し得る。例示的な足場配列（例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９と共に使用するための）は、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵ（バージョン１、配列番号１１）、ＧＵＵＧＧＡＡＣＣＡＵＵＣＡＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン２、配列番号１２）、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン３、配列番号１３）、及びＧＵＵ

ＵＡＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＧＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＵＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン４、配列番号１４）、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵＵＵＵ（バージョン５、配列番号１５）、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ（バージョン６、配列番号１６）、ＧＵＵＵＡＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＧＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＵＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵＵＵＵ（バージョン７、配列番号１７）、又はＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン８、配列番号１８）を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるいくつかのガイドｓｇＲＮＡでは、バージョン６の４つの末端Ｕ残基が存在しない。いくつかのガイドｓｇＲＮＡでは、バージョン６の４つの末端Ｕ残基のうちの１つ、２つ、又は３つしか存在しない。本明細書に開示されるガイドＲＮＡ標的配列のいずれかを標的とするガイドＲＮＡは、例えば、ガイドＲＮＡの３’末端における例示的なガイドＲＮＡ足場配列のいずれかに融合されたガイドＲＮＡの５’末端における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かは、上記の足場配列のいずれかの５’末端に結合して、単一ガイドＲＮＡ（キメラガイドＲＮＡ）を形成し得る。

【０２５４】

ガイドＲＮＡは、追加の望ましい特徴（例えば、修飾又は調節された安定性、細胞内標的化、蛍光標識を用いた追跡、タンパク質又はタンパク質複合体の結合部位など）を提供する修飾又は配列を含み得る。すなわち、ガイドＲＮＡは、１つ以上の修飾ヌクレオシド若しくはヌクレオチド、又は標準Ａ、Ｇ、Ｃ、及びＵ残基の代わりに、若しくはそれに加えて使用される１つ以上の非天然及び／若しくは天然に存在する成分若しくは構成を含み得る。そのような修飾の例としては、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’ポリアデニル化テール（すなわち、３’ポリ（Ａ）テール）、リボスイッチ配列（例えば、タンパク質及び／又はタンパク質複合体による調節された安定性及び／又は調節されたアクセス可能性を可能にするため）、安定性制御配列、ｄｓＲＮＡ二重鎖（すなわち、ヘアピン）を形成する配列、ＲＮＡに細胞内位置（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体など）を標的とさせる修飾若しくは配列、追跡を提供する修飾若しくは配列（例えば、蛍光分子への直接結合、蛍光検出を容易にする部分への結合、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、転写抑制因子、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ、ＤＮＡデメチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼなどを含む、ＤＮＡに作用するタンパク質）の結合部位を提供する修飾若しくは配列、又はそれらの組み合わせが挙げられる。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’、又はそれらの任意の組み合わせが含まれる。例えば、米国特許出願公開第２０１５／０３７６５８６号を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。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、二重鎖の一方の側に、Ｘが任意のプリンであり、Ｙが反対側の鎖上のヌクレオチドとゆらぎ対を形成することができるヌクレオチドであり得る、対になっていない５’－ＸＸＸＹ－３’、及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み得る。

【０２５５】

ガイドＲＮＡは、例えば、以下、すなわち、（１）ホスホジエステル骨格結合における非連結リン酸酸素の一方若しくは両方及び／又は連結リン酸酸素の１つ以上の改変又は置換（例示的な骨格修飾）、（２）リボース糖の構成要素の改変又は置換、例えば、リボース糖上の２’ヒドロキシルの改変又は置換（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、大規模置換（例示的な骨格修飾）、（４）非標準核酸塩基によるものを含む、天然に存在する核酸塩基の修飾又は置換（例示的な塩基修飾）、（５）リボース－リン酸骨格の置換又は修飾（例示的な骨格修飾）、（６）オリゴヌクレオチドの３’末端又は５’末端の修飾（例えば、末端リン酸基の除去、修飾若しくは置換、又は部分、キャップ若しくはリンカーの結合（このような３’又は５’キャップ修飾は、糖及び／又は骨格修飾を含み得る）、並びに（７）糖の修飾又は置換（例示的な糖修飾）の１つ以上など修飾ヌクレオシド及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、ウラシル又はポリ－ウラシルトラクトの修飾又は置換が含まれる。例えば、国際公開第２０１５／０４８５７７号及び米国特許出願公開第２０１６／０２３７４５５号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。同様の修飾が、Ｃａｓ　ｍＲＮＡなどのＣａｓコード核酸に行われ得る。例えば、Ｃａｓ　ｍＲＮＡは、同義の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。

【０２５６】

上に列挙されるものなどの化学修飾を組み合わせて、２つ、３つ、４つ、又はそれ以上の修飾を有することができる残基（ヌクレオシド及びヌクレオチド）を含む修飾ｇＲＮＡ及び／又はｍＲＮＡを提供し得る。例えば、修飾残基は、修飾された糖及び修飾された核酸塩基を有し得る。一例では、ｇＲＮＡの全ての塩基が修飾されている（例えば、全ての塩基は、ホスホロチオエート基などの修飾リン酸基を有する）。例えば、ｇＲＮＡの全て又は実質的に全てのリン酸基が、ホスホロチオエート基で置換され得る。代替的又は追加的に、修飾ｇＲＮＡは、５’末端又はその近くに少なくとも１つの修飾残基を含み得る。代替的又は追加的に、修飾ｇＲＮＡは、３’末端又はその近くに少なくとも１つの修飾残基を含み得る。

【０２５７】

いくつかのｇＲＮＡは、１つ、２つ、３つ、又はそれ以上の修飾残基を含む。例えば、修飾ｇＲＮＡにおける少なくとも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％、又は１００％の位置は、修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドであり得る。

【０２５８】

未修飾核酸は、分解されやすい可能性がある。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、免疫原性を低減させるのに役立ち得る。本明細書に記載のいくつかのｇＲＮＡは、細胞内又は血清ベースの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又はヌクレオチドを含み得る。本明細書に記載のいくつかの修飾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す可能性がある。

【０２５９】

二重ガイドＲＮＡでは、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの各々に修飾を含み得る。そのような修飾は、ｃｒＲＮＡ及び／又はｔｒａｃｒＲＮＡの一端又は両端にあってもよい。ｓｇＲＮＡでは、ｓｇＲＮＡの一端又は両端の１つ以上の残基が化学的に修飾されていてもよく、及び／又は内部ヌクレオシドが修飾されていてもよく、及び／又はｓｇＲＮＡ全体が化学的に修飾されていてもよい。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。いくつかのｇＲＮＡは、５’末端修飾及び３’末端修飾を含む。

【０２６０】

本明細書に開示されるガイドＲＮＡは、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１８／１０７０２８（Ａ１）号に開示される修飾パターンのうちの１つを含み得る。本明細書に開示されるガイドＲＮＡはまた、全ての目的

のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１７／０１１４３３４号に開示される構造／修飾パターンのうちの１つを含み得る。本明細書に開示されるガイドＲＮＡはまた、国際公開第２０１７／１３６７９４号、国際公開第２０１７／００４２７９号、米国特許出願公開第２０１８／０１８７１８６号、又は米国特許出願公開第２０１９／００４８３３８号に開示される構造／修飾パターンのうちの１つを含むことができ、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２６１】

一例として、本明細書に記載のガイドＲＮＡのいずれかは、少なくとも１つの修飾を含み得る。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（ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ、ＰＳ）結合、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチド、又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。代替的又は追加的に、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。代替的又は追加的に、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）修飾ヌクレオチド及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。

【０２６２】

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及びｔｒａｃｒＲＮＡ）又は１つの分子（ｓｇＲＮＡ）のいずれかとしてＲＮＡの形態で、及び任意選択的に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）又は別個のＲＮＡ分子（例えば、別個のｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードし得る。後者の場合、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、１つのＤＮＡ分子として、又はそれぞれｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡをコードする別個のＤＮＡ分子として提供され得る。

【０２６３】

ｇＲＮＡがＤＮＡの形態で提供される場合、ｇＲＮＡは、一過性、条件付き、又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、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸などの異種核酸を含むベクター内にあり得る。代替的に、それは、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸を含むベクターとは別個のベクター又はプラスミドであり得る。そのような発現構築物において使用され得るプロモーターとしては、例えば、ヒト細胞、ヒト肝臓細胞、又はヒト肝細胞において活性なプロモーターが挙げられる。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、又は組織特異的プロモーターであり得る。そのような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具体的な例には、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、又はマウス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】

代替的に、ｇＲＮＡは、様々な他の方法によって調製され得る。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、国際公開第２０１４／０８９２９０号及び国際公開第２０１４／０６５５９６号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。ガイドＲＮＡはまた、化学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。

【０２６５】

ガイドＲＮＡ（又はガイド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、又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℃、又は周囲温度）で、分解産物が閾値未満、例えば出発核酸又はタンパク質の０．５重量％未満のままである期間を延長するか、あるいはインビボでの安定性を増加させる）担体と、を含む組成物にあり得る。そのような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、及び脂質微小管が含まれる。そのような組成物は、Ｃａｓ９タンパク質などのＣａｓタンパク質、又はＣａｓタンパク質をコードする核酸を更に含み得る。

【０２６６】

一例として、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８～３０及び４８～５０のうちのいずれか１つに記載の配列を含み得る、本質的にそれからなり得る、又はそれからなり得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８～３０又は４８～５０のいずれか１つに記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８～３０又は４８～５０のいずれか１つに記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８～３０、及び４８～５０のうちのいずれか１つに記載の配列と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含み得る、本質的にそれからなり得る、又はそれからなり得る。

【０２６７】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８又は４８に記載の配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８に記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４８に記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８又は４８に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４８に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８又は４８に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２

～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４８に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８又は４８に記載の配列と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２８に記載の配列と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４８に記載の配列と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２６８】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２９又は４９に記載の配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２９に記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４９に記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２９又は４９に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２９に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４９に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２９又は４９に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２９に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４９に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２９

又は４９に記載の配列と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２９に記載の配列と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４９に記載の配列と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２６９】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０又は５０に記載の配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０に記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号５０に記載の配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０又は５０に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号５０に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０又は５０に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号５０に記載のＤＮＡ標的化セグメントに対して少なくとも９０％、又は少なくとも９５％同一である配列を含み得る、それから本質的になり得る、又はそれからなり得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０又は５０に記載の配列と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号３０に記載の配列と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。代替的に、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号５０に記載の配列

と３ヌクレオチド以下、２ヌクレオチド以下、又は１ヌクレオチド以下異なる配列を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなるＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。

【０２７０】

（４）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標的化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／ＲＮＡ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。他の適切なＤＮＡ／ＲＮＡ結合条件（例えば、無細胞系における条件）は、当技術分野で公知である（例えば、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、第３版（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ ２００１）を参照されたい）。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」と呼ばれ得、「相補的鎖」に相補的である（したがって、Ｃａｓタンパク質又はｇＲＮＡに相補的ではない）標的ＤＮＡの鎖は、「非相補的鎖」又は「鋳型鎖」と呼ばれ得る。

【０２７１】

標的ＤＮＡは、ガイドＲＮＡがハイブリダイズする相補的鎖上の配列と非相補的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。「ガイドＲＮＡ標的配列」という用語は、本明細書で使用される場合、具体的には、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）非相補的鎖上の配列を指す。すなわち、ガイドＲＮＡ標的配列は、ＰＡＭに隣接する非相補的鎖上の配列（例えば、Ｃａｓ９の場合、ＰＡＭの上流又は５’）を指す。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、非相補的鎖上の５’－ＮＧＧ－３’ＰＡＭの上流の配列を指し得る。ガイドＲＮＡは、標的ＤＮＡの相補的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の相補的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、非相補的鎖上のガイドＲＮＡ標的配列の逆相補体である標的ＤＮＡの相補的鎖配列にハイブリダイズすることを意味する。

【０２７２】

標的ＤＮＡ又はガイドＲＮＡ標的配列は、任意のポリヌクレオチドを含み得、例えば、細胞の核又は細胞質内、あるいはミトコンドリア又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又はガイドＲＮＡ標的配列は、細胞に対して内因性又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）をコードする配列又は非コード配列（例えば、調節配列）であり得るか、又は両方を含み得る。

【０２７３】

Ｃａｓタンパク質による標的ＤＮＡの部位特異的結合及び切断は、（ｉ）ガイドＲＮＡと標的ＤＮＡの相補的鎖との間の塩基対合相補性、及び（ｉｉ）標的ＤＮＡの非相補的鎖におけ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。任意選択的に、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）。代替的に、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配列の上流又は下流（例えば、ガイドＲＮＡ標的配列内）の約１～約１０又は約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、非相補的鎖上）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の非相補的鎖上のガイドＲＮＡ標的配列の３’のすぐ近くである。したがって、相補的鎖上の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の相補的鎖上で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及びN_2は、相補的であり得、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及びN_2＝Ｇ、N_1＝Ｇ及びN_2＝Ｃ、N_1＝Ａ及びN_2＝Ｔ、又はN_1＝Ｔ及びN_2＝Ａ）。Ｓ．ａｕｒｅｕｓからのＣａｓ９の場合、ＰＡＭは、ＮＮＧＲＲＴ又はＮＮＧＲＲであり得、Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｃ、又はＴであり得、Ｒは、Ｇ又はＡであり得る。Ｃ．ｊｅｊｕｎｉ由来のＣａｓ９の場合、ＰＡＭは、例えば、ＮＮＮＮＡＣＡＣ又はＮＮＮＮＲＹＡＣであり得、Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｃ、又はＴであり得、Ｒは、Ｇ又はＡであり得る。場合によっては（例えば、ＦｎＣｐｆ１の場合）、ＰＡＭ配列は、５’末端の上流であり得、配列５’－ＴＴＮ－３’を有し得る。ＤｐｂＣａｓＸの場合、ＰＡＭは、配列５’－ＴＴＣＮ－３’を有し得る。ＣａｓΦの場合、ＰＡＭは、配列５’－ＴＢＮ－３’を有し得、式中、Ｂは、Ｇ、Ｔ、又はＣである。

【０２７４】

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標的配列とＰＡＭの２つの例は、GN_{19}ＮＧＧ（配列番号１９）又はN_{20}ＮＧＧ（配列番号２０）である。例えば、国際公開第２０１４／１６５８２５号を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。５’末端におけるグアニンは、細胞内のＲＮＡポリメラーゼによる転写を容易にし得る。ガイドＲＮＡ標的配列とＰＡＭの他の例には、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に、５’末端に２つのグアニンヌクレオチド（例えば、GGN_{20}ＮＧＧ配列番号２１）を含み得る。例えば、国際公開第２０１４／０６５５９６号を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。他のガイドＲＮＡ標的配列及びＰＡＭは、５’Ｇ又はＧＧ及び３’ＧＧ又はＮＧＧを含む、配列番号１９～２１の４～２２ヌクレオチド長を有し得る。更に他のガイドＲＮＡ標的配列とＰＡＭは、配列番号１９～２１の１４～２０ヌクレオチド長を有し得る。

【０２７５】

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の非相補的鎖上のガイドＲＮＡ標的配列及びガイドＲＮＡがハイブリダイズする相補的鎖上の逆相補体）に対応する領域内又は領域の近くの標的ＤＮＡの一方又は両方の鎖の切断をもたらし得る。例えば、切断部位は、（例えば、ＰＡＭ配列に対して定義された位置で）ガイドＲＮＡ標的配列内にあり得る。「切断部位」は、Ｃａｓタンパク質が一本鎖切断又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）又は二本鎖ＤＮＡの両方の鎖上にあり得る。切断部位は、両鎖上の同じ位置であり得るか（平滑末端を生成する、例えば、Ｃａｓ９））、又は各鎖上の異なる部位に存在し得る（付着末端（すなわち、オーバーハング）を生成する、例えば、Ｃｐｆ１）。付着末端は、例えば、その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製することができ、第２のニッカーゼは、オーバーハング配列が作製されるようにｄｓＤＮＡの第２の鎖上に一本鎖切断を作製することができる。場合によっては、第１の鎖上のニッカーゼのガイドＲＮＡ標的配列又は切断部位は、第２の鎖上のニッカーゼのガイドＲＮＡ標的配列又は切断部位から、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、７５、１００、２５０、５００、又は１，０００塩基対離れている。

【０２７６】

ガイドＲＮＡ標的配列は、オフターゲット修飾を最小限に抑えるか、又はオフターゲット効果を回避するように選択することもできる（例えば、オフターゲットゲノム配列との

ミスマッチが２つ以下になることを回避することによって）。
【０２７７】
一例として、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２～２４、４２～４４、及び５１～１３７のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２～２４、４２～４４、及び５１～１３７のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。
【０２７８】
一例として、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１３８～２２７のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１３８～２２７のうちのいずれか１つに示されるガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。
【０２７９】
一例として、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２～２４又は４２～４４のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、本明細書に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２～４４、又は４２～４４のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。
【０２８０】
別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２、４２、及び５１～７９のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２、４２、及び５１～７９のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。
【０２８１】
別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２、４２、５８、６０、及び６９のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２、４２、５８、６０、及び６９のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。
【０２８２】
別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２又は４２に記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２に記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４２に記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２又は４２に記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを

標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２２に記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４２に記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２８３】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１３８～１６７のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１３８～１６７のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２８４】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１４１、１４３、１４４、及び１６４のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１４１、１４３、１４４、及び１６４のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２８５】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２３、４３、及び８０～１０８のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２３、４３、及び８０～１０８のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２８６】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２３、４３、９１、９４、及び１０３のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２３、４３、９１、９４、及び１０３のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２８７】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２３又は４３に記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２３に記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４３に記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８

２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２３又は４３に記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２３に記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４３に記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２８８】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１６８～１９７のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１６８～１９７のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２８９】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１７０、１８３、１９２、及び１９３のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１７０、１８３、１９２、及び１９３のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２９０】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２４、４４、及び１０９～１３７のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２４、４４、及び１０９～１３７のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２９１】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２４、４４、１１１、１１９、１２８、１２９、及び１３３のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２４、４４、１１１、１１９、１２８、１２９、及び１３３のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２９２】

別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２４又は４４に記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２４に記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９

番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４４に記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２４又は４４に記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２４に記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。別の例として、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号４４に記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２９３】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１９８～２２７のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号１９８～２２７のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２９４】

別の例として、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２０２、２０３、及び２１１のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列を標的とすることができる。別の例として、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）を標的とするガイドＲＮＡは、配列番号２０２、２０３、及び２１１のうちのいずれか１つに記載のガイドＲＮＡ標的配列の少なくとも１７個、少なくとも１８個、少なくとも１９個、又は少なくとも２０個の連続ヌクレオチドを標的とすることができる。

【０２９５】

（５）ヌクレアーゼ剤を含む脂質ナノ粒子

ヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）を含む脂質ナノ粒子も提供される。脂質ナノ粒子は、代替的に又は追加的に、本明細書に開示される目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物を含み得る。例えば、脂質ナノ粒子は、ヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）を含み得る、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物を含み得る、又はヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）と目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物の両方を含み得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に関して、脂質ナノ粒子は、任意の形態（例えば、タンパク質、ＤＮＡ、又はｍＲＮＡ）でＣａｓタンパク質を含み得る、及び／又は任意の形態（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ）でガイドＲＮＡを含み得る。一例では、脂質ナノ粒子は、ｍＲＮＡの形態でＣａｓタンパク質（例えば、本明細書に記載の修飾ＲＮＡ）及びＲＮＡの形態でガイドＲＮＡ（例えば、本明細書に開示される修飾ガイドＲＮＡ）を含む。別の例として、脂質ナノ粒子は、タンパク質の形態でＣａｓタンパク質及びＲＮＡの形態でガイドＲＮＡ（複数可）を含み得る。具体的な例では、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質はそれぞれ、同じＬＮＰでのＬＮＰ媒介送達を介してＲＮＡの形態で導入される。本明細書の他の場所でより詳細に論じられるように、ＲＮＡのうちの１つ以上が修飾され得る。そのような方法による送達は、一過性のＣａｓ発現及び／又は一過性のガイドＲＮＡの存在をもたらし得、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し得る。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（単層及び多層ベシクル、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、又は懸濁液中の内相が含まれる。そのような脂質ナノ粒子は、送達のために１つ以上の核酸又はタンパク質をカプセル化するために使用され得る。カチオン性脂質を含有する製剤は、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、非荷電又は両性イオン脂質）、アニオン性脂質、トランスフェクションを増強するヘルパー脂質、及びナノ粒子がインビボで存在することができる時間の長さを増加させるステルス脂質である。例えば、国際公開第２０１６／０１０８４０（Ａ１）号及び同第２０１７／１７３０５４（Ａ１）号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。例示的な脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質及び１つ以上の他の成分を含み得る。

【０２９６】

いくつかのＬＮＰにおいて、カーゴは、Ｃａｓ　ｍＲＮＡ（例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ）及びｇＲＮＡを含み得る。Ｃａｓ　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡは、様々な比で存在し得る。いくつかのＬＮＰでは、カーゴは、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物及びｇＲＮＡを含み得る。目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物及びｇＲＮＡは、異なる比率であり得る。

【０２９７】

好適なＬＮＰの例は、例えば、国際公開第２０１９／０６７９９２号、同第２０２０／０８２０４２号、米国特許出願公開第２０２０／０２７０６１７号、国際公開第２０２０／０８２０４１号、米国特許出願公開第２０２０／０２６８９０６号、国際公開第２０２０／０８２０４６号（例えば、ｐｐ．８５－８６を参照されたい）、及び米国特許出願公開第２０２０／０２８９６２８号に見出すことができ、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２９８】

（６）ヌクレアーゼ剤を含むベクター

本明細書に開示されるヌクレアーゼ剤（例えば、ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ）は、発現のためのベクターで提供され得る。ベクターは、例えば、複製起点、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を含み得る。

【０２９９】

いくつかのベクターは、環状であってもよい。代替的に、ベクターは、直線状であってもよい。ベクターは、脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、又はウイルスキャプシドを介して送達されるようにパッケージされ得る。非限定的な例示的なベクターとしては、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体、ミニ染色体、トランスポゾン、ウイルスベクター、及び発現ベクターが挙げられる。

【０３００】

核酸の導入は、ＡＡＶ媒介送達又はレンチウイルス媒介送達などのウイルス媒介送達によっても達成され得る。ベクターは、例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターなどのウイルスベクターであり得る。ＡＡＶは任意の好適な血清型であってもよく、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）又は自己相補的ＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）であってもよい。他の例示的なウイルス／ウイルスベクターには、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、及び単純ヘルペスウイルスが含まれる。ウイルスは、分裂細胞、非分裂細胞、又は分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染し得る。ウイルスは、宿主ゲノムに組み込まれ得る、又は代替的に宿主ゲノムに組み込まれない。このようなウイルスは、免疫性が低減するようにも操作され得る。ウイルスは、複製可能であり得、複製欠損性であり得る（例えば、ビリオン複製及び／又はパッケージングの追加ラウンドに必要な１つ以上の遺伝子に欠損がある）。ウイルスベクターは、それらの野生型対応物から遺伝的に改変され得る。例えば、ウイルスベクターは、クローニングを容易にするために、又はベクターの１つ以上の特性が変化するように、１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含み得る。そのような特性には、パッケージング容量、形質導

入効率、免疫原性、ゲノム組み込み、複製、転写、及び翻訳が含まれ得る。いくつかの例では、ウイルスゲノムの一部は、ウイルスがより大きなサイズを有する外因性配列をパッケージングすることができるように欠失され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、増強された形質導入効率を有し得る。いくつかの例では、宿主においてウイルスによって誘導される免疫応答が低減されてもよい。いくつかの例では、宿主ゲノムへのウイルス配列の組み込みを促進するウイルス遺伝子（インテグラーゼなど）は、ウイルスが非組み込み型になるように変異され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、複製欠損であり得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、ベクター上のコード配列の発現を駆動するための外因性転写又は翻訳制御配列を含み得る。いくつかの例では、ウイルスは、ヘルパー依存性であり得る。例えば、ウイルスは、ベクターを増幅してウイルス粒子にパッケージングするのに必要とされるウイルス成分（ウイルスタンパク質など）を供給するために、１つ以上のヘルパー成分を必要とし得る。そのような場合、ウイルス成分をコードする１つ以上のベクターを含む１つ以上のヘルパー成分が、本明細書に記載のベクター系と共に宿主細胞又は宿主細胞の集団に導入され得る。他の例では、ウイルスは、ヘルパーフリーであり得る。例えば、ウイルスは、ヘルパーウイルスなしでベクターを増幅及びパッケージングすることができる。いくつかの例では、本明細書に記載のベクター系はまた、ウイルス増幅及びパッケージングに必要とされるウイルス成分をコードしてもよい。

【０３０１】

例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、約10^{12}～約10^{16}ｖｇ／ｍＬが挙げられる。他の例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、体重の約10^{12}～約10^{16}ｖｇ／ｋｇが挙げられる。

【０３０２】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、ヒト及び非ヒト霊長類（ＮＨＰ）を含む複数の種に固有である。現在までに、少なくとも１２種の天然血清型及び数百種の天然変異体が単離され、特徴付けられている。例えば、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．２１：２５５－２７２を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ＡＡＶ粒子は、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）ゲノムを含有する非エンベロープ二十面体タンパク質キャプシドから天然に構成される。ＤＮＡゲノムには、ウイルスの複製起点及びパッケージングシグナルとして働く２つの逆位末端反復（ＩＴＲ）が隣接している。ｒｅｐ遺伝子は、ウイルス複製及びパッケージングに必要とされる４つのタンパク質をコードするが、ｃａｐ遺伝子は、ＡＡＶ血清型を規定する３つの構造的キャプシドサブユニット、及びいくつかの血清型においてビリオンアセンブリを促進するアセンブリ活性化タンパク質（ＡＡＰ）をコードする。

【０３０３】

組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）は、現在、遺伝子治療において使用される最も一般的に使用されるウイルスベクターの１つであり、治療用導入遺伝子を標的細胞にインビボで送達することによってヒト疾患を治療する。ｒＡＡＶベクターは、天然ＡＡＶに類似の二十面体キャプシドで構成されるが、ｒＡＡＶビリオンは、ＡＡＶタンパク質コード又はＡＡＶ複製配列をカプシドで包まない。これらのウイルスベクターは非複製性である。ｒＡＡＶベクターにおいて必要とされる唯一のウイルス配列は、２つのＩＴＲであり、これらは、ｒＡＡＶベクターの製造中にゲノム複製及びパッケージングを誘導するために必要とされる。ｒＡＡＶゲノムは、ＡＡＶ　ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を欠いており、インビボでそれらを非複製性にする。ｒＡＡＶベクターは、ｒｅｐ及びｃａｐ遺伝子を、ＡＡＶ　ＩＴＲに隣接する意図された導入遺伝子カセットと組み合わせて、追加のウイルスヘルパータンパク質と共にトランスで発現させることによって生成される。

【０３０４】

ｒＡＡＶゲノムでは、遺伝子発現カセットは、ＩＴＲ配列の間に配置され得る。典型的には、ｒＡＡＶゲノムカセットは、導入遺伝子の発現を駆動するためのプロモーター、続いてポリアデニル化配列を含む。ｒＡＡＶ発現カセットに隣接するＩＴＲは、通常、単離

され、組換えウイルスベクターに変換される最初の血清型であるＡＡＶ２に由来する。それ以来、ほとんどのｒＡＡＶ生成方法は、ＡＡＶ２Ｒｅｐベースのパッケージングシステムに依存している。例えば、Ｃｏｌｅｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．８：８７－１０４を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０３０５】

組換えＡＡＶベクターの特定の血清型は、特定の組織に対するそのインビボ指向性に影響を及ぼす。ＡＡＶキャプシドタンパク質は、標的細胞への付着及び侵入を仲介し、続いてエンドソーム脱出及び核への輸送を担う。したがって、ｒＡＡＶベクターを開発する場合の血清型の選択は、どの細胞型及び組織にベクターがインビボで注射された場合に結合及び形質導入する可能性が最も高いかに影響を与える。ｒＡＡＶ８を含むｒＡＡＶのいくつかの血清型は、マウス、ＮＨＰ及びヒトにおいて全身的に送達された場合、肝臓に形質導入することができる。例えば、Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．２１：２５５－２７２を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０３０６】

核に入ると、ｓｓＤＮＡゲノムはビリオンから放出され、相補的ＤＮＡ鎖が合成されて二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）分子が生成される。二本鎖ＡＡＶゲノムは、それらのＩＴＲを介して自然に環状化し、染色体外で核内に存続するエピソームになる。したがって、エピソーム遺伝子療法プログラムのために、ｒＡＡＶ送達ｒＡＡＶエピソームは、非分裂細胞において長期のプロモーター駆動遺伝子発現を提供する。しかしながら、このｒＡＡＶ送達エピソームＤＮＡは、細胞が分裂するにつれて希釈される。対照的に、本明細書に記載の遺伝子療法は、長期の遺伝子発現を可能にする遺伝子挿入に基づく。

【０３０７】

ｓｓＤＮＡ　ＡＡＶゲノムは、２つのオープンリーディングフレーム、Ｒｅｐ及びＣａｐからなり、相補的ＤＮＡ鎖の合成を可能にする２つの逆位末端反復が隣接している。ＡＡＶトランスファープラスミドを構築する場合、導入遺伝子は、２つのＩＴＲの間に配置され、Ｒｅｐ及びＣａｐは、トランスで供給され得る。Ｒｅｐ及びＣａｐに加えて、ＡＡＶはアデノウイルスからの遺伝子を含有するヘルパープラスミドを必要とし得る。これらの遺伝子（Ｅ４、Ｅ２ａ、及びＶＡ）はＡＡＶ複製を仲介する。例えば、トランスファープラスミド、Ｒｅｐ／Ｃａｐ、及びヘルパープラスミドをアデノウイルス遺伝子Ｅ１＋を含むＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトして、感染性ＡＡＶ粒子を生成し得る。代替的に、Ｒｅｐ、Ｃａｐ、及びアデノウイルスヘルパー遺伝子を組み合わせて単一のプラスミドとしてもよい。同様のパッケージングセル及び方法は、レトロウイルスなどの他のウイルスにも使用され得る。

【０３０８】

ＡＡＶの複数の血清型が同定されている。これらの血清型は、感染する細胞の種類（すなわち、それらの指向性）が異なり、特定の細胞型の優先的な形質導入を可能にする。ＡＡＶという用語は、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶｒｈ．６４Ｒ１、ＡＡＶｈｕ．３７、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．３２．３３、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－ＤＪ、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶＬＫ０３、ＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、及びそれらのハイブリッド、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、霊長類ＡＡＶ、非霊長類ＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶを含む。ＡＡＶの種々の血清型のゲノム配列、並びに天然末端反復（ＴＲ）、Ｒｅｐタンパク質、及びキャプシドサブユニットの配列は、当該技術分野で既知である。そのような配列は、文献又はＧｅｎＢａｎｋなどの公開データベースに見出すことができる。「ＡＡＶベクター」は、本明細書で使用される場合、ＡＡＶ起源ではない異種配列（すなわち、ＡＡＶに対して異種の核酸配列）を含むＡＡＶベクターを指し、典型的には、目的の異種ポリペプチドをコードする配列を含む。構築物は、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ

６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶｒｈ．６４Ｒ１、ＡＡＶｈｕ．３７、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．３２．３３、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－ＤＪ、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶｒｈ１０、ＡＡＶＬＫ０３、ＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、ｒｈ１０、及びそれらのハイブリッド、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、霊長類ＡＡＶ、非霊長類ＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶキャプシド配列を含み得る。一般に、異種核酸配列（導入遺伝子）は、少なくとも１つ、及び一般に２つのＡＡＶ逆位末端反復配列（ＩＴＲ）が隣接している。ＡＡＶベクターは、一本鎖（ｓｓＡＡＶ）又は自己相補的（ｓｃＡＡＶ）のいずれかであり得る。肝臓組織の血清型の例には、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ．７４、ＡＡＶ－ＤＪ、及びＡＡＶｈｕ．３７が含まれ、特にＡＡＶ８が含まれる。具体的な例では、核酸構築物を含むＡＡＶベクターは、組換えＡＡＶ８（ｒＡＡＶ８）であり得る。本明細書に記載のｒＡＡＶ８ベクターは、キャプシドがＡＡＶ８由来であるベクターである。例えば、ＡＡＶ２由来のＩＴＲ及びＡＡＶ８のキャプシドを使用するＡＡＶベクターは、本明細書においてｒＡＡＶ８ベクターであるとみなされる。

【０３０９】

指向性は、キャプシド及び異なるウイルス血清型からのゲノムの混合である偽型付けによって更に洗練され得る。例えば、ＡＡＶ２／５は、血清型５のキャプシドにパッケージされた血清型２のゲノムを含むウイルスを示す。偽型ウイルスの使用は、形質導入効率を改善するだけでなく、指向性を変え得る。異なる血清型に由来するハイブリッドキャプシドはまた、ウイルスの指向性を改変するためにも使用され得る。例えば、ＡＡＶ－ＤＪは、８つの血清型からのハイブリッドキャプシドを含有しており、インビボで幅広い細胞型にわたって高い感染力を示す。ＡＡＶ－ＤＪ８は、ＡＡＶ－ＤＪの特性を示すが、脳への取り込みが増強された別の例である。ＡＡＶ血清型は、突然変異によっても修飾され得る。ＡＡＶ２の突然変異修飾の例には、Ｙ４４４Ｆ、Ｙ５００Ｆ、Ｙ７３０Ｆ、及びＳ６６２Ｖが含まれる。ＡＡＶ３の突然変異修飾の例には、Ｙ７０５Ｆ、Ｙ７３１Ｆ、及びＴ４９２Ｖが含まれる。ＡＡＶ６の突然変異修飾の例には、Ｓ６６３Ｖ及びＴ４９２Ｖが含まれる。他の偽型／修飾ＡＡＶ変異体には、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／６、ＡＡＶ２／７、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／９、ＡＡＶ２．５、ＡＡＶ８．２、及びＡＡＶ／ＳＡＳＴＧが含まれる。

【０３１０】

導入遺伝子の発現を加速するために、自己相補的ＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）変異体が使用され得る。ＡＡＶは細胞のＤＮＡ複製機構に依存して、ＡＡＶの一本鎖ＤＮＡゲノムの相補的鎖を合成するため、導入遺伝子の発現が遅れる可能性がある。この遅延に対処するために、感染時に自発的にアニーリングすることができる相補的配列を含むｓｃＡＡＶを使用することができ、宿主細胞のＤＮＡ合成の必要性を排除する。しかしながら、一本鎖ＡＡＶ（ｓｓＡＡＶ）ベクターも使用され得る。

【０３１１】

パッケージング容量を増加させるために、長い導入遺伝子は、１つ目は３’スプライスドナー、２つ目は５’スプライスアクセプターである２つのＡＡＶトランスファープラスミドとの間で分割され得る。細胞の共感染時に、これらのウイルスはコンカテマーを形成し、一緒にスプライシングされ、完全長導入遺伝子を発現させ得る。これにより、より長い導入遺伝子の発現が可能になるが、発現の効率は低下する。容量を増加させるための同様の方法は、相同組換えを利用する。例えば、導入遺伝子は２つのトランスファープラスミドの間で分割され得るが、共発現が相同組換え及び完全長導入遺伝子の発現を誘導するように、実質的な配列の重複がある。

【０３１２】

特定のＡＡＶにおいて、カーゴは、１つ以上のガイドＲＮＡをコードする核酸（例えば、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ、又は２つ以上のガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ）を含み得る。特定のＡＡＶにおいて、カーゴは、Ｃａｓ９などのＣａｓヌクレアーゼをコードする核酸（例えば、ＤＮＡ）、及び１つ以上のガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ（例

えば、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ、又は２つ以上のガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ）を含み得る。特定のＡＡＶにおいて、カーゴは、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物を含み得る。特定のＡＡＶにおいて、カーゴは、Ｃａｓ９などのＣａｓヌクレアーゼをコードする核酸（例えば、ＤＮＡ）、ガイドＲＮＡ（又は複数のガイドＲＮＡ）をコードするＤＮＡ、及び目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物を含み得る。

【０３１３】

例えば、Ｃａｓ又はＣａｓ９及び１つ以上のｇＲＮＡ（例えば、１つのｇＲＮＡ又は２つのｇＲＮＡ又は３つのｇＲＮＡ又は４つのｇＲＮＡ）は、ＬＮＰ媒介送達（例えば、ＲＮＡの形態）又はアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介送達（例えば、ｒＡＡＶ８媒介送達）を介して送達され得る。例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及びｇＲＮＡは、ＬＮＰ媒介送達を介して送達され得る、又はＣａｓ９をコードするＤＮＡ及びｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、ＡＡＶ媒介送達を介して送達され得る。Ｃａｓ又はＣａｓ９及びｇＲＮＡ（複数可）は、単一のＡＡＶにおいて、又は２つの別個のＡＡＶを介して送達され得る。例えば、第１のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセットを担持し得、第２のＡＡＶは、ｇＲＮＡ発現カセットを担持し得る。同様に、第１のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセットを担持し、第２のＡＡＶは、２つ以上のｇＲＮＡ発現カセットを担持し得る。代替的に、単一のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたＣａｓ又はＣａｓ９コード配列）及びｇＲＮＡ発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたｇＲＮＡコード配列）を担持し得る。同様に、単一のＡＡＶは、Ｃａｓ又はＣａｓ９発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたＣａｓ又はＣａｓ９コード配列）及び２つ以上のｇＲＮＡ発現カセット（例えば、プロモーターに作動可能に連結されたｇＲＮＡコード配列）を担持し得る。Ｕ６プロモーター又は小さなｔＲＮＡ　Ｇｌｎなど、様々なプロモーターを使用してｇＲＮＡの発現が駆動され得る。同様に、Ｃａｓ９の発現を駆動するために様々なプロモーターが使用され得る。例えば、Ｃａｓ９コード配列がＡＡＶ構築物に適合することができるように小さなプロモーターが使用される。同様に、小さなＣａｓ９タンパク質（例えば、ＳａＣａｓ９又はＣｊＣａｓ９を使用して、ＡＡＶパッケージング容量を最大化する）。

【０３１４】

Ｄ．細胞又は動物又はゲノム又は核酸

上記の組成物のいずれか（例えば、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物、ヌクレアーゼ剤、ベクター、脂質ナノ粒子、又はそれらの任意の組み合わせ）を含む細胞又は動物（すなわち、対象）もまた本明細書で提供される。そのような細胞又は動物（又はゲノム）は、本明細書に開示される方法によって産生され得る。例えば、細胞又は動物は、本明細書に記載の目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物のいずれか、本明細書に開示されるヌクレアーゼ剤のいずれか、又はその両方を含み得る。

【０３１５】

いくつかのそのような細胞又は動物又はゲノムにおいて、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物は、核酸構築物によってコードされる目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）が細胞、動物、又はゲノムにおいて発現するように、標的ゲノム遺伝子座（例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座）においてゲノムに組み込まれ得る。例えば、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物がゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込まれる場合、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現し得る。１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、Ｌ－ＳＨ５（ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、Ｌ－ＳＨ１８（ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、Ｌ－ＳＨ２０（ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）である。

【０３１６】
具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７（本明細書ではＬ－ＳＨ５と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２（本明細書ではＬ－ＳＨ１８と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３（本明細書ではＬ－ＳＨ２０と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。

【０３１７】
具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、以下のゲノム座標、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７（Ｌ－ＳＨ５に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）ヒト６番染色体の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２（Ｌ－ＳＨ１８に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３（Ｌ－ＳＨ２０に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３１８】
１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号３９に記載の配列又はその変異体を含み得る。シンテニー領域は、単一の祖先ゲノム領域に由来する。例えば、シンテニー領域は、異なる生物に由来し得、種分化に由来する。

【０３１９】
別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０３２０】
別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色

体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４１に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０３２１】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３２２】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３２３】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３２４】

いくつかのそのような細胞又は動物又はゲノムにおいて、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物は、核酸構築物によってコードされる目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）が細胞、動物、又はゲノムにおいて発現するように、標的ゲノム遺伝子座（例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座）においてゲノムに組み込まれ得る。例えば、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物がゲノムセーフハーバー遺伝子座に組み込まれる場合、目的の産物（例えば、目的のポリペ

プチド）は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現し得る。１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）である。

【０３２５】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ５と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ１８と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ２０と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。

【０３２６】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、以下のゲノム座標、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６（マウスＬ－ＳＨ５に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）マウス１７番染色体の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６（マウスＬ－ＳＨ１８に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２（マウスＬ－ＳＨ２０に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３２７】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスの染色体、又はヒト若しくは非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０５に記載の配列又はその変異体を含み得る。シンテニー領域は、単一の祖先ゲノム領域に由来する。例えば、シンテニー領域は、異なる生物に由来し得、種分化に由来する。

【０３２８】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）、又は非ヒト動物、非ヒト

哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスの染色体、又はヒト若しくは非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０６に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０３２９】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスの染色体、又はヒト若しくは非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０７に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０３３０】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（マウス１４番染色体の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３３１】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（マウス１７番染色体の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３３２】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（マウス４番染色体の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３

ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３３３】

核酸構築物が安定して組み込まれる標的ゲノム遺伝子座は、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物についてヘテロ接合性であってもよく、又は目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸構築物についてホモ接合性であってもよい。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、２つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合と記載される。

【０３３４】

細胞又はゲノムは、真核細胞若しくは真核生物、又は哺乳動物細胞若しくは哺乳動物（例えば、非ヒト哺乳動物細胞若しくは非ヒト哺乳動物、又はヒト細胞若しくはヒト）などの任意の好適な種からのものであり得る。哺乳動物は、例えば、非ヒト哺乳動物、ヒト、げっ歯動物、ラット、マウス、又はハムスターであり得る。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、サル及び類人猿などの非ヒト霊長類が含まれる。「非ヒト」という用語は、ヒトを除外する。例には、ヒト細胞／ヒト、げっ歯類細胞／げっ歯類、マウス細胞／マウス、ラット細胞／ラット、及び非ヒト霊長類細胞／非ヒト霊長類が含まれるが、これらに限定されない。具体的な例では、細胞はヒト細胞であるか、又は動物はヒトである。同様に、細胞は、任意の好適なタイプの細胞であり得る。具体的な例では、細胞は、肝細胞などの肝臓細胞（例えば、ヒト肝臓細胞又はヒト肝細胞）である。

【０３３５】

細胞は、単離された細胞（例えば、インビトロ）、エクスビボ細胞であり得る、又は動物内（すなわち、対象内）でインビボであり得る。１つの例では細胞は、インビトロ又はエクスビボである。別の例では、細胞はインビボで対象内に存在する。細胞は、有糸分裂能力のある細胞又は有糸分裂的に不活性な細胞、減数分裂能力のある細胞又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、初代体細胞又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、又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（例えば、ヒト肝細胞）などの肝臓細胞であり得る。

【０３３６】

本明細書で提供される細胞は、正常で健康な細胞であり得る、又は病変した細胞若しくは突然変異体を担持する細胞であり得る。例えば、細胞は、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の欠損を有し得るか、又は目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の欠損を有する対象由来であり得る。

【０３３７】

細胞は、分裂細胞（例えば、活発に分裂している細胞）であり得る。本明細書で提供される細胞は、非分裂細胞であり得る。

【０３３８】

標的ゲノム遺伝子座（例えば、本明細書の他の場所に開示されるゲノムセーフハーバー遺伝子座）に組み込まれた、本明細書に開示される核酸構築物のいずれかを含む核酸も提供される。核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み得、核酸は、目的の産物をコードする。ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、例えば、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７（本明細書ではＬ－ＳＨ５と称される）又は、非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２（本明細書ではＬ－ＳＨ１８と称される）又は、非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３（本明細書ではＬ－ＳＨ２０と称さ

れる）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択され得る。

【０３３９】

ゲノムセーフハーバー遺伝子座はまた、以下のゲノム座標、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７（Ｌ－ＳＨ５に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）ヒト６番染色体の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２（Ｌ－ＳＨ１８に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３（Ｌ－ＳＨ２０に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択され得る。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３４０】

標的ゲノム遺伝子座（例えば、本明細書の他の場所に開示されるゲノムセーフハーバー遺伝子座）に組み込まれた、本明細書に開示される核酸構築物のいずれかを含む核酸も提供される。核酸構築物は、プロモーターに作動可能に連結された核酸を含み得、核酸は、目的の産物をコードする。ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、例えば、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ５と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ１８と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ２０と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択され得る。

【０３４１】

ゲノムセーフハーバー遺伝子座はまた、以下のゲノム座標、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６（マウスＬ－ＳＨ５に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）マウス１７番染色体の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６（マウスＬ－ＳＨ１８に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２（マウスＬ－ＳＨ２０に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択され得る。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５

ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。
【０３４２】
目的の産物は、本明細書の他の場所に開示される任意の目的の産物であり得る。例えば、目的の産物は、治療用ポリペプチド、分泌ポリペプチド、細胞内ポリペプチドなど目的のポリペプチドであり得る。
【０３４３】
プロモーターは、本明細書の他の場所に開示される任意のプロモーターであり得る。例えば、プロモーターは、肝臓細胞において活性であり得るか、組織特異的プロモーターであり得るか、構成的プロモーターであり得るか、又は誘導性プロモーターであり得る。
【０３４４】
１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７（本明細書ではＬ－ＳＨ５と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。
【０３４５】
１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２（本明細書ではＬ－ＳＨ１８と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。
【０３４６】
１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３（本明細書ではＬ－ＳＨ２０と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。
【０３４７】
１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。
【０３４８】
別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。
【０３４９】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３５０】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ５と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。

【０３５１】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ１８と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。

【０３５２】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ２０と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。

【０３５３】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（マウス１４番染色体の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３５４】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（マウス１７番染色体の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって

特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３５５】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（マウス４番染色体の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３５６】

ＩＩＩ．細胞又は対象において目的の産物をコードする核酸を導入する、組み込む、又は発現させる方法

本明細書に開示される核酸構築物及び組成物は、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする核酸を標的ゲノム遺伝子座（例えば、本明細書の他の場所に記載されるゲノムセーフハーバー遺伝子座）に挿入するか、若しくは組み込む方法、又は目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）を、細胞、細胞の集団、若しくは対象（例えば、それを必要とする対象）において発現させる方法で使用することができる。

【０３５７】

一例では、核酸構築物を対象（例えば、それを必要とする対象）の細胞又は細胞の集団など細胞又は細胞の集団に導入する方法が本明細書で提供される。核酸構築物は、プロモーター（例えば、細胞又は細胞の集団において活性であるプロモーター）に作動可能に連結された核酸を含み得、核酸は、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする。そのような方法は、本明細書に記載の核酸構築物のうちのいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子など本明細書に記載の核酸構築物を含む組成物のうちのいずれか）を細胞、細胞の集団、又は対象（例えば、それを必要とする対象）に投与することを含み得る。いくつかの方法では、核酸構築物又は核酸構築物を含む組成物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座）内のヌクレアーゼ標的配列を切断することができ（例えば、切断部位を作製するため）、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に（例えば、切断部位に）挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製することができる。目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現し得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、細胞又は対象は、ヒト細胞（例えば、ヒト肝臓細胞）又はヒト対象であり、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、（ｉｉ）６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び（ｉｉｉ）９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、細胞又は対象は、マウス細胞（例えば、マウス肝臓細胞）又はマウス対象であり、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、（ｉｉ）１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び（ｉｉｉ）４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される。代替的に、細胞又は対象は、非ヒト動物細胞（例えば、非ヒト動物肝臓細胞）又は対象であり、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、非ヒト動物における対応するゲノム位置から選択される。そのような方法では、ガイドＲＮＡ

は、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にゲノムセーフハーバー遺伝子座内のガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせることができ、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡ標的配列を切断することができ（例えば、切断部位を作製するために）、核酸構築物は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座（例えば、切断部位）に挿入されて、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座を作製することができ、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）は、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現し得る。１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。

【０３５８】

一例では、核酸構築物を対象（例えば、それを必要とする対象）の細胞又は細胞の集団など細胞又は細胞の集団における標的ゲノム遺伝子座（例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座）に挿入する方法が本明細書で提供される。核酸構築物は、プロモーター（例えば、細胞又は細胞の集団において活性であるプロモーター）に作動可能に連結された核酸を含み得、核酸は、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする。そのような方法は、本明細書に記載の核酸構築物のうちのいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子など本明細書に記載の核酸構築物を含む組成物のうちのいずれか）を細胞、細胞の集団、又は対象（例えば、それを必要とする対象）に投与することを含み得る。いくつかの方法では、核酸構築物又は核酸構築物を含む組成物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座）内のヌクレアーゼ標的配列を切断することができ（例えば、切断部位を作製するため）、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に（例えば、切断部位に）挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製することができる。目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現し得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、細胞又は対象は、ヒト細胞（例えば、ヒト肝臓細胞）又はヒト対象であり、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、（ｉｉ）６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び（ｉｉｉ）９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、細胞又は対象は、マウス細胞（例えば、マウス肝臓細胞）又はマウス対象であり、ゲノムセーフハーバー遺伝

子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、（ｉｉ）１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び（ｉｉｉ）４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される。代替的に、細胞又は対象は、非ヒト動物細胞（例えば、非ヒト動物肝臓細胞）又は対象であり、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、非ヒト動物における対応するゲノム位置から選択される。そのような方法では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にゲノムセーフハーバー遺伝子座内のガイドＲＮＡ標的配列に標的とさせることができ、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡ標的配列を切断することができ（例えば、切断部位を作製するために）、核酸構築物は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座（例えば、切断部位）に挿入されて、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座を作製することができ、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）は、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現し得る。１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。

【０３５９】

別の例では、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）を、細胞、細胞の集団、又は対象（例えば、それを必要とする対象）における標的ゲノム遺伝子座（例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座）から発現させる方法が本明細書で提供される。核酸構築物は、プロモーター（例えば、細胞又は細胞の集団において活性であるプロモーター）に作動可能に連結された核酸を含み得、核酸は、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）をコードする。そのような方法は、本明細書に記載の核酸構築物のうちのいずれか（又は例えば、ベクター若しくは脂質ナノ粒子など本明細書に記載の核酸構築物を含む組成物のうちのいずれか）を細胞、細胞の集団、又は対象（例えば、それを必要とする対象）に投与することを含み得る。いくつかの方法では、核酸構築物は、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤と一緒に（同時に又は任意の順序で逐次的に）投与され得る。ヌクレアーゼ剤は、標的ゲノム遺伝子座（例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座）内のヌクレアーゼ標的配列を切断することができ（例えば、切断部位を作製するため）、核酸構築物は、標的ゲノム遺伝子座に（例えば、切断部位に）挿入されて、修飾標的ゲノム遺伝子座を作製することができ、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）は、修飾標的ゲノム遺伝子座から発現し得る。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、細胞又は対象は、

ヒト細胞（例えば、ヒト肝臓細胞）又はヒト対象であり、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７、（ｉｉ）６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２、及び（ｉｉｉ）９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３から選択される。一例では、ヌクレアーゼ剤は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系であり、細胞又は対象は、マウス細胞（例えば、マウス肝臓細胞）又はマウス対象であり、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６、（ｉｉ）１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６、及び（ｉｉｉ）４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２から選択される。代替的に、細胞又は対象は、非ヒト動物細胞（例えば、非ヒト動物肝臓細胞）又は対象であり、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、非ヒト動物における対応するゲノム位置から選択される。そのような方法では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質に結合し、Ｃａｓタンパク質にゲノムセーフハーバー遺伝子座内のガイドＲＮＡ標的配列を標的とさせることができ、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡ標的配列を切断することができ（例えば、切断部位を作製するために）、核酸構築物は、ゲノムセーフハーバー遺伝子座に挿入されて、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座を作製することができ、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）は、修飾ゲノムセーフハーバー遺伝子座から発現し得る。１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。

【０３６０】

上記方法のいずれかにおいて、細胞は、真核細胞又は哺乳動物細胞（例えば、非ヒト哺乳動物細胞又はヒト細胞）などの任意の好適な種からのものであり得る。哺乳動物は、例えば、非ヒト哺乳動物、ヒト、げっ歯動物、ラット、マウス、又はハムスターであり得る。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、サル及び類人猿などの非ヒト霊長類が含まれる。「非ヒト」という用語は、ヒトを除外する。細胞の具体的な例には、ヒト細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、及び非ヒト霊長類細胞が含まれるが、これらに限定されない。具体的な例では、細胞は、ヒト細胞である。同様に、細胞は、任意の好適なタイプの細胞であり得る。具体的な例では、細胞は、肝細胞などの肝臓細胞（例えば、ヒト肝臓細胞又はヒト肝細胞）である。

【０３６１】
細胞は、単離された細胞（例えば、インビトロ）、エクスビボ細胞であり得る、又は動物内（すなわち、対象内）でインビボであり得る。１つの具体的な例では細胞は、インビトロ又はエクスビボであり得る。１つの具体的な例では細胞は、インビボで（対象中に）存在する。同様に、細胞はまた、初代体細胞又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、又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（例えば、マウス、非ヒト霊長類、又はヒト肝細胞）などの肝臓細胞であり得る。
【０３６２】
本明細書で提供される細胞は、正常で健康な細胞であり得る、又は病変した細胞若しくは突然変異体を担持する細胞であり得る。例えば、細胞は、機能の喪失、例えば、酵素機能の喪失を示し得る。
【０３６３】
いくつかの方法において、目的の産物は治療用産物であり、対象は治療用産物を必要とする対象である。例えば、目的の産物は、治療用ポリペプチド（例えば、酵素）（例えば、対象において欠如若しくは欠損しているポリペプチド、又は対象において活性が欠如若しくは欠損しているポリペプチド）であり得る。例えば、対象は、そのゲノム中に突然変異を含み得、突然変異は、酵素活性を有する内因性ポリペプチドの活性又は発現の低下をもたらし、目的のポリペプチドは、対象が内因性ポリペプチドの活性又は発現の低下をもたらす突然変異を有する遺伝子によってコードされる野生型ポリペプチドの酵素活性を有するポリペプチドをコードすることができる。代替的に、目的の産物は、アンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはＲＮＡｉ剤など治療用ＲＮＡ、又は抗体、抗原結合タンパク質、外因性Ｔ細胞受容体、若しくはキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）など治療用ポリペプチドであり得、治療用産物（例えば、治療用ＲＮＡ又は治療用ポリペプチド）は、対象における疾患又は病態を治療する。
【０３６４】
本明細書に開示される組成物（例えば、目的の産物をコードする核酸構築物、又はヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）と組み合わせた核酸構築物）は、目的の産物を必要とする対象の治療に有用である。同様に、本明細書に開示される組成物は、医薬組成物又は薬剤を必要とする対象を治療するためにそれらを調製するために使用することができる。用語「治療する」、「治療された」、「治療すること」、及び「治療」は、症状、合併症、又は生化学的徴候の発症を予防又は遅延させ、症状を緩和し、又は疾患、病態、若しくは障害の更なる進行を停止若しくは阻害するために、本明細書に開示される核酸構築物を（例えば、本明細書に開示されるヌクレアーゼ剤と一緒に）対象に投与することを含む。治療は、予防的（疾患の発症を予防若しくは遅延させるため、又はその臨床的若しくは準臨床的症状の発現を予防するため）又は疾患の発現後の症状の治療的抑制若しくは緩和であり得る。
【０３６５】
いくつかの方法では、治療有効量の核酸構築物又は核酸構築物を含む組成物又は核酸構築物とヌクレアーゼ剤との組み合わせ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）が対象に投与される。治療有効量は、それが投与される所望の効果を生み出す量である。正確な量は、治療の目的に依存し、既知の技術を使用して当業者によって確認可能である。例えば、Ｌｌｏｙｄ（１９９９）Ｔｈｅ Ａｒｔ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｉｎｇを参照されたい。
【０３６６】
本明細書に開示される組成物を含む治療用又は薬学的組成物は、好適な担体、賦形剤、及び改善された移入、送達、耐性などを提供するために製剤に組み込まれる他の薬剤と共に投与され得る。多数の適切な製剤は、全ての薬剤師に知られている処方集である、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡに見出すことができる。また、

Ｐｏｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ.「Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ ｆｏｒ ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ」ＰＤＡ（１９９８）Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．５２：２３８－３１１を参照されたい。特定の実施形態では、医薬組成物は、非発熱性である。

【０３６７】

上記方法のいずれかにおける対象は、真核生物又は哺乳動物などの任意の適切な種由来であり得る。哺乳動物は、例えば、非ヒト哺乳動物、ヒト、げっ歯動物、ラット、マウス、又はハムスターであり得る。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、サル及び類人猿などの非ヒト霊長類が含まれる。「非ヒト」という用語は、ヒトを除外する。好適な種の具体的な例には、ヒト、げっ歯類、マウス、ラット、及び非ヒト霊長類が含まれるが、これらに限定されない。具体的な例では、対象は、ヒトである。

【０３６８】

遺伝子を発現することができる任意のゲノムセーフハーバー遺伝子座が、本明細書に記載の方法において使用され得る。そのような遺伝子座については、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。

【０３６９】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７（本明細書ではＬ－ＳＨ５と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）ヒト６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２（本明細書ではＬ－ＳＨ１８と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３（本明細書ではＬ－ＳＨ２０と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。

【０３７０】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、以下のゲノム座標、すなわち、（ｉ）ヒト１３番染色体の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７（Ｌ－ＳＨ５に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）ヒト６番染色体の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２（Ｌ－ＳＨ１８に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）ヒト９番染色体の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３（Ｌ－ＳＨ２０に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ

領域若しくはシンテニー領域）から選択される。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３７１】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体、座標７７４６０２４２～７７４６０５３７）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号３９に記載の配列又はその変異体を含み得る。シンテニー領域は、単一の祖先ゲノム領域に由来する。例えば、シンテニー領域は、異なる生物に由来し得、種分化に由来する。

【０３７２】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体、座標１７００３１０８４～１７００３１３８２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０３７３】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体、座標２５２０７４１２～２５２０７７０３）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４１に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０３７４】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ５（１３番染色体の約７７４６０２４２～約７７４６０５３７の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３７５】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ１８（６番染色体の約１７００３１０８４～約１７００３１３８２の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、

又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３７６】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、ヒトＬ－ＳＨ２０（９番染色体の約２５２０７４１２～約２５２０７７０３の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはヒトの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラット若しくはマウスなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３７７】

遺伝子を発現することができる任意のゲノムセーフハーバー遺伝子座が、本明細書に記載の方法において使用され得る。そのような遺伝子座については、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。

【０３７８】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、次のゲノム位置、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ５と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）マウス１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ１８と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２（本明細書ではマウスＬ－ＳＨ２０と称される）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。

【０３７９】

具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、以下のゲノム座標、すなわち、（ｉ）マウス１４番染色体の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６（マウ

スＬ－ＳＨ５に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、（ｉｉ）マウス１７番染色体の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６（マウスＬ－ＳＨ１８に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、及び（ｉｉｉ）マウス４番染色体の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２（マウスＬ－ＳＨ２０に対応）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）から選択される。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３８０】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（マウス１４番染色体、座標１０３，４５０，３９７～１０３，４５１，３９６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスの染色体、又はヒト若しくは非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０５に記載の配列又はその変異体を含み得る。シンテニー領域は、単一の祖先ゲノム領域に由来する。例えば、シンテニー領域は、異なる生物に由来し得、種分化に由来する。

【０３８１】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（１７番染色体、座標１５，２２６，３８７～１５，２２７，３８６）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスの染色体、又はヒト若しくは非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０６に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０３８２】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（４番染色体、座標９２，８２７，５６３～９２，８２８，５９２）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）である。例えば、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスの染色体、又はヒト若しくは非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、又はラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、配列番号４０７に記載の配列又はその変異体を含み得る。

【０３８３】

１つの具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ５（マウス１４番染色体の約１０３，４５０，３９７～約１０３，４５１，３９６の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±

２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３８４】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ１８（マウス１７番染色体の約１５，２２６，３８７～約１５，２２７，３８６の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３８５】

別の具体的な例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、マウスＬ－ＳＨ２０（マウス４番染色体の約９２，８２７，５６３～約９２，８２８，５９２の座標）、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類における対応する領域（例えば、オルソログ領域若しくはシンテニー領域）、あるいはマウスの染色体、又は非ヒト動物、非ヒト哺乳動物（例えば、非ヒト霊長類）、若しくはラットなどげっ歯類のオルソログ領域若しくはシンテニー領域において同じ位置又は遺伝子座に位置する、その変異体に対応する。「約」という用語は、ゲノム座標に言及する場合、±２０塩基対を意味する。他の例では、ゲノムセーフハーバー遺伝子座は、上記の座標によって特定される領域の近傍である。ゲノム座標に言及する場合の「近傍」という用語は、±５ｋｂ、±４ｋｂ、±３ｋｂ、±２ｋｂ、±１ｋｂ、±０．５ｋｂ、±０．４ｋｂ、±０．３ｋｂ、±０．２ｋｂ、又は±０．１ｋｂを意味する。

【０３８６】

核酸構築物は、本明細書の他の場所に記載のように、相同組換え（ＨＲ）及び非相同末端結合（ＮＨＥＪ）を含む任意の手段によって標的ゲノム遺伝子座に挿入することができる。具体的な例では、核酸構築物は、ＮＨＥＪによって挿入される（例えば、ホモロジーアームを含まず、ＮＨＥＪによって挿入される）。

【０３８７】

別の具体的な例では、核酸構築物は、ホモロジー非依存性標的化組み込み（例えば、方向性のあるホモロジー非依存性標的化組み込み）を介して挿入され得る。例えば、核酸構築物（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された、目的の産物をコードする核酸）は、各側にヌクレアーゼ剤の標的部位が隣接し得る（例えば、標的ゲノム遺伝子座と同じ標的部位、及び同じヌクレアーゼ剤が標的ゲノム遺伝子座における標的部位を切断するために使用される）。次いで、ヌクレアーゼ剤は、核酸構築物（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された、目的の産物をコードする核酸）に隣接する標的部位を切断することができる。具体的な例では、核酸構築物は、ＡＡＶ媒介送達で送達され、核酸構築物に隣接する標的部位（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された、目的の産物をコードする核酸）の切断は、ＡＡＶの逆位末端反復（ＩＴＲ）を除去することができる。ＩＴＲを除去すると、ＩＴＲの存在が反復配列のために配列決定作業を妨げる可能性があるため、成功したターゲティングの評価が容易になる。いくつかの方法では、標的ゲノム遺伝子座中の標的部位（例えば、隣接するプロトスペーサー隣接モチーフを含むｇＲＮＡ標的配列）は、核酸構築物（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された、目的の産物をコードする核酸）が第１の向きで標的ゲノム遺伝子座に挿入されている場合にはもはや存在しないが、核酸構築物（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された、目的の産物

をコードする核酸）が反対の向きで標的ゲノム遺伝子座に挿入されている場合には再形成される。

【０３８８】

上記方法のいずれかにおいて、目的の産物をコードする核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）と同時に投与され得るか、又は同時に投与され得ない（例えば、任意の組み合わせで逐次的に）。例えば、核酸構築物及びヌクレアーゼ剤を含む組成物を投与することを含む方法では、それらは別々に投与され得る。例えば、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤の前に、ヌクレアーゼ剤の後に、又はヌクレアーゼ剤と同時に投与され得る。

【０３８９】

一例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与する約４時間、約８時間、約１２時間、約１８時間、約１日、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、又は約１週間前に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与する少なくとも約４時間、少なくとも約８時間、少なくとも約１２時間、少なくとも約１８時間、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、又は少なくとも約１週間前に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与する約４時間～約２４時間、約４時間～約１２時間、約４時間～約８時間、約８時間～約２４時間、約１２時間～約２４時間、約１日～約７日、約１日～約６日、約１日～約５日、約１日～約４日、約１日～約３日、約１日～約２日、約２日～約７日、約３日～約７日、約４日～約７日、約５日～約７日、約６日～約７日、又は約１日～約３日前に投与される。

【０３９０】

一例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与してから約４時間、約８時間、約１２時間、約１８時間、約１日、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、又は約１週間後に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与してから少なくとも約４時間、少なくとも約８時間、少なくとも約１２時間、少なくとも約１８時間、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、又は少なくとも約１週間後に投与される。別の例では、核酸構築物は、ヌクレアーゼ剤を投与してから約４時間～約２４時間、約４時間～約１２時間、約４時間～約８時間、約８時間～約２４時間、約１２時間～約２４時間、約１日～約７日、約１日～約６日、約１日～約５日、約１日～約４日、約１日～約３日、約１日～約２日、約２日～約７日、約３日～約７日、約４日～約７日、約５日～約７日、約６日～約７日、又は約１日～約３日後に投与される。

【０３９１】

核酸構築物及びヌクレアーゼ剤を細胞に投与する任意の好適な方法、特に、肝臓に投与する方法を使用することができ、そのような方法の例は、本明細書の他の場所で詳細に記載されている。対象においてインビボで細胞を標的とする方法では、核酸構築物は、対象の特定のタイプの細胞に挿入され得る。核酸構築物及び／又はヌクレアーゼ剤を対象に導入するための方法及びビヒクルは、対象において、どのタイプの細胞が標的化されるかに影響を及ぼし得る。いくつかの方法では、例えば、核酸構築物は、肝細胞などの肝臓細胞における標的ゲノム遺伝子座（例えば、本明細書に開示されるゲノムセーフハーバー遺伝子座）に挿入される。そのような構築物及びヌクレアーゼ剤を対象に導入するための方法及びビヒクル（脂質ナノ粒子媒介送達及びＡＡＶ媒介送達（例えば、ｒＡＡＶ８媒介送達）並びに静脈内注射などの、肝臓又は肝細胞を標的とする方法及びビヒクルを含む）は、本明細書の他の場所により詳細に開示されている。

【０３９２】

上記方法のうちのいずれかにおいて、核酸構築物及びヌクレアーゼ剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）は、任意の好適な送達系及び既知の方法を使用して投与され得る。ヌクレアーゼ剤成分及び核酸構築物（例えば、ガイドＲＮＡ、Ｃａｓタンパク質、及び核酸構築物）は、必要に応じて同じ又は異なる送達方法を使用して、個別に又は任意の組み合

わせで一緒に送達され得る。

【０３９３】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系が使用される方法では、ガイドＲＮＡは、例えば、ＲＮＡ（例えば、本明細書に開示される修飾ガイドＲＮＡなどのインビトロ転写ＲＮＡ）の形態で、又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡの形態で、対象又は細胞に導入又は投与され得る。ＤＮＡの形態で導入されると、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、細胞内で又は対象における細胞内で活性であるプロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、ガイドＲＮＡは、ＡＡＶを介して送達され、Ｕ６プロモーターの下で、インビボで発現させてもよい。そのようなＤＮＡは、１つ以上の発現構築物中にあり得る。例えば、そのような発現構築物は、単一の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ＣＲＩＳＰＲＲＮＡをコードするＤＮＡ及び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）。

【０３９４】

同様に、Ｃａｓタンパク質は、任意の形態で対象又は細胞に導入され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、ｇＲＮＡと複合体を形成したＣａｓ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、Ｃａｓタンパク質は、本明細書に開示される修飾ｍＲＮＡなどのＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））又はＤＮＡ）などの、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸の形態で提供され得る。任意選択的に、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞又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され得る。例えば、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、哺乳動物細胞、ヒト細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、又は任意の他の目的の宿主細胞においてより高い頻度で使用される代替コドンへと修飾され得る。Ｃａｓタンパク質をコードする核酸が細胞又は対象に導入されると、Ｃａｓタンパク質は、一過性に、条件付きで、又は構成的に細胞内で又は対象における細胞内で発現され得る。

【０３９５】

一例では、Ｃａｓタンパク質は、ｍＲＮＡ（例えば、本明細書に開示される修飾ｍＲＮＡ）の形態で導入され、ガイドＲＮＡは、本明細書に開示される修飾ｇＲＮＡなどのＲＮＡの形態で（例えば、同じ脂質ナノ粒子内に一緒に）導入される。ガイドＲＮＡは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。同様に、Ｃａｓ　ｍＲＮＡは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。

【０３９６】

遺伝子編集系（例えば、Ｃａｓタンパク質）による切断後に核酸構築物が挿入される方法では、遺伝子編集系（例えば、Ｃａｓタンパク質）は、標的ゲノム遺伝子座を切断して一本鎖切断（ニック）又は二本鎖切断を作製することができ、切断された又はニックの入った遺伝子座は、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）媒介挿入又は相同組換え修復を介して核酸構築物の挿入によって修復することができる。任意選択的に、核酸構築物による修復は、ガイドＲＮＡ標的配列を除去するか、又は破壊し、その結果、標的化されている対立遺伝子は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ試薬によって再標的化され得ない。

【０３９７】

本明細書の他の場所でより詳細に説明されるように、核酸構築物は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）を含み得、それらは一本鎖又は二本鎖であり得、それらは直線状又は環状の形態であり得る。核酸構築物は、ネイキッド核酸であり得るか、又はＡＡＶなどのウイルスによって送達され得る。具体的な例では、核酸構築物酸は、ＡＡＶを介して送達することができ、非相同末端結合によって標的ゲノム遺伝子座（例えば、本明細書の他の場所に記載のゲノムセーフハーバー遺伝子座）に挿入することができる（例えば、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まないものであり得る）。

【０３９８】

いくつかの核酸構築物は、非相同末端結合による挿入が可能である。場合によっては、

そのような核酸構築物は、ホモロジーアームを含まない。例えば、そのような核酸構築物は、Ｃａｓタンパク質による切断後の平滑末端二本鎖切断に挿入され得る。具体的な例では、核酸構築物は、ＡＡＶを介して送達され得、非相同末端結合による挿入が可能であり得る（例えば、核酸構築物は、ホモロジーアームを含まないものであり得る）。

【０３９９】

別の例では、核酸構築物は、ホモロジー非依存性標的化組み込みを介して挿入され得る。例えば、核酸構築物（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された、目的の産物をコードする核酸）は、各側にガイドＲＮＡ標的配列が隣接し得る（例えば、標的ゲノム遺伝子座と同じ標的部位、及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ試薬（Ｃａｓタンパク質及びガイドＲＮＡ）が標的ゲノム遺伝子座における標的部位を切断するために使用される）。次いで、Ｃａｓタンパク質は、核酸構築物（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された、目的の産物をコードする核酸）に隣接する標的部位を切断することができる。具体的な例では、核酸構築物は、ＡＡＶ媒介送達で送達され、核酸構築物に隣接する標的部位（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された、目的の産物をコードする核酸）の切断は、ＡＡＶの逆位末端反復（ＩＴＲ）を除去することができる。いくつかの方法では、標的ゲノム遺伝子座中の標的部位（例えば、隣接するプロトスペーサー隣接モチーフを含むガイドＲＮＡ標的配列）は、核酸構築物（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された、目的の産物をコードする核酸）が第１の向きで標的ゲノム遺伝子座に挿入されている場合にはもはや存在しないが、核酸構築物（すなわち、プロモーターに作動可能に連結された、目的の産物をコードする核酸）が反対の向きで標的ゲノム遺伝子座に挿入されている場合には再形成される。

【０４００】

本明細書に開示される方法は、目的の産物をコードする核酸構築物、及び任意選択的に、核酸（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ）、タンパク質、又は核酸－タンパク質複合体の形態を含む、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ試薬などのヌクレアーゼ剤を、対象（例えば、動物又はヒトなどの哺乳動物）又は細胞に導入すること、又は投与することを含み得る。「導入すること」又は「投与すること」は、細胞の内部又は対象内の細胞の内部にアクセスできるような様式で、細胞又は対象に分子（例えば、核酸又はタンパク質）を提示することが含まれる。導入することは、任意の手段によって達成され得、構成要素のうちの２つ以上（例えば、構成要素のうちの２つ、又は構成要素の全て）を、任意の組み合わせで同時に又は逐次的に細胞又はｔ対象に導入し得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡの導入前に細胞又は対象に導入され得る、又はガイドＲＮＡの導入後に導入され得る。別の例として、核酸構築物は、Ｃａｓタンパク質及びガイドＲＮＡの導入前に導入され得るか、又はＣａｓタンパク質及びガイドＲＮＡの導入後に導入され得る（例えば、核酸構築物は、Ｃａｓタンパク質及びガイドＲＮＡの導入の約１、２、３、４、８、１２、２４、３６、４８、又は７２時間前又は後に投与され得る）。例えば、米国特許出願公開第２０１５／０２４０２６３号及び同第２０１５／０１１０７６２号を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。加えて、成分のうちの２つ以上は、同じ送達方法又は異なる送達方法によって細胞又は対象に導入され得る。同様に、成分のうちの２つ以上は、同じ投与経路又は異なる投与経路によって対象に導入され得る。

【０４０１】

ガイドＲＮＡは、例えば、ＲＮＡ（例えば、インビトロ転写ＲＮＡ）の形態で、又はガイドＲＮＡをコードするＤＮＡの形態で、対象又は細胞に導入され得る。ガイドＲＮＡは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。ＤＮＡの形態で導入されると、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、細胞内で又は対象における細胞内で活性であるプロモーターに作動可能に連結され得る。例えば、ガイドＲＮＡは、ＡＡＶを介して送達され、Ｕ６プロモーターの下で、インビボで発現させてもよい。そのようなＤＮＡは、１つ以上の発現構築物中にあり得る。例えば、そのような発現構築物は、単一の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及び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）。

【０４０２】

同様に、Ｃａｓタンパク質は、任意の形態で提供され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質は、ｇＲＮＡと複合体を形成したＣａｓ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、Ｃａｓタンパク質は、ＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））又はＤＮＡなどの、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸の形態で提供され得る。Ｃａｓ　ＲＮＡは、本明細書の他の場所に開示されるように修飾され得る。任意選択的に、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞又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され得る。例えば、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、哺乳動物細胞、ヒト細胞、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、又は任意の他の目的の宿主細胞においてより高い頻度で使用される代替コドンへと修飾され得る。Ｃａｓタンパク質をコードする核酸が細胞又は対象に導入されると、Ｃａｓタンパク質は、一過性に、条件付きで、又は構成的に細胞内で又は対象における細胞内で発現され得る。

【０４０３】

Ｃａｓタンパク質又はガイドＲＮＡ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、遺伝子又は他の目的の核酸配列（例えば、Ｃａｓ遺伝子）の発現を指示することができ、そのような目的の核酸配列を標的細胞に移入することができる任意の核酸構築物を含む。例えば、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、１つ以上のｇＲＮＡをコードするＤＮＡを含むベクター内にあり得る。代替的に、それは、１つ以上のｇＲＮＡをコードするＤＮＡを含むベクターとは別のベクター又はプラスミド内にあり得る。発現構築物で使用され得る好適なプロモーターには、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、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、成体幹細胞、発達的に制限された前駆細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、又は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。例えば、好適なプロモーターは、肝細胞などの肝臓細胞において活性であり得る。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、又は組織特異的プロモーターであり得る。任意選択的に、プロモーターは、一方向のＣａｓタンパク質及び他の方向のガイド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。そのような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）、及び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、並びに（２）ＤＳＥの５’末端に逆方向に融合されたＰＳＥ及びＴＡＴＡボックスを含む第２の基本的なＰｏｌ　ＩＩＩプロモーターからなり得る。例えば、Ｈ１プロモーターでは、ＤＳＥはＰＳＥ及び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及び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、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１６／００７４５３５号を参照されたい。双方向プロモーターを使用してＣａｓタンパク質及びガイド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を可能にする。好ましい実施形態では、プロモーターは、ヒトにおける使用について規制当局によって承認されている。特定の実施形態では、プロモーターは、肝臓細胞における発現を駆動する。

【０４０４】

対象又は細胞に導入された分子（例えば、Ｃａｓタンパク質又はガイドＲＮＡ又は核酸をコードする）は、導入された分子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℃、又は周囲温度）で、分解産物が閾値未満、例えば出発核酸又は

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か、又はインビボでの安定性を増加させる）担体を含む組成物で提供され得る。そのような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、及び脂質微小管が含まれる。

【０４０５】

細胞又は対象への分子（例えば、核酸又はタンパク質）の導入を可能にするために、様々な方法及び組成物が本明細書で提供される。分子を種々の細胞型に導入するための方法は既知であり、例えば、安定したトランスフェクション法、一過性トランスフェクション法、及びウイルス媒介法が含まれる。

【０４０６】

トランスフェクションプロトコル、及び分子を細胞に導入するためのプロトコルは様々であり得る。非限定的なトランスフェクション法としては、リポソーム、ナノ粒子、リン酸カルシウム（Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．（１９７３）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ５２（２）：４５６－６７、Ｂａｃｃｈｅｔｔｉ ｅｔ ａｌ．（１９７７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７４（４）：１５９０－４、及びＫｒｉｅｇｌｅｒ，Ｍ（１９９１）．Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ．ｐｐ．９６－９７）、デンドリマー、又はＤＥＡＥ－デキストラン若しくはポリエチレンイミンなどのカチオン性ポリマーを使用した化学物資ベースのトランスフェクション法が挙げられる。非化学的方法には、電気穿孔法、ソノポレーション、及び光トランスフェクションが含まれる。粒子ベースのトランスフェクションには、遺伝子銃の使用、又は磁石支援トランスフェクション（Ｂｅｒｔｒａｍ（２００６）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７，２７７－２８）が含まれる。ウイルス法もトランスフェクションに使用され得る。

【０４０７】

細胞への核酸又はタンパク質の導入はまた、電気穿孔法、細胞質内注射、ウイルス感染、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、トランスフェクション、脂質媒介トランスフェクション、又はヌクレオフェクションによって媒介され得る。ヌクレオフェクションは、核酸基質を細胞質だけでなく核膜を介して核に送達することを可能にする改善された電気穿孔法技術である。加えて、本明細書に開示される方法でのヌクレオフェクションの使用は、典型的には、通常の電気穿孔法よりもはるかに少ない細胞を必要とする（例えば、通常の電気穿孔法による７００万に対してわずか約２００万）。一例では、ヌクレオフェクションは、ＬＯＮＺＡ（登録商標）ＮＵＣＬＥＯＦＥＣＴＯＲ（商標）系を使用して実施される。

【０４０８】

細胞（例えば、接合子）への分子（例えば、核酸又はタンパク質）の導入は、マイクロインジェクションによっても達成され得る。接合子（すなわち、１細胞期胚）では、マイクロインジェクションは母方及び／又は父方の前核又は細胞質に行うことができる。マイクロインジェクションが１つの前核のみに行われる場合は、サイズが大きいため、父方の前核が適している。ｍＲＮＡのマイクロインジェクションは、好ましくは細胞質へ（例えば、ｍＲＮＡを翻訳機構に直接送達するために）のものであるが、一方で、Ｃａｓタンパク質若しくはＣａｓタンパク質をコードするか又はＲＮＡをコードするポリヌクレオチドのマイクロインジェクションは、核／前核へのものが好ましい。代替的に、マイクロインジェクションは、核／前核及び細胞質の両方への注射によって実施することができ、針を最初に核／前核に導入し、最初の量を注射することができ、１細胞期胚から針を除去しながら、２番目の量を細胞質に注射することができる。Ｃａｓタンパク質が細胞質に注入される場合、Ｃａｓタンパク質は、核／前核への送達を確実にするために、核局在化シグナルを含むことが好ましい。マイクロインジェクションを実施する方法は周知である。例えば、Ｎａｇｙ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｇｙ Ａ，Ｇｅｒｔｓｅｎｓｔｅｉｎ Ｍ，Ｖｉｎｔ

ｅｒｓｔｅｎ Ｋ，Ｂｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｒ．，２００３，Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｍｏｕｓｅ Ｅｍｂｒｙｏ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）を参照されたく、同じくＭｅｙｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７：１５０２２－１５０２６、及びＭｅｙｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０９：９３５４－９３５９を参照されたく、それらの各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０４０９】

分子（例えば、核酸又はタンパク質）を細胞又は対象に導入するための他の方法には、例えば、ベクター送達、粒子媒介送達、エクソソーム媒介送達、脂質ナノ粒子媒介送達、細胞透過性ペプチド媒介送達、又は埋め込み型デバイス媒介送達が含まれ得る。具体的な例として、核酸又はタンパク質は、ポリ（乳酸）（ＰＬＡ）マイクロスフェア、ポリ（Ｄ，Ｌ－乳酸－コグリコール酸）（ＰＬＧＡ）マイクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コキレート、又は脂質微小管などの担体中で、細胞又は対象に導入され得る。対象への送達のいくつかの具体的な例には、流体力学的送達、ウイルス媒介送達（例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介送達）、及び脂質ナノ粒子媒介送達が含まれる。

【０４１０】

細胞又は対象への核酸及びタンパク質の導入は、流体力学的送達（hydrodynamicdelivery、ＨＤＤ）によって達成され得る。実質細胞への遺伝子送達では、必須のＤＮＡ配列のみを選択した血管から注射する必要があり、現在のウイルス及び合成ベクターに関連する安全性の懸念が排除される。ＤＮＡは血流に注入されると、血液にアクセスできる様々な組織の細胞に到達することができる。流体力学的送達は、循環中の非圧縮性血液への大量の溶液の迅速な注射によって生成される力を利用して、大きくかつ膜不透過性の化合物が実質細胞に入るのを妨げる内皮及び細胞膜の物理的障壁を克服する。ＤＮＡの送達に加えて、この方法は、ＲＮＡ、タンパク質、及び他の小さな化合物をインビボで効率的に細胞内に送達するのに有用である。例えば、Ｂｏｎａｍａｓｓａ ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．２８（４）：６９４－７０１を参照されたく、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０４１１】

核酸の導入は、ＡＡＶ媒介送達又はレンチウイルス媒介送達などのウイルス媒介送達によっても達成され得る。他の例示的なウイルス／ウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、及び単純ヘルペスウイルスが含まれる。ウイルスは、分裂細胞、非分裂細胞、又は分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染し得る。ウイルスは、宿主ゲノムに組み込まれ得る、又は代替的に宿主ゲノムに組み込まれない。このようなウイルスは、免疫性が低減するようにも操作され得る。ウイルスは、複製可能であり得、複製欠損性であり得る（例えば、ビリオン複製及び／又はパッケージングの追加ラウンドに必要な１つ以上の遺伝子に欠損がある）。ウイルスは、一過性発現又はより長く持続する発現を引き起こし得る。ウイルスベクターは、それらの野生型対応物から遺伝的に改変され得る。例えば、ウイルスベクターは、クローニングを容易にするために、又はベクターの１つ以上の特性が変化するように、１つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、又は置換を含み得る。そのような特性には、パッケージング容量、形質導入効率、免疫原性、ゲノム組み込み、複製、転写、及び翻訳が含まれ得る。いくつかの例では、ウイルスゲノムの一部は、ウイルスがより大きなサイズを有する外因性配列をパッケージングすることができるように欠失され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、増強された形質導入効率を有し得る。いくつかの例では、宿主においてウイルスによって誘導される免疫応答が低減されてもよい。いくつかの例では、宿主ゲノムへのウイルス配列の組み込みを促進するウイルス遺伝子（インテグラーゼなど）は、ウイルスが非組み込み型になるように変異され得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、複製欠損であり得る。いくつかの例では、ウイルスベクターは、ベクター上のコード配列の発現を

駆動するための外因性転写又は翻訳制御配列を含み得る。いくつかの例では、ウイルスは、ヘルパー依存性であり得る。例えば、ウイルスは、ベクターを増幅してウイルス粒子にパッケージングするのに必要とされるウイルス成分（ウイルスタンパク質など）を供給するために、１つ以上のヘルパー成分を必要とし得る。そのような場合、ウイルス成分をコードする１つ以上のベクターを含む１つ以上のヘルパー成分が、本明細書に記載のベクター系と共に宿主細胞又は宿主細胞の集団に導入され得る。他の例では、ウイルスは、ヘルパーフリーであり得る。例えば、ウイルスは、ヘルパーウイルスなしでベクターを増幅及びパッケージングすることができる。いくつかの例では、本明細書に記載のベクター系はまた、ウイルス増幅及びパッケージングに必要とされるウイルス成分をコードしてもよい。

【０４１２】

例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、約10^{12}～約10^{16}ｖｇ／ｍＬが挙げられる。他の例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）としては、体重の約10^{12}～約10^{16}ｖｇ／ｋｇが挙げられる。

【０４１３】

核酸及びタンパク質の導入は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）媒介送達によっても達成され得る。例えば、ＬＮＰ媒介送達は、Ｃａｓ　ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡの組み合わせ、又はＣａｓタンパク質及びガイドＲＮＡの組み合わせを送達するために使用され得る。ＬＮＰ媒介送達は、ＲＮＡの形態でガイドＲＮＡを送達するために使用され得る。具体的な例では、ガイドＲＮＡ及びＣａｓタンパク質はそれぞれ、同じＬＮＰでのＬＮＰ媒介送達を介してＲＮＡの形態で導入される。本明細書の他の場所でより詳細に論じられるように、ＲＮＡのうちの１つ以上が修飾され得る。そのような方法による送達は、一過性のＣａｓ発現及び／又は一過性のガイドＲＮＡの存在をもたらし得、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し得る。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（単層及び多層ベシクル、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、又は懸濁液中の内相が含まれる。そのような脂質ナノ粒子は、送達のために１つ以上の核酸又はタンパク質をカプセル化するために使用され得る。カチオン性脂質を含有する製剤は、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、非荷電又は両性イオン脂質）、アニオン性脂質、トランスフェクションを増強するヘルパー脂質、及びナノ粒子がインビボで存在することができる時間の長さ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、及びステルス脂質の例は、全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、国際公開第２０１６／０１０８４０（Ａ１）号及び同第２０１７／１７３０５４（Ａ１）号に見出すことができる。

【０４１４】

特定のＬＮＰにおいて、カーゴは、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする核酸を含み得る。特定のＬＮＰでは、カーゴは、Ｃａｓ９などのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、及びガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする核酸を含み得る。ある特定のＬＮＰにおいて、カーゴは、核酸構築物を含み得る。ある特定のＬＮＰにおいて、カーゴは、Ｃａｓ９などのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコードする核酸、及び核酸構築物を含み得る。本方法における使用のためのＬＮＰについては、本明細書の他の場所でより詳細に記載する。

【０４１５】

免疫原性を低下させるために、送達様式が選択され得る。例えば、Ｃａｓタンパク質及びｇＲＮＡは、異なる様式（例えば、バイモーダル送達）によって送達され得る。これらの異なる様式は、対象の送達された分子（例えば、Ｃａｓ又は核酸をコードする、ｇＲＮＡ又は核酸をコードする、又は核酸構築物をコードする目的のポリペプチド）に異なる薬力学又は薬物動態特性を与える可能性がある。例えば、異なる様式は、異なる組織分布、

異なる半減期、又は異なる時間的分布をもたらす可能性がある。いくつかの送達様式（例えば、自律複製又はゲノム組み込みによって細胞内で持続する核酸ベクターの送達）は、分子のより持続的な発現及び存在をもたらすが、他の送達様式は、一過性で持続性が低い（例えば、ＲＮＡ又はタンパク質の送達）。例えばｍＲＮＡ又はタンパク質としてのより一時的な方法でのＣａｓタンパク質の送達は、Ｃａｓ／ｇＲＮＡ複合体が短期間のみ存在し、活性であることを保証し、ＭＨＣ分子によって細胞の表面に表示される細菌由来のＣａｓ酵素からのペプチドによって引き起こされる免疫原性を低下させ得る。そのような一過性な送達はまた、オフターゲット修飾の可能性を低減させ得る。

【０４１６】

インビボでの投与は、例えば、静脈内、皮下、動脈内、又は筋肉内などの非経口投与などの全身投与経路を含む、任意の適切な経路によるものであり得る。具体的な例では、インビボでの投与は、静脈内である。

【０４１７】

ガイドＲＮＡ及び／又はＣａｓタンパク質（又はガイドＲＮＡ及び／又はＣａｓタンパク質をコードする核酸）を含む組成物は、１つ以上の生理学的及び薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤又は助剤を使用して処方され得る。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は、担体、希釈剤、賦形剤、又は補助剤が、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。具体的な例では、投与経路及び／又は製剤、あるいは肝臓（例えば肝細胞）への送達のために選択される。

【０４１８】

本明細書に開示される方法は、細胞又は対象における目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）のレベル及び／又は目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の活性レベルを増加させることができ、細胞又は対象における目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）のレベル及び／又は活性レベルを測定することを含み得る。

【０４１９】

いくつかの方法は、治療有効量の目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）を発現させることを含む。必要とされる特定の発現レベルは、例えば、治療されるべき特定の疾患又は病態に依存する。

【０４２０】

対象が治療前に目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）を発現しなかったいくつかの方法において、この方法は、０を超える検出可能なレベルで、例えば、統計的に有意なレベル（例えば、臨床的に関連するレベル）で、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現をもたらす。

【０４２１】

いくつかの方法は、ヒトにおいて、少なくとも少なくとも８週間、少なくとも２４週間、例えば、少なくとも１年（５２週間）、又は任意選択的に、少なくとも２年の効果、及びいくつかの実施形態では、少なくとも３年、少なくとも４年、又は少なくとも５年の効果などの耐久性かつ持続性な効果を達成することを含む。いくつかの方法は、ヒトにおいて、少なくとも８週間、少なくとも２４週間、例えば、少なくとも１年、又は任意選択的に少なくとも２年の効果（例えば、治療効果）、また、いくつかの実施形態では、少なくとも３年、少なくとも４年、又は少なくとも５年の効果など永続的かつ持続的に効果を達成することを含む。いくつかの方法では、ヒトにおける増加した、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の活性及び／又は発現レベルは、少なくとも８週間、少なくとも２４週間、例えば、少なくとも１年、任意選択的に、少なくとも２年、及びいくつかの実施形態では、少なくとも３年、少なくとも４年、又は少なくとも５年間安定している。いくつかの方法では、ヒトにおける目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の定常状態の活性及び／又はレベルは、少なくとも７日間、少なくとも１４日間、又は少なくとも２８日間、任意選択的に、少なくとも５６日間、少なくとも８０日間、又は少なくとも９６日間で達成される。追加の方法では、本方法は、少なくとも８週間、少なくとも１６週間、

若しくは少なくとも２４週間、又はいくつかの実施形態では、少なくとも１年間、若しくは少なくとも２年間、任意選択的に少なくとも３年間、少なくとも４年間、若しくは少なくとも５年間、ヒトにおける単回用量後の目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の活性及び／又はレベルを維持することを含む。例えば、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現は、ヒト対象において、治療後少なくとも約８週間、少なくとも約１２週間、少なくとも約２４週間、特定の実施形態では、少なくとも約１年間、又は少なくとも約２年間、及びいくつかの実施形態では、治療後少なくとも３年間、少なくとも４年間、又は治療後少なくとも５年間持続され得る。同様に、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の活性は、ヒト対象において、治療後少なくとも約８週間、少なくとも約１２週間、少なくとも約２４週間、特定の実施形態では、治療後少なくとも約１年間、又は少なくとも約２年間、及びいくつかの実施形態では、治療後少なくとも３年間、少なくとも４年間、又は治療後少なくとも５年間持続され得る。いくつかの方法では、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性は、治療前の目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性（すなわち、対象のベースライン）よりも高いレベルで維持される。いくつかの方法では、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性は、治療有効レベルの発現又は活性で維持される場合、持続しているとみなされる。他の生物における相対的持続期間は、例えば、寿命及び発育段階に基づいて理解され、上記の開示内に包含される。いくつかの方法では、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性は、投与の６ヶ月後、投与の１年後、又は投与の２年後のヒトにおける発現又は活性、発現又は活性が、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％である場合、「持続している」とみなされる。ある特定の実施形態では、投与の６ヶ月後、例えば、２４週間～２８週間で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、又は８０％である。ある特定の実施形態では、投与の１年後、すなわち、約１２ヶ月、例えば、１１～１３ヶ月で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、又は８０％である。ある特定の実施形態では、投与の２年後、すなわち、約２４ヶ月、例えば、２３～２５ヶ月で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、又は８０％である。特定の実施形態では、投与の６ヶ月後で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、好ましくは少なくとも６０％である。特定の実施形態では、投与の１年後で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、好ましくは少なくとも６０％である。特定の実施形態では、投与の２年後で、発現又は活性は、その対象について測定された発現又は活性のピークレベルの発現又は活性の少なくとも５０％、好ましくは少なくとも６０％である。好ましい実施形態では、対象は、例えば、毎週、毎月、特に、投与後早期に、例えば、最初の６ヶ月以内に、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性レベルの日常的なモニタリングを有する。定期的な測定は、発現又は活性に対する効果が、例えば、投与の６ヶ月後、投与の１年後、又は投与の２年後に持続されることを証明し得る。

【０４２２】

いくつかの方法では、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性は、投与２４週間後にヒト対象について測定された発現のピークレベルでの目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかの方法では、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性は、投与１年後にヒト対象について測定された発現のピークレベルでの目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかの方法では、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性は、投与２４週間後にヒト対象について測定された発現のピークレベルでの目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性の

少なくとも６０％である。いくつかの方法では、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性は、投与２年後にヒト対象について測定された発現のピークレベルでの目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性の少なくとも５０％である。いくつかの方法では、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性は、投与２年後にヒト対象について測定された発現のピークレベルでのポリペプチドの発現又は活性の少なくとも６０％である。いくつかの方法では、目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性は、投与２４週間後にヒト対象について測定された発現のピークレベルでの目的の産物（例えば、目的のポリペプチド）の発現又は活性の少なくとも６０％である。

【０４２３】

上記又は下記で引用されている全ての特許出願、ウェブサイト、他の刊行物、アクセッション番号などは、各個々の項目が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されたのと同じ程度に、全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。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又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、工程、要素、実施形態、又は態様を、任意の他のものと組み合わせて使用し得る。本発明は、明瞭さ及び理解の目的に対し図表及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の範囲内で、特定の変化及び修正を実施することができることが明らかになろう。

【０４２４】

配列の簡単な説明

添付の配列表にリストされているヌクレオチド及びアミノ酸配列は、ヌクレオチド塩基のための標準的な文字略語、及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一本の鎖のみが示されているが、相補的鎖は、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変異体もまた提供されることが理解される。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。

【０４２５】

【表２－１】

表２．配列の説明

配列番号	種類	説明
1	タンパク質	Cas9タンパク質
2	DNA	Cas9 CDS
3	タンパク質	SV40 NLS v1
4	タンパク質	SV40 NLS v2
5	タンパク質	ヌクレオプラスミンNLS
6	RNA	crRNAテールv1
7	RNA	crRNAテールv2
8	RNA	TracrRNA v1
9	RNA	TracrRNA v2
10	RNA	TracrRNA v3
11	RNA	gRNA足場v1
12	RNA	gRNA足場v2
13	RNA	gRNA足場v3
14	RNA	gRNA足場v4
15	RNA	gRNA足場v5
16	RNA	gRNA足場v6
17	RNA	gRNA足場v7
18	RNA	gRNA足場v8
19	DNA	ガイドRNA標的配列及びPAM v1
20	DNA	ガイドRNA標的配列及びPAM v2
21	DNA	ガイドRNA標的配列及びPAM v3
22	DNA	L－SH5．1 gRNA標的部位
23	DNA	L－SH18．2 gRNA標的部位
24	DNA	L－SH20．1 gRNA標的部位
25	RNA	L－SH5．1ガイド配列
26	RNA	L－SH18．2ガイド配列
27	RNA	L－SH20．1ガイド配列
28	RNA	L－SH5．1 sgRNA
29	RNA	L－SH18．2 sgRNA
30	RNA	L－SH20．1 sgRNA
31	タンパク質	T2A
32	タンパク質	P2A
33	タンパク質	E2A
34	タンパク質	F2A
35	DNA	L－SH4．2 gRNA標的部位
36	DNA	L－SH11 gRNA標的部位
37	DNA	L－SH14．2 gRNA標的部位
38	DNA	L－SH17 gRNA標的部位
39	DNA	L－SH5ゲノムセーフハーバー
40	DNA	L－SH18ゲノムセーフハーバー
41	DNA	L－SH20ゲノムセーフハーバー
42	DNA	L－SH5．2 gRNA標的部位
43	DNA	L－SH18．1 gRNA標的部位
44	DNA	L－SH20．2 gRNA標的部位
45	RNA	L－SH5．2ガイド配列
46	RNA	L－SH18．1ガイド配列
47	RNA	L－SH20．2ガイド配列
48	RNA	L－SH5．2 sgRNA
49	RNA	L－SH18．1 sgRNA
50	RNA	L－SH20．2 sgRNA
51～79	DNA	ヒトL－SH5 gRNA標的部位
80～108	DNA	ヒトL－SH18 gRNA標的部位
109～137	DNA	ヒトL－SH20 gRNA標的部位
138～167	DNA	マウスL－SH5 gRNA標的部位
168～197	DNA	マウスL－SH18 gRNA標的部位
198～227	DNA	マウスL－SH20 gRNA標的部位
228～256	RNA	ヒトL－SH5 gRNAガイド配列

【表２－２】

（表２の続き）

配列番号	種類	説明
257～285	RNA	ヒトL－SH18 gRNAガイド配列
286～314	RNA	ヒトL－SH20 gRNAガイド配列
315～344	RNA	マウスL－SH5 gRNAガイド配列
345～374	RNA	マウスL－SH18 gRNAガイド配列
375～404	RNA	マウスL－SH20 gRNAガイド配列
405	DNA	マウスシンテニーL－SH5ゲノムセーフハーバー
406	DNA	マウスシンテニーL－SH18ゲノムセーフハーバー
407	DNA	マウスシンテニーL－SH20ゲノムセーフハーバー

【実施例】

【０４２６】

実施例１．遺伝子治療法のための肝臓遺伝子外セーフハーバーの同定

肝臓においてアクセス可能な遺伝子外ゲノム遺伝子座を同定するために、図１に示すように系統的手法を使用した。まず肝臓においてアクセス可能なクロマチン部位を同定するために、本発明者らは、ヒト肝生検由来のＡＴＡＣ－Ｓｅｑデータセットを特異的に使用した。これは、異なる組織及び細胞型にわたってクロマチン状態が大きく異なり得るためである。健康なヒト肝生検において、合計１５，３４９個の特有のＡＴＡＣ－Ｓｅｑピークを同定した。次いで、表３に示すセーフハーバー基準を使用して、編集したゲノム遺伝子座リストをフィルタリングした。

【０４２７】

【表３】

表３．推定ゲノムセーフハーバーの同定

ゲノムセーフハーバー基準	合格
1. 任意のがん関連遺伝子から300kb超（724遺伝子）	11，353（74%）
2. 任意のmiRNA／低分子RNAから300kb超（1，340遺伝子）	11，468（75%）
3. 任意の5’から50kb超	172（1%）
4. 任意の複製起点から50kb超離れている	11，464（75%）
5. 任意の超保存エレメントから50kb超離れている	15，026（99%）
6. コピー数可変領域にない（特有）	5，744（37%）

【０４２８】

１５，３４９個のＡＴＡＣ－Ｓｅｑピークのうち、４４個が、本発明者らがゲノムセーフハーバーに使用した基準に合格した。次いで、潜在的なセーフハーバーのリストを、初代ヒト肝細胞においてスクリーニングして、２つの十分に特徴付けられた肝臓遺伝子内遺伝子座の十分に特徴付けられたｇＲＮＡ（陽性対照）及び非標的化ｇＲＮＡ（陰性対照）と比較して、遺伝子座ごとに編集効率を決定した。肝臓の場合、本発明者らは、４４個のＡＴＡＣ－Ｓｅｑピークを同定し、これに対して本発明者らは、２０個の遺伝子座をカバーする、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９で機能する３３個のｇＲＮＡ（高スコア、オフターゲットなし／低オフターゲット）を設計することができた。これらの３３個のｇＲＮＡのうち、本発明者らは、良好な編集効率を有し、７つの潜在的なセーフハーバーを編集することができる７つのｇＲＮＡを同定した。図２を参照されたい。

【０４２９】

次いで、編集スクリーニングに合格したこの遺伝子座のリストを手動でキュレートして、クロマチンマークについてＣｈｉｐ Ｓｅｑデータに基づいてクロマチン環境を分析して、調節領域（Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３）、ヘテロクロマチン

領域（Ｈ３Ｋ９ｍｅ３）であると予測される領域に含まれるか、又はクロマチン構成（ＣＴＣＦシグナル）に関与する任意の潜在的なセーフハーバーを分析には不適格とした。例えば、不適格とした遺伝子座については図３Ａ～図３Ｃ、選択した遺伝子座については図３Ｄ～図３Ｆを参照されたい（表４に要約した）。

【０４３０】

【表４】

表４．肝臓遺伝子外ゲノムセーフハーバーの候補

潜在的なセーフハーバー	ゲノム位置GRCh38／hg38	gRNA名	sgRNA標的部位	クロマチン状態：
Ｌ－SH4	chr10:78756604～78757133	Ｌ－SH4．2	ACCACGCCTATGTAGACAAC（配列番号35）	H3K27Acとの重複
Ｌ－SH5	chr13:77460242～77460537	Ｌ－SH5．1	GCTTACATTTGCCACAGGCG（配列番号22）	許容
Ｌ－SH11	chr3:152961316～152961802	Ｌ－SH11	GCCAAACTCAAACCAGTCCG（配列番号36）	CTCFとの重複
Ｌ－SH14	chr4:99723588～99723981	Ｌ－SH14．2	TTGGCAAATCGTGTTGGCTG（配列番号37）	H3K27Acとの重複
Ｌ－SH17	chr6:16985841～16986296	Ｌ－SH17	CCAGTTTATCGTAGAGCACA（配列番号38）	H3K27Acとの重複
Ｌ－SH18	chr6:170031084～170031382	Ｌ－SH18．2	GGCACCATCTGCGCCGAGCT（配列番号23）	許容
Ｌ－SH20	chr9:25207412～25207703	Ｌ－SH20．1	GGTCCAGCAAATACTAGATT（配列番号24）	許容

【０４３１】

表５に示すように、遺伝子外セーフハーバー遺伝子座の上位３候補を同定した。Ｃａｓ９、ｍＲＮＡ、及びｇＲＮＡのトランスフェクション後又は脂質ナノ粒子における送達後に、修復が挿入をもたらしたか、又は欠失をもたらしたかの評価を含む、初代ヒト肝細胞における編集効率を、図４Ａ及び図４Ｂにそれぞれ示す。

【０４３２】

【表５】

表５．肝臓遺伝子外ゲノムセーフハーバー

潜在的なセーフハーバー	ゲノム位置GRCh38／hg38	gRNA名	sgRNA標的部位	配列番号
Ｌ－SH5	chr13:77460242～77460537	Ｌ－SH5．1	GCTTACATTTGCCACAGGCG	22
Ｌ－SH18	chr6:170031084～170031382	Ｌ－SH18．2	GGCACCATCTGCGCCGAGCT	23
Ｌ－SH20	chr9:25207412～25207703	Ｌ－SH20．1	GGTCCAGCAAATACTAGATT	24

【０４３３】

次いで、Ｌ－ＳＨ５、Ｌ－ＳＨ１８、及びＬ－ＳＨ２０ゲノム遺伝子座への挿入について、核酸構築物と組み合わせて上位３候補を試験した。核酸構築物は、組換えＡＡＶ－ＤＪベクターにパッケージングされた、ＣＭＶプロモーターに作動可能に連結されたホタルルシフェラーゼ（ＦＬｕｃ）コード配列を含んでいた。ＡＡＶ－ＤＪ構築物並びにＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡを含む脂質ナノ粒子をＨｅｐＧ２細胞に送達し、図５に示すように編集効率を評価した。ＦＬｕｃシグナルはまた、未処理対照及び非標的化ｓｇＲＮＡを使用した陰性対照と比較して評価した。結果を図６に示す。ＡＡＶ－ＤＪ構築物並びにＣａｓ９　ｍＲＮＡ及びｓｇＲＮＡを含む脂質ナノ粒子を初代ヒト肝細胞に送達し、図７に示すように編集効率を評価した。ＦＬｕｃシグナルはまた、非標的化ｓｇＲＮＡを使

用した陰性対照と比較して評価した。３つの異なる用量のＡＡＶについての結果を図８に示す。

【０４３４】

次いで、肝臓ヒト化マウス（すなわち、初代ヒト肝細胞を移植したＦａｈ（－／－）マウス）におけるインビボ検証について上位３候補を検討した。図９を参照されたい。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ成分（ｓｇＲＮＡ及びＣａｓ９　ｍＲＮＡ）及び挿入テンプレートを含む組換えＡＡＶ－ＤＪベクター（ＣＭＶ－ＦＬｕｃ）を含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を初代ヒト肝細胞に投与し、次いでマウスに初代ヒト肝細胞を移植する。未処理の初代ヒト肝細胞を移植したマウスを第１の陰性対照として使用する。第２の陰性対照は、組換えＡＡＶ－ＤＪベクター並びにＣａｓ９　ｍＲＮＡ及び非標的化ｓｇＲＮＡを含むＬＮＰで処置した初代ヒト肝細胞を移植したマウスの群を含む。特定の各遺伝子座における組み込みを評価し、以下の読み出し、すなわち、（ｉ）ＭＲＩによる長期発現（最大１年）、（ｉｉ）特異的ＥＬＩＳＡによる肝毒性（ＡＬＴ、Ａｓｔ、ビリルビン）、（ｉｉｉ）ＲＮＡＳｅｑによる遺伝子発現変化をモニターする。

【０４３５】

次いで、肝臓ヒト化マウス（すなわち、初代ヒト肝細胞を移植したＦａｈ（－／－）マウス）における追加のインビボ検証について上位３候補を検討する。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ成分（ｓｇＲＮＡ及びＣａｓ９　ｍＲＮＡ）及び挿入テンプレートを含む組換えＡＡＶ－ＤＪベクター（ＣＭＶ－ＦＬｕｃ）を含む脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を、初代ヒト肝細胞を移植したＦａｈ（－／－）マウスに投与する。未処置マウスは、第１の陰性対照である。第２の陰性対照は、組換えＡＡＶ－ＤＪベクター並びにＣａｓ９　ｍＲＮＡ及び非標的化ｓｇＲＮＡを含むＬＮＰで処置したマウスの群を含む。特定の各遺伝子座における組み込みを評価し、以下の読み出し、すなわち、（ｉ）ＭＲＩによる長期発現（最大１年）、（ｉｉ）特異的ＥＬＩＳＡによる肝毒性（ＡＬＴ、Ａｓｔ、ビリルビン）、（ｉｉｉ）ＲＮＡＳｅｑによる遺伝子発現変化をモニターする。

【０４３６】

実施例２．ヒト化肝臓マウスモデルにおけるセーフハーバー遺伝子座の標的化の安全性プロファイル

治療目的で選択した潜在的なセーフハーバー遺伝子座の標的化の安全性プロファイルを検証するために、図１０に示すように、ＣＭＶプロモーターによって駆動される導入遺伝子（ＦＬｕｃ）を初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）のこれらの部位に挿入して、肝臓への治療用導入遺伝子の挿入を受けているヒト患者において生じるであろうことを模倣した。次に、図１１に示すように、これらの修飾ＰＨＨをレシピエントＦＲＧマウスに移植して、ヒト化肝臓マウスモデルを確立した。

【０４３７】

発現カセットのＰＨＨへの送達は、ＡＡＶ血清型ＤＪを用いてＭＯＩ　10^5ゲノムコピー／細胞で行った。細胞を、１μｇ／ｍＬの濃度のＬＮＰ－Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ及び遺伝子座を標的とするｓｇＲＮＡで更に処理して、二本鎖切断を作製し、挿入を容易にした。

【０４３８】

培養４日後、ＰＨＨをＦＲＧマウスに移植し、ヒト対応物によるマウス肝臓の再増殖を可能にした。ＦＲＧマウスは、Ｆａｈ（－／－）、Ｒａｇ－２（－／－）、及びインターロイキン２受容体共通γ鎖（－／－）である。これらの三重変異体マウスは、２つの遺伝子座において免疫不全であり、Ｆａｈ欠損によって提供される選択圧を依然として保持していた。チロシンの異化経路における遺伝子であるフマリルアセトアセテートヒドロラーゼ（Ｆａｈ）を欠失させ、毒性代謝産物の蓄積を遮断し、肝臓損傷を予防する薬物２－（２－ニトロ－４－トリフルオロ－メチルベンゾイル）１，３－シクロヘキサジオン（ＮＴＢＣ）をマウスに給餌することによって、マウスを健康な状態に保つ。ＰＨＨを移植した場合、マウスＦＲＧマウスではＮＴＢＣを除去し、したがって、マウス肝細胞をヒト対応物（野生型ＦＡＨ機能を保有する）で置換し、マウス肝臓を再増殖させる。

【０４３９】
この系を選択して、導入遺伝子の長期発現をモニターし、組織学及び肝臓の肝臓血清化学に基づいて肝臓生理学をモニターし、したがって、これらの遺伝子座を標的化した後のこのような手法の安全性を確立した。
【０４４０】
図１２に示すように、連続生着時に高レベルのヒトアルブミン（ｈＡＬｂ）を検出し、正確かつ生産的な生着を示した。最初の処置の１２ヶ月後、ＦＬｕｃ発現をＩＶＩＳイメージングによってアッセイし、強いシグナルを検出した。これは、導入遺伝子の組み込みを示唆する（図１３）。ＰＨＨは生着時に急速に複製されるので、未処置群に示されるように、ＡＡＶのエピソームコピーは失われるはずである（図１３の左上）。
【０４４１】
個々のマウスから血清を収集して、肝臓化学が処置時に変化したか否かを評価した。図１４Ａ～図１４Ｃに示すように、肝臓機能のマーカーであるＡＬＴ、ＡＳＴ、及びＡＬＰは、処置群と未処置群との間で一致しており、これらの遺伝子座を標的とすることによって大きな有害作用は生じなかったことを示唆した。図１４Ｄに示すように、ビリルビンは処置群において減少した。しかしながら、低レベルのビリルビンは、いかなる医学的状態にも関連付けられておらず、有害な影響は、ヒト患者におけるこの減少に関連付けられていない。ビリルビンのこの減少の原因は十分に理解されていない。更に、図１４Ｅに示すように、処置群と未処置群との間で体重差は観察されなかった。
【０４４２】
外因性ＤＮＡをゲノムＤＮＡに挿入することの主な懸念の１つは潜在的な発癌効果であるため、活性な発癌性形質転換を示す肝臓における増殖のマーカーとしてＫｉ６７を、アッセイした。Ｋｉ６７は、いかなる有意な染色ももたらさず（図１５、下列）、Ｈ＆Ｅ染色によって確認されるように腫瘍が形成されないことを示唆した（図１５、上列）。加えて、２つのヒト肝臓特異的遺伝子であるヒトＡＳＧＲ１及びヒトＦＡＨについての染色は、これらのマウス肝臓の高度のヒト化を示した（図１５、中央列）。
【０４４３】
まとめると、これらの結果は、ＣＭＶプロモーターによって駆動される導入遺伝子の挿入によるこれらの遺伝子座の操作が、マウス／肝臓生理学に有害な影響を及ぼさないことを示し、したがって、これらの遺伝子座をヒト治療のための安全なハーバーとして確立する。
【０４４４】
実施例３．シンテニーマウス領域の同定
同定したセーフハーバーに対応するシンテニーマウス領域を同定するために、比較ゲノム解析用のＥｎｓｅｍｂｌゲノムブラウザにおいてヒトゲノム座標を使用した。シンテニー分析は、種間のゲノムブロックの保存された順序の同定に依存する。これは、両種が染色体レベルのアセンブリを有する場合に、Ｅｎｓｅｍｂｌで作成したペアワイズゲノムアラインメントから計算した。検索は２段階で行った。すなわち、（１）２つのゲノムで同じ順序のアラインメントブロックを検索し、２００ｋｂよりも近かったシンテニーアライメントをシンテニーブロックにグループ化し、（２）シンテニーに含まれるグループを連結した。ただし、それらの間に２つ以下の非シンテニーグループが見出され、これらは３Ｍｂ未満離れていた。
【０４４５】
本発明者らは、全ての３つのヒト領域について、図１６～図１８に示すようにマウスシンテニーブロックを同定した。図は、潜在的なヒトセーフハーバーを含有するヒト染色体領域（矢印によって示す）と、同じアライメント順序を有する対応するマウス染色体のブロックとの間のアライメントブロックを示す。
【０４４６】

【表６】

表６．マウス肝臓遺伝子外ゲノムセーフハーバーの候補

潜在的なセーフハーバー	マウスゲノム位置（GRCm38／mm10）
シンテニーセーフハーバーSH5	chr14:103，450，397～103，451，396
シンテニーセーフハーバーSH18	chr17:15，226，387～15，227，386
シンテニーセーフハーバーSH20	chr4:92，827，563～92，828，592

【０４４７】

実施例４．ｇＲＮＡの同定

ヒトＳＨ５、ＳＨ１８、及びＳＨ２０ゲノムセーフハーバー部位（＋／－５ｋｂ）を標的とするガイドＲＮＡを、以下の表７～表９に提供する。イタリック体のガイドＲＮＡは、ゲノムセーフハーバー遺伝子座（ＡＴＡＣピーク）内に位置する。マウスシンテニーＳＨ５、ＳＨ１８、及びＳＨ２０ゲノムセーフハーバー部位（＋／－５ｋｂ）を標的とするガイドＲＮＡを、以下の表１０～表１２に提供する。イタリック体のガイドＲＮＡは、ゲノムセーフハーバー遺伝子座（ＡＴＡＣピーク）に直接隣接する。

【０４４８】

【表７】

表７．ヒトＳＨ５を標的とするｇＲＮＡ

ゲノム位置	sgRNA標的部位	配列番号	ガイド配列に対応する配列番号
NC_000013.11:77462080-77462102	CGTTATCGAGTATTGGGCGA	51	228
NC_000013.11:77462079-77462101	ACGTTATCGAGTATTGGGCG	52	229
NC_000013.11:77462081-77462103	GTTATCGAGTATTGGGCGAG	53	230
NC_000013.11:77462073-77462095	ATCATGACGTTATCGAGTAT	54	231
NC_000013.11:77463717-77463739	GTAGCCGTCACTTATTAGAT	55	232
NC_000013.11:77462074-77462096	TCATGACGTTATCGAGTATT	56	233
NC_000013.11:77458147-77458169	TATCTTGTACGATAGGGTCA	57	234
NC_000013.11:77460391-77460413	*ACTGGCCAGTACACATCGCT*	*58*	*235*
NC_000013.11:77458595-77458617	ATTGTTAATTGTAGTCCGGG	59	236
NC_000013.11:77460386-77460408	*AACTCCCCAGCGATGTGTAC*	*60*	*237*
NC_000013.11:77462764-77462786	CGCATGATGCTTGCTCTCAC	61	238
NC_000013.11:77459946-77459968	GTTAAAAGACGGGATTCCTT	62	239
NC_000013.11:77464693-77464715	GTATAGGTACTAACACTCCC	63	240
NC_000013.11:77458143-77458165	TTGTACGATAGGGTCAAGGA	64	241
NC_000013.11:77459659-77459681	ATGCAATGTGCTGATCCGGA	65	242
NC_000013.11:77460355-77460377	***GCTTACATTTGCCACAGGCG***	***22***	***25***
NC_000013.11:77462085-77462107	TCGAGTATTGGGCGAGGGGT	66	243
NC_000013.11:77459660-77459682	CATGCAATGTGCTGATCCGG	67	244
NC_000013.11:77458144-77458166	CTTGTACGATAGGGTCAAGG	68	245
NC_000013.11:77460390-77460412	*CTGGCCAGTACACATCGCTG*	*69*	*246*
NC_000013.11:77464441-77464463	GCATCGAAGGACACTAAAGC	70	247
NC_000013.11:77459658-77459680	TGCAATGTGCTGATCCGGAG	71	248
NC_000013.11:77459738-77459760	GAGATCAATCATGTACTAGG	72	249
NC_000013.11:77459789-77459811	CACGCTAACATAATATTCCC	73	250
NC_000013.11:77459844-77459866	ACTTACAATAAGACTCCTGC	74	251
NC_000013.11:77460392-77460414	CACTGGCCAGTACACATCGC	75	252
NC_000013.11:77460715-77460737	GCTAGAGGACATATCCTCTT	76	253
NC_000013.11:77463670-77463692	CAAGGTTGGTGGTTTCCGGC	77	254
NC_000013.11:77458598-77458620	CGCATTGTTAATTGTAGTCC	78	255
NC_000013.11:77459790-77459812	CTGGGAATATTATGTTAGCG	79	256

【０４４９】

【表８】

表８．ヒトＳＨ１８を標的とするｇＲＮＡ

ゲノム位置	sgRNA標的部位	配列番号	ガイド配列に対応する配列番号
NC_000006.12:170032875-170032897	GCACGGACCCGTTTACGGAG	80	257
NC_000006.12:170033338-170033360	ACGCTACGGAAGTCAACTGC	81	258
NC_000006.12:170032874-170032896	CACGGACCCGTTTACGGAGA	82	259
NC_000006.12:170032880-170032902	AATTTGCACGGACCCGTTTA	83	260
NC_000006.12:170029268-170029290	TCGGGCGGCACTGAACGCCC	84	261
NC_000006.12:170026603-170026625	AAATTCCACAGACGCGCACC	85	262
NC_000006.12:170028678-170028700	GCCGGGTTCTGCGTACACAT	86	263
NC_000006.12:170032831-170032853	ATCTGGACCCGTGCGCCAGC	87	264
NC_000006.12:170026701-170026723	AGATCGCATGCACGCCCAGC	88	265
NC_000006.12:170034262-170034284	GTGTAGTCAACCCTGCCCGA	89	266
NC_000006.12:170032885-170032907	AACGGGTCCGTGCAAATTCA	90	267
NC_000006.12:170031376-170031398	*TGCAGCACGCAGTTCTTGCG*	*91*	*268*
NC_000006.12:170033497-170033519	TGGGCACCTTGATTCGGTGC	92	269
NC_000006.12:170034323-170034345	AGGTCTCTTGTTGCACCCGA	93	270
NC_000006.12:170031178-170031200	*CTGGCACGTCCCCGAAAATG*	*94*	*271*
NC_000006.12:170029404-170029426	CATTGTACGACTAAGATTGA	95	272
NC_000006.12:170029275-170029297	GTTCAGTGCCGCCCGACAGA	96	273
NC_000006.12:170034261-170034283	TGTGTAGTCAACCCTGCCCG	97	274
NC_000006.12:170031353-170031375	***GGCACCATCTGCGCCGAGCT***	***23***	***26***
NC_000006.12:170029120-170029142	GGCACACCTGACGATGTCAA	98	275
NC_000006.12:170031432-170031454	CGGCCACCAGCTTTTGCCGG	99	276
NC_000006.12:170032417-170032439	GGGACTCTGGCCCTAACGTG	100	277
NC_000006.12:170034126-170034148	AGGTGCACTAGGTAGACTAG	101	278
NC_000006.12:170029126-170029148	AGGCCCCCTTTGACATCGTC	102	279
NC_000006.12:170031354-170031376	*AGGCACCATCTGCGCCGAGC*	*103*	*280*
NC_000006.12:170032824-170032846	GCGCACGGGTCCAGATGGAG	104	281
NC_000006.12:170032838-170032860	CTGGATACCAGCTGGCGCAC	105	282
NC_000006.12:170033352-170033374	GGTACTGGTGGCAAACGCTA	106	283
NC_000006.12:170026601-170026623	AGGTGCGCGTCTGTGGAATT	107	284
NC_000006.12:170028679-170028701	GCCCATGTGTACGCAGAACC	108	285

【０４５０】

【表９】

表９．ヒトＳＨ２０を標的とするｇＲＮＡ

ゲノム位置	sgRNA標的部位	配列番号	ガイド配列に対応する配列番号
NC_000009.12:25209472-25209494	ACCCGCTAGAATCTAGTCAT	109	286
NC_000009.12:25204332-25204354	AAGTAGGACGTTCCCGCATA	110	287
NC_000009.12:25207601-25207623	*ATCCGACCTGCCTCGGGCTT*	*111*	*288*
NC_000009.12:25207665-25207687	***GGTCCAGCAAATACTAGATT***	***24***	***27***
NC_000009.12:25211734-25211756	TCGAGAGCAAGACAACGCAA	112	289
NC_000009.12:25212404-25212426	CACTTGAAGATTCCGGATGA	113	290
NC_000009.12:25207026-25207048	CTACCAGTGGGCCTAAATAA	114	291
NC_000009.12:25209154-25209176	TAAGTGTCAGCTTACCAACG	115	292
NC_000009.12:25209691-25209713	GGGGCCAATAGCAAACTAAC	116	293
NC_000009.12:25209440-25209462	CCGAATCTATCAGTGCCTGG	117	294
NC_000009.12:25209895-25209917	CGAGCATATATGCTAGATTT	118	295
NC_000009.12:25207585-25207607	*GTCGGATGCCAGGATTTCAA*	*119*	*296*
NC_000009.12:25209742-25209764	TAGAACTCACGACATAGGGC	120	297
NC_000009.12:25205551-25205573	TTTAACTAAGGTTGCCGAAA	121	298
NC_000009.12:25206179-25206201	GAACGGATGCAACAAGACCA	122	299
NC_000009.12:25208119-25208141	GATGTGCTAACATCCTCCCG	123	300
NC_000009.12:25206147-25206169	AGTTTCTTTATCACGATCAT	124	301
NC_000009.12:25206178-25206200	GGAACGGATGCAACAAGACC	125	302
NC_000009.12:25209471-25209493	TCCTATGACTAGATTCTAGC	126	303
NC_000009.12:25207023-25207045	ATGCCATTATTTAGGCCCAC	127	304
NC_000009.12:25207472-25207494	*AGTCTGACACGGACAAGTAC*	*128*	*305*
NC_000009.12:25207600-25207622	*CATCCGACCTGCCTCGGGCT*	*129*	*306*
NC_000009.12:25207835-25207857	TCAGCACTGGTACATATATT	130	307
NC_000009.12:25209443-25209465	AGTCCGAATCTATCAGTGCC	131	308
NC_000009.12:25204921-25204943	ATATAGGATCCCAACAATAT	132	309
NC_000009.12:25207662-25207684	*CCAGCAAATACTAGATTGGG*	*133*	*310*
NC_000009.12:25208132-25208154	ACTCCATATTCTTCCCCGGG	134	311
NC_000009.12:25212540-25212562	AACGCACATCGTTTATATGG	135	312
NC_000009.12:25209705-25209727	ACTAACAGGATGCATGCAAG	136	313
NC_000009.12:25204335-25204357	TAGGACGTTCCCGCATAAGG	137	314

【０４５１】

【表１０】

表１０．マウスＳＨ５を標的とするｇＲＮＡ

ゲノム位置	sgRNA標的部位	配列番号	ガイド配列に対応する配列番号
NC_000080.6:103453466~103453488	GGGACCGATTTGGCCGTTAA	138	315
NC_000080.6:103453470~103453492	GTAACCATTAACGGCCAAAT	139	316
NC_000080.6:103445660~103445682	CACGGCCCTTCGATTGTTGA	140	317
NC_000080.6:103451136~103451158	*AAGGATCGTTAGGTGATCGT*	*141*	*318*
NC_000080.6:103449387~103449409	TACCTACCGGTCATATATCC	142	319
NC_000080.6:103450385~103450407	*CACGAGGACGATTACCATAT*	*143*	*320*
NC_000080.6:103451135~103451157	*AGGATCGTTAGGTGATCGTC*	*144*	*321*
NC_000080.6:103451733~103451755	CACGGGACGCTATTCTAAAC	145	322
NC_000080.6:103451954~103451976	CCATAATCAGGTCGTTTATC	146	323
NC_000080.6:103453452~103453474	ATCGGTCCCATAATAGGGTG	147	324
NC_000080.6:103453458~103453480	GGCCAAATCGGTCCCATAAT	148	325
NC_000080.6:103454184~103454206	CTCGGTTTACTAGGACAAAG	149	326
NC_000080.6:103451743~103451765	ATAGCGTCCCGTGATGTTTT	150	327
NC_000080.6:103452860~103452882	TCAGTATTGTACCGCTTTAG	151	328
NC_000080.6:103453453~103453475	AATCGGTCCCATAATAGGGT	152	329
NC_000080.6:103453456~103453478	ACCCTATTATGGGACCGATT	153	330
NC_000080.6:103456002~103456024	TGCACTTGCCCGTGTAACAC	154	331
NC_000080.6:103445666~103445688	GATCTACCATCAACAATCGA	155	332
NC_000080.6:103449385~103449407	CACCAGGATATATGACCGGT	156	333
NC_000080.6:103452169~103452191	GGTGGCTACGTTGGGCCCAC	157	334
NC_000080.6:103453457~103453479	GCCAAATCGGTCCCATAATA	158	335
NC_000080.6:103446063~103446085	ATCAGTTATAACAGCCTAGC	159	336
NC_000080.6:103448477~103448499	CCGCTTGCACTAGAGGGTCC	160	337
NC_000080.6:103448481~103448503	GACCCTCTAGTGCAAGCGGC	161	338
NC_000080.6:103454001~103454023	GATAGTTACTTTACTCTCCG	162	339
NC_000080.6:103445651~103445673	ATCGAAGGGCCGTGTTAAGA	163	340
NC_000080.6:103450410~103450432	*AAAGAGGCTTCTCAACCCGC*	*164*	*341*
NC_000080.6:103452256~103452278	ACGGACCATCATGCACGGCA	165	342
NC_000080.6:103453539~103453561	GTCCCCCGTGCCCTAGATCC	166	343
NC_000080.6:103454766~103454788	TCGAAGGACCAAACTCATAG	167	344

【０４５２】

【表１１】

表１１．マウスＳＨ１８を標的とするｇＲＮＡ

領域名	標的配列	配列番号	ガイド配列に対応する配列番号
NC_000083.6:15231200~15231222	GTACGACCCATAAAAGTGCC	168	345
NC_000083.6:15223879~15223901	CTGTGAATACGCCTTGGCAC	169	346
NC_000083.6:15226621~15226643	*CCTTCAACAGTCCCGCCCAT*	*170*	*347*
NC_000083.6:15223975~15223997	CGTGTGCAGCCCGGTGCCGA	171	348
NC_000083.6:15228435~15228457	CACAAACGATGGGTAGTTTC	172	349
NC_000083.6:15230895~15230917	TCGCACACTAAACGAGGAAC	173	350
NC_000083.6:15223873~15223895	ATACGCCTTGGCACTGGATC	174	351
NC_000083.6:15223966~15223988	TGCCACGGGCCTTCGGCACC	175	352
NC_000083.6:15224413~15224435	GGAACTGTGATCCGTGCCAC	176	353
NC_000083.6:15225620~15225642	AGGCTACTATGATGCGGTAG	177	354
NC_000083.6:15230901~15230923	GTTTGATCGCACACTAAACG	178	355
NC_000083.6:15231424~15231446	CATGCTTTCCCGCAAGCGTT	179	356
NC_000083.6:15231433~15231455	CGGATGTGACCAAACGCTTG	180	357
NC_000083.6:15221497~15221519	GTGTGCCCCGTTTATTGGTG	181	358
NC_000083.6:15223968~15223990	AGCCCGGTGCCGAAGGCCCG	182	359
NC_000083.6:15227111~15227133	*TTCTAGAGGATCAATACTCG*	*183*	*360*
NC_000083.6:15228396~15228418	GGGTCGGCTTATTAAAGAAT	184	361
NC_000083.6:15228404~15228426	TTAATAAGCCGACCCCTATG	185	362
NC_000083.6:15228728~15228750	GCCGGTCTTCCTAGTACAAC	186	363
NC_000083.6:15229298~15229320	GCAACCTTCTTTCCGAGTAG	187	364
NC_000083.6:15229316~15229338	GTTGCTGATTGGAGCCGGCA	188	365
NC_000083.6:15231186~15231208	GGGTCGTACCTATGTCTCTC	189	366
NC_000083.6:15231417~15231439	CTTGCGGGAAAGCATGCTAC	190	367
NC_000083.6:15231686~15231708	TGTGTTGGCGCTGCCTCGAC	191	368
NC_000083.6:15226620~15226642	*CTTCAACAGTCCCGCCCATG*	*192*	*369*
NC_000083.6:15226621~15226643	*CCCATGGGCGGGACTGTTGA*	*193*	*370*
NC_000083.6:15229808~15229830	GCCCTAGTGCATATTGGTTA	194	371
NC_000083.6:15231818~15231840	TATGGCTACCGGAACTCTGT	195	372
NC_000083.6:15231829~15231851	CCGGTAGCCATAATTGCTCC	196	373
NC_000083.6:15221492~15221514	GCCATGTGTGCCCCGTTTAT	197	374

【０４５３】

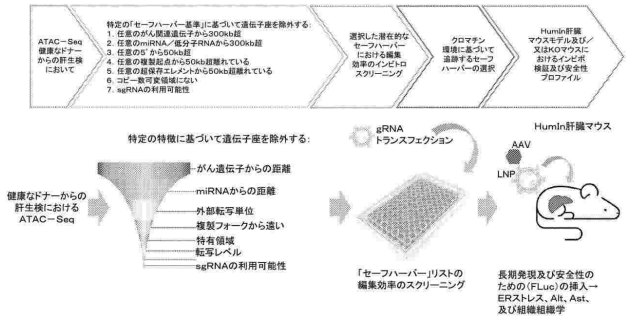
【表１２】

表１２．マウスＳＨ２０を標的とするｇＲＮＡ

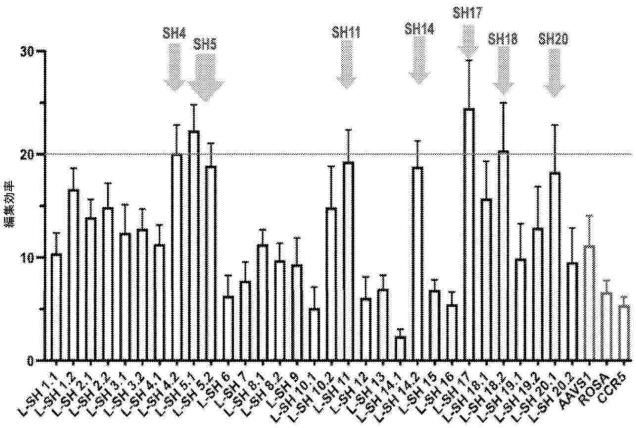
領域名	標的配列	配列番号	ガイド配列に対応する配列番号
NC_000070.6:92829703-92829725	ATCACCGGTGCCAAAGGGCC	198	375
NC_000070.6:92831933-92831955	TCTACGCTATCCCATACTGA	199	376
NC_000070.6:92829708-92829730	ATGTAATCACCGGTGCCAAA	200	377
NC_000070.6:92831347-92831369	ATAGTGACTATGCAGTGCGA	201	378
NC_000070.6:92828459-92828481	*GCCCCCTATCTTAAATTTAT*	*202*	*379*
NC_000070.6:92828606-92828628	*TGGTGTGCCCTTACATCATT*	*203*	*380*
NC_000070.6:92830393-92830415	GGATTCCACCGGAGGCAAAC	204	381
NC_000070.6:92828599-92828621	GCAGGCACCCAATGATGTAA	205	382
NC_000070.6:92831883-92831905	ATGAAAGTACGTACAAACTG	206	383
NC_000070.6:92832217-92832239	GATCTAGGGCTGGATCACTT	207	384
NC_000070.6:92829193-92829215	TAGCCACTAGCATGTTTAAT	208	385
NC_000070.6:92830388-92830410	AGAATCCTGTTTGCCTCCGG	209	386
NC_000070.6:92831309-92831331	AGCAGTTCAGTATACCTTAA	210	387
NC_000070.6:92828468-92828490	*TTAAGATAGGGGGCATGTTG*	*211*	*388*
NC_000070.6:92829709-92829731	AATGTAATCACCGGTGCCAA	212	389
NC_000070.6:92830401-92830423	AGATCCATGGATTCCACCGG	213	390
NC_000070.6:92831260-92831282	TCCTGTCAAGCTGTACACAC	214	391
NC_000070.6:92822580-92822602	GAAAACCCTTGCCAGTAGTT	215	392
NC_000070.6:92828577-92828599	AGATATCACCTATGGTAGCT	216	393
NC_000070.6:92829196-92829218	CATCCAATTAAACATGCTAG	217	394
NC_000070.6:92830562-92830584	TTGCAATTACTTAGATGTAC	218	395
NC_000070.6:92832701-92832723	GCTATAATCACTCAATGTGT	219	396
NC_000070.6:92832969-92832991	GTTAGATTCCTAGGTTTCTA	220	397
NC_000070.6:92826167-92826189	AAGACCCCCCACTCCAGGGC	221	398
NC_000070.6:92827111-92827133	GACCTACAGTTAATGGTTTA	222	399
NC_000070.6:92828598-92828620	GGCAGGCACCCAATGATGTA	223	400
NC_000070.6:92829016-92829038	TTGTGGAGGGCAAATCACAC	224	401
NC_000070.6:92829939-92829961	CTTGCTGATTCTGGAATACG	225	402
NC_000070.6:92830397-92830419	TTTGCCTCCGGTGGAATCCA	226	403
NC_000070.6:92830409-92830431	GGAATCCATGGATCTAAGTT	227	404

【図面】

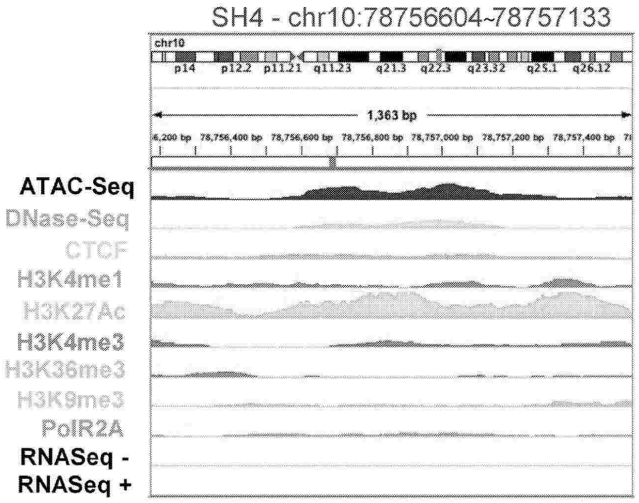
【図１】



【図２】

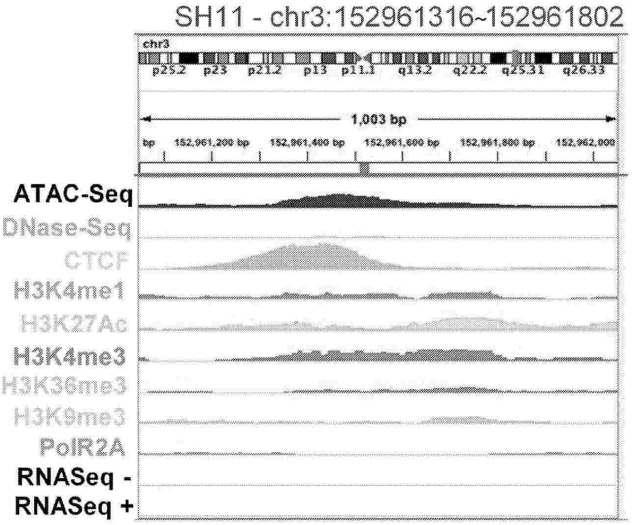


【図３Ａ】



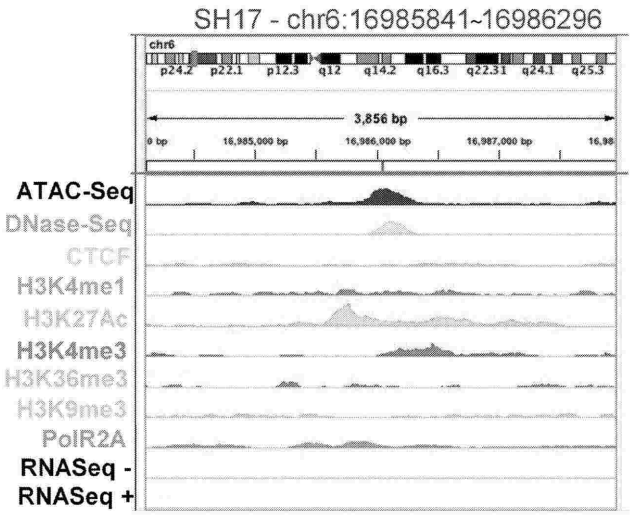
H3K27Acとの重複

【図３Ｂ】



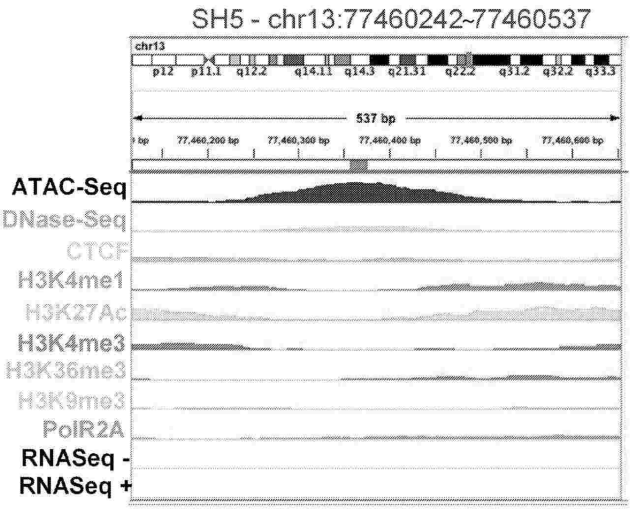
CTCFとの重複

【図３Ｃ】



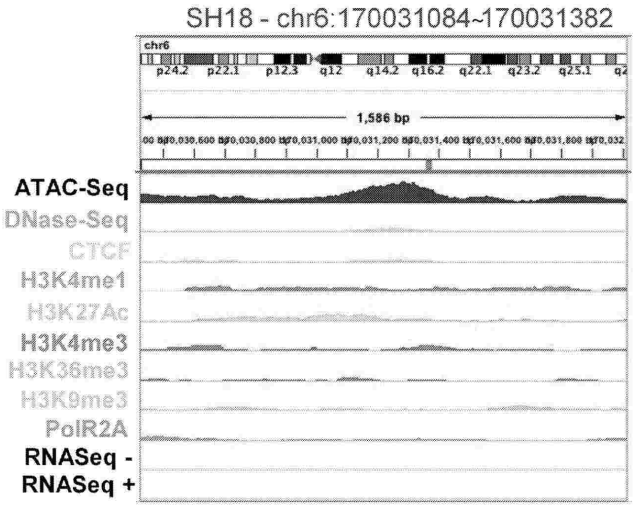
H3K27Acとの重複

【図３Ｄ】



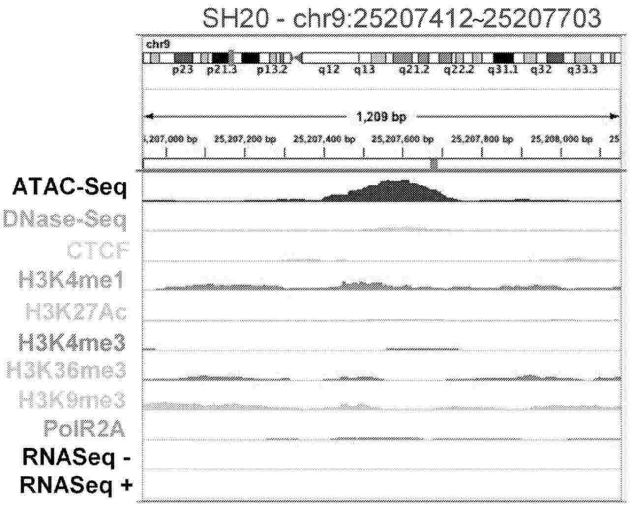
他のクロマチンマークとの有意な重複はなし

【図３Ｅ】



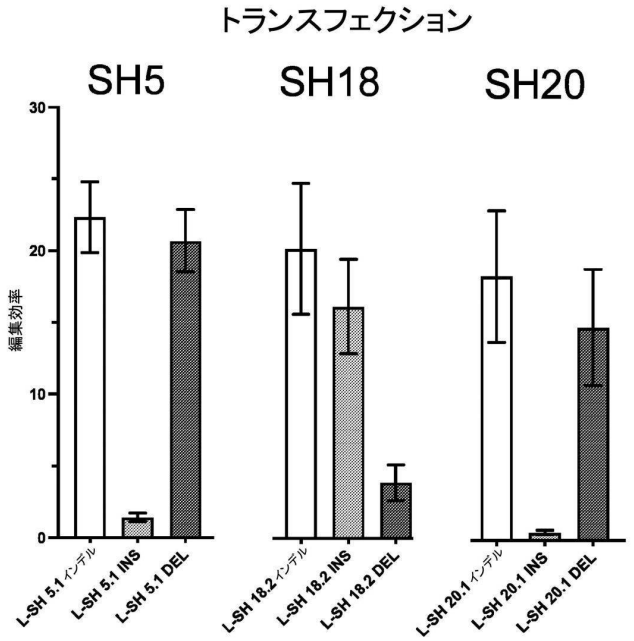
他のクロマチンマークとの有意な重複はなし

【図３Ｆ】

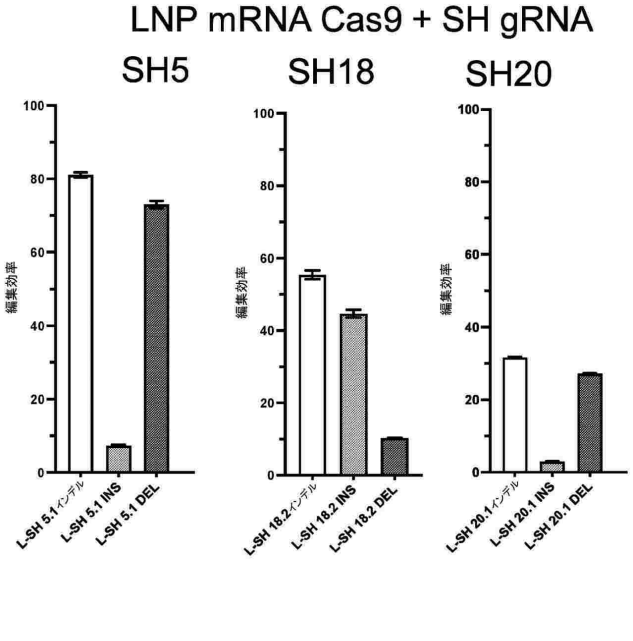


他のクロマチンマークとの有意な重複はなし

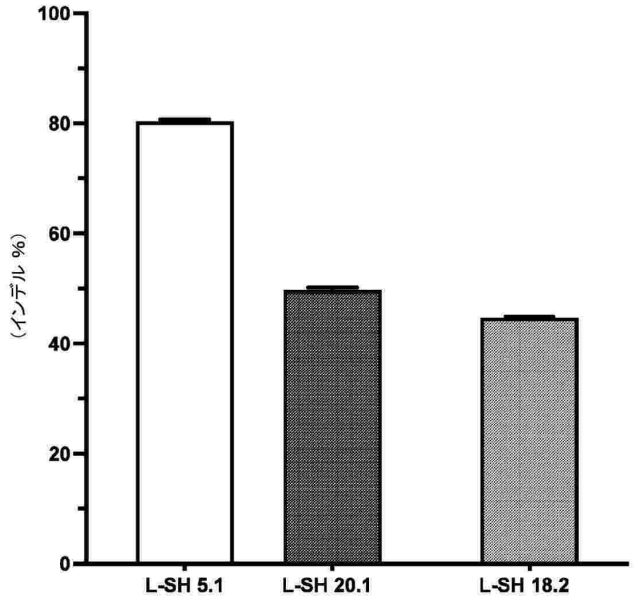
【図４Ａ】



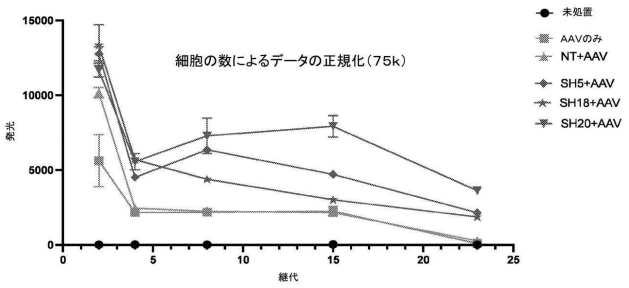
【図４Ｂ】



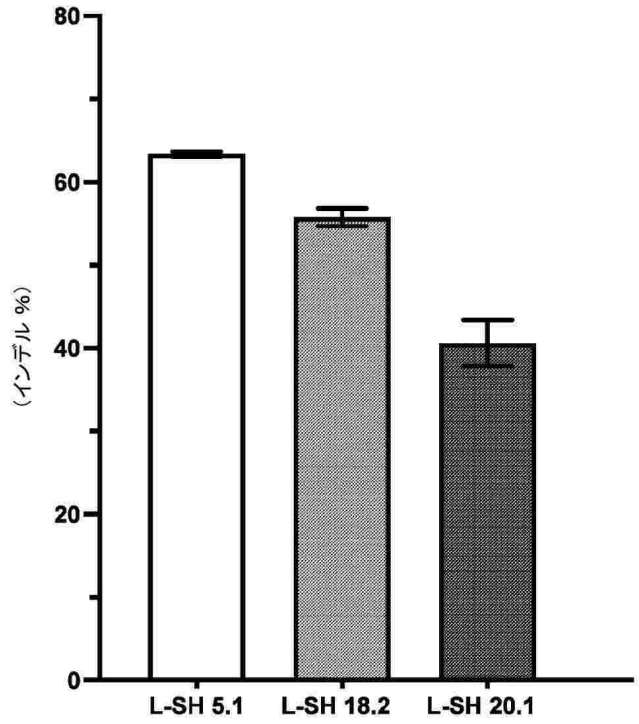
【図５】


100
80
60
40
20
0
（インデル %）
L-SH 5.1
L-SH 20.1
L-SH 18.2

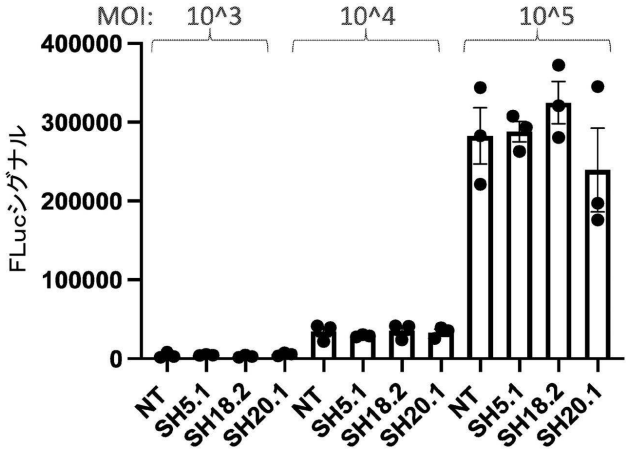
【図６】


細胞の数によるデータの正規化（75k）
15000
10000
5000
0
発光
0
5
10
15
20
25
継代
未処置
AAVのみ
NT+AAV
SH5+AAV
SH18+AAV
SH20+AAV

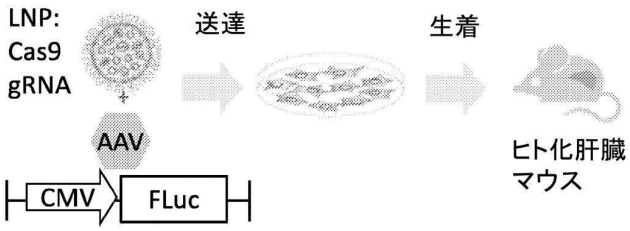
【図７】


80
60
40
20
0
（インデル %）
L-SH 5.1
L-SH 18.2
L-SH 20.1

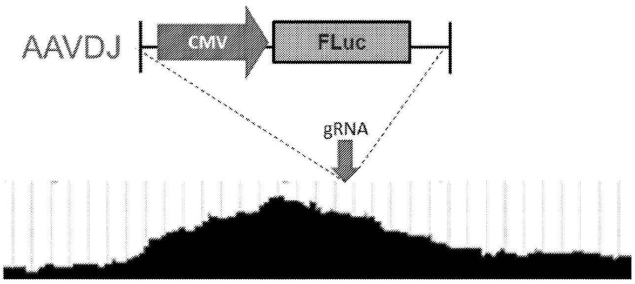
【図８】


MOI:
10^3
10^4
10^5
400000
300000
200000
100000
0
FLucシグナル
NT
SH5.1
SH18.2
SH20.1
NT
SH5.1
SH18.2
SH20.1
NT
SH5.1
SH18.2
SH20.1

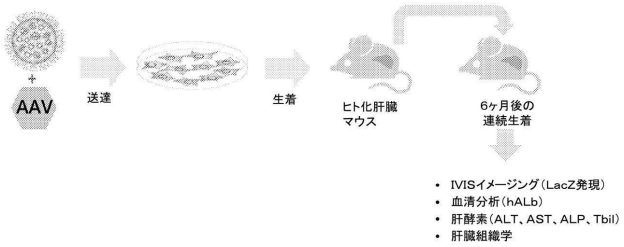
【図９】



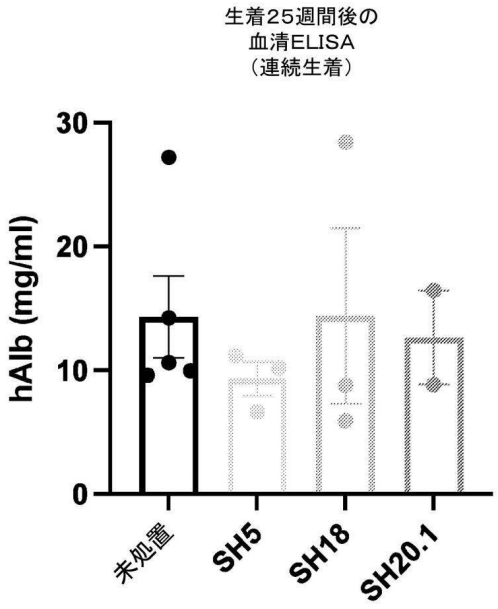
【図１０】



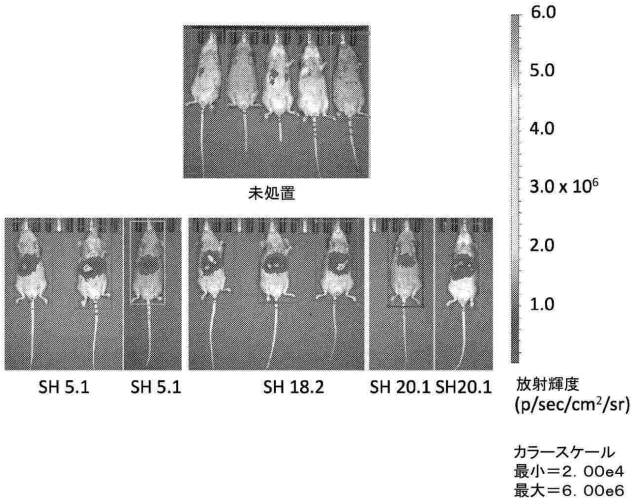
【図１１】



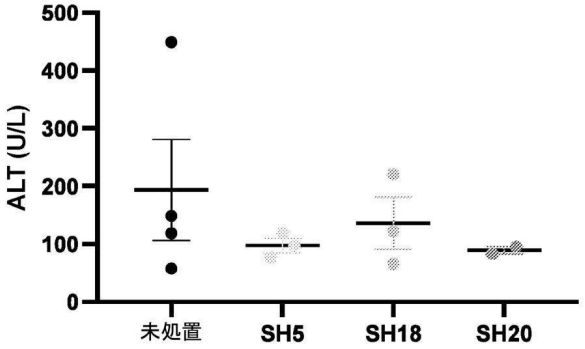
【図１２】



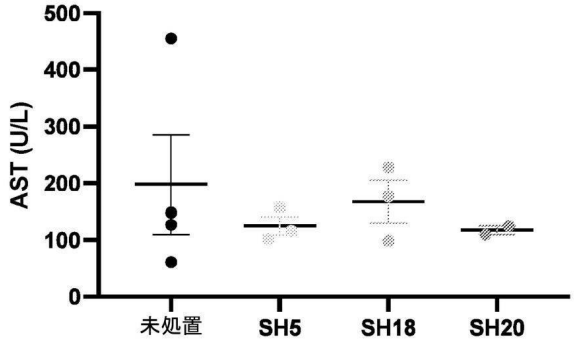
【図１３】



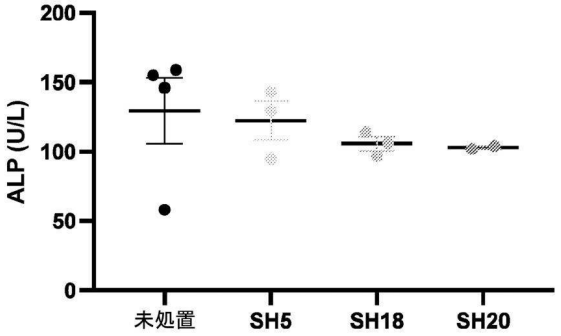
【図１４Ａ】



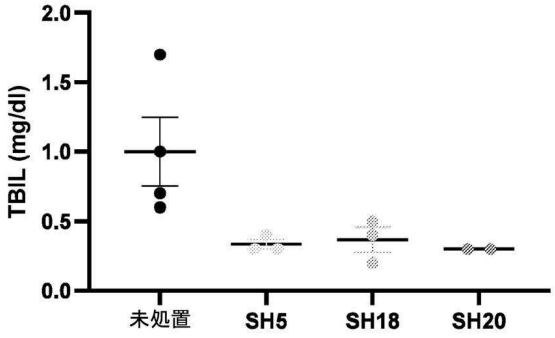
【図１４Ｂ】



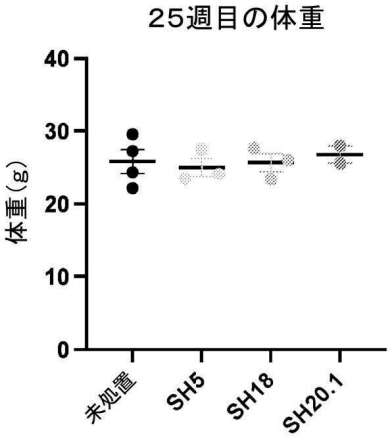
【図１４Ｃ】



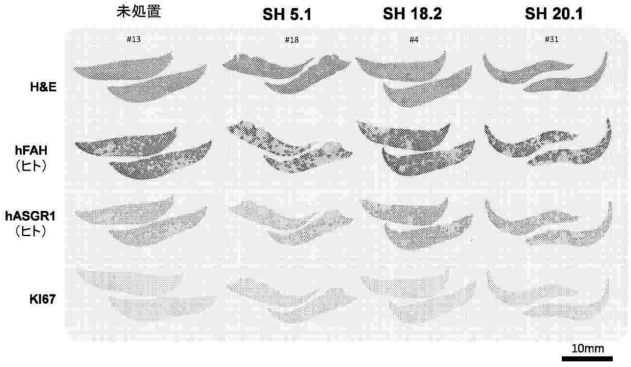
【図１４Ｄ】



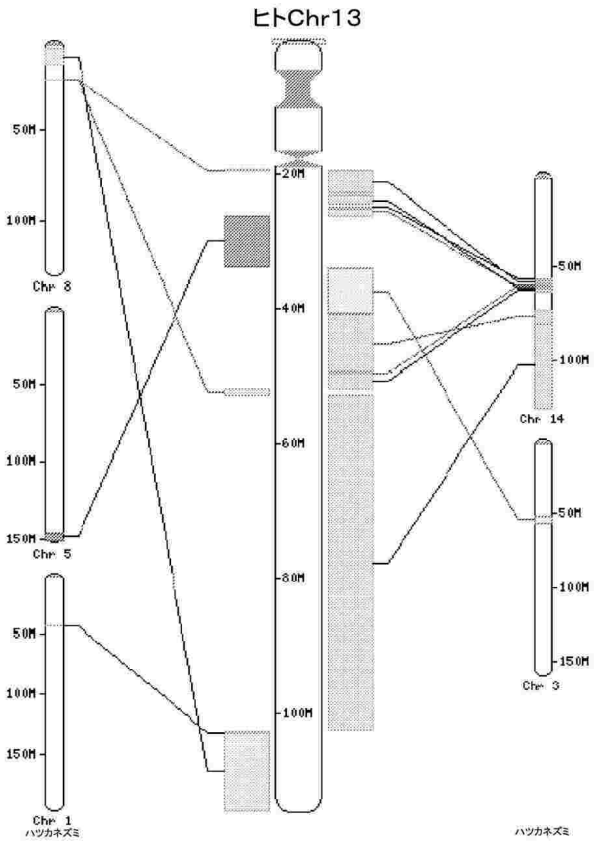
【図１４Ｅ】



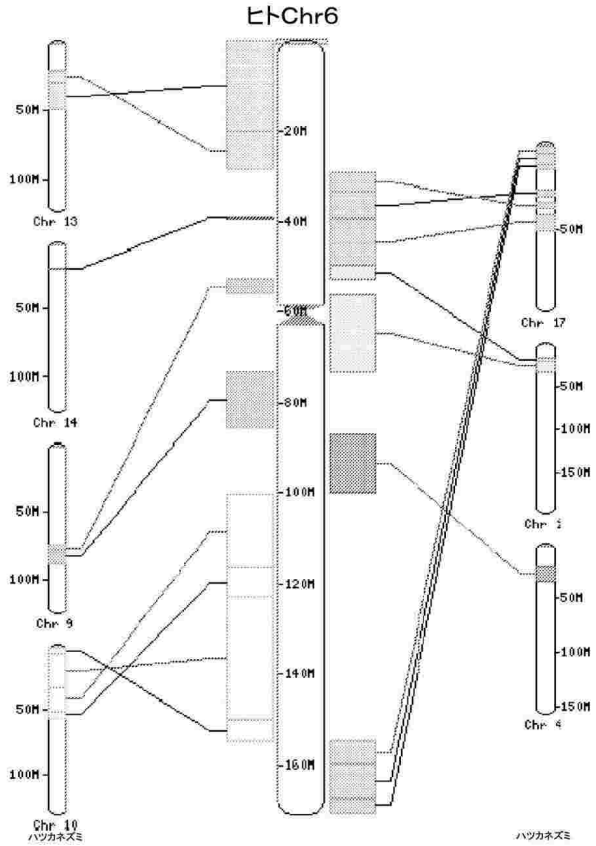
【図１５】



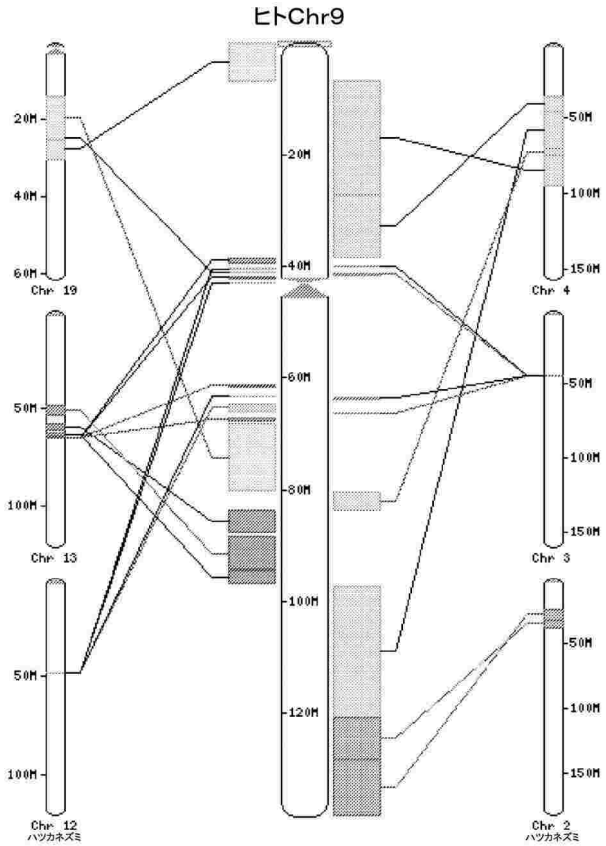
【図１６】



【図１７】



【図１８】



【配列表】

<u>20255143040000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/85 C12N15/90 C12N9/22 A61K48/00
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)
C12N A61K

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, BIOSIS, 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 2021/055616 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER [US]) 25 March 2021 (2021-03-25) abstract claims 1,37-41,51-54,59,64-65	1-49, 90-124, 133-163, 175-234, 243-268
X	WO 2021/055592 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER [US]) 25 March 2021 (2021-03-25) abstract examples 1-2 claims 1-2,12-13 figures 2-6,9	251-268

-/--

[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
13 October 2023	23/10/2023

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	Barz, Wolfgang

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/066343

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/066343

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-49, 117-124, 144-163, 227-234, 251-268(completely); 90-116, 133-143 175-226, 243-250(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066343

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/169232 A1 (GENERATION BIO CO [US]; UNIV MASSACHUSETTS [US]) 6 September 2019 (2019-09-06) abstract; example 1 claims 1-2,11-12,18,22,25-26,49,57,60,67-68,83 figures 2-4	1-49, 90-124, 133-163, 175-234, 243-250
Y	WO 2016/176191 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 3 November 2016 (2016-11-03) abstract page 2, line 17 - page 4, line 8 page 21, line 14 - line 18 examples 1-2 claims 1-26 figures 1B, 3, 5	1-49, 90-124, 133-163, 175-234, 243-250
Y	WANG QINGNAN ET AL: "CRISPR-Cas9-Mediated In Vivo Gene Integration at the Albumin Locus Recovers Hemostasis in Neonatal and Adult Hemophilia B Mice", MOLECULAR THERAPY- METHODS & CLINICAL DEVELOPMENT, vol. 18, 1 September 2020 (2020-09-01), pages 520-531, XP055942524, GB ISSN: 2329-0501, DOI: 10.1016/j.omtm.2020.06.025 Retrieved from the Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2329050120301492/pdfft?md5=581690f006ac51200c77b77c7f95768a&pid=1-s2.0-S2329050120301492-main.pdf> abstract figures 1-5	1-49, 90-124, 133-163, 175-234, 243-250
Y	MICHEL SADELAIN ET AL: "Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome", NATURE REVIEWS CANCER, vol. 12, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 51-58, XP055018235, ISSN: 1474-175X, DOI: 10.1038/nrc3179 abstract figure 2 Perspectives -/--	1-49, 90-124, 133-163, 175-234, 243-250

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066343

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EIRINI P PAPAPETROU ET AL: "Gene Insertion Into Genomic Safe Harbors for Human Gene Therapy", MOLECULAR THERAPY, vol. 24, no. 4, 1 April 2016 (2016-04-01), pages 678-684, XP055547341, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2016.38 abstract figures 1-2 Concluding Remarks	1-49, 90-124, 133-163, 175-234, 243-250
A	IRION S ET AL: "Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP US, NEW YORK, vol. 25, no. 12, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 1477-1482, XP008111005, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT1362 [retrieved on 2007-11-25] the whole document	1-49, 90-124, 133-163, 175-234, 243-250

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/066343

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021055616 A1	25-03-2021	AU 2020348776 A1	05-05-2022
		CA 3154898 A1	25-03-2021
		EP 4032092 A1	27-07-2022
		US 2022211761 A1	07-07-2022
		WO 2021055616 A1	25-03-2021
WO 2021055592 A1	25-03-2021	AU 2020349512 A1	14-04-2022
		CA 3154998 A1	25-03-2021
		EP 4031663 A1	27-07-2022
		US 2022275363 A1	01-09-2022
		WO 2021055592 A1	25-03-2021
WO 2019169232 A1	06-09-2019	AU 2019226526 A1	15-10-2020
		CA 3092832 A1	06-09-2019
		EP 3759226 A1	06-01-2021
		MA 52431 A	06-01-2021
		US 2020390072 A1	17-12-2020
		WO 2019169232 A1	06-09-2019
WO 2016176191 A1	03-11-2016	EP 3288594 A1	07-03-2018
		JP 6851319 B2	31-03-2021
		JP 2018522530 A	16-08-2018
		US 2018110877 A1	26-04-2018
		WO 2016176191 A1	03-11-2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/US2023/066343

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-49, 117-124, 144-163, 227-234(completely); 90-116, 133-143, 175-226, 243-250(partially)

Methods of integrating or expressing a nucleic acid construct into a genomic safe harbor locus in a human cell, said method comprising administering to the human cell or subject: (a) a nuclease agent or one or more nucleic acid(s) encoding said agent, wherein the agent targets a nuclease target site in the genomic safe harbor locus which is selected from (i) genomic coordinates of about 77460242 to about 77460537 on human chromosome 13; (ii) genomic coordinates of about 170031084 to about 170031382 on human chromosome 6; and (iii) genomic coordinates of about 25207412 to about 25207703 on human chromosome 9; and (b) a nucleic acid construct comprising a nucleic acid which encodes a product of interest and is operably linked to a promoter, wherein the nuclease agent cleaves the nuclease target site, and the nucleic acid construct is inserted into the genomic safe harbor locus.
A human cell comprising a nucleic acid construct integrated into a genomic safe harbor locus, wherein the nucleic acid construct comprises a nucleic acid operably linked to a promoter, wherein the nucleic acid encodes a product of interest, and wherein the genomic safe harbor locus is selected from the genomic locations on chromosomes 13, 6 or 9 (as defined above).
A composition comprising a guide RNA or a DNA encoding a guide RNA, wherein the guide RNA comprises a DNA-targeting segment that targets a guide RNA target sequence in a genomic safe harbor locus and a protein-binding segment that binds to a Cas protein, wherein the genomic safe harbor locus is selected from the genomic locations on chromosomes 13, 6 or 9 (as defined above).
A nucleic acid comprising a genomic safe harbor locus comprising an integrated nucleic acid construct, wherein the nucleic acid construct comprises a nucleic acid operably linked to a promoter, wherein the nucleic acid encodes a product of interest, and wherein the genomic safe harbor locus is selected from the genomic locations on chromosomes 13, 6 or 9 (as defined above).

---

2. claims: 50-89, 125-132, 164-174, 235-242(completely); 90-116, 133-143, 175-226, 243-250(partially)

As invention 1, but relating to a mouse cell or a mouse cell in a mouse subject, wherein the genomic safe harbor locus is selected from the following genomic locations: (i) genomic coordinates of about 103,450,397 to about 103,451,396 on mouse chromosome 14; (ii) genomic coordinates of about 15,226,387 to about 15,227,386 on mouse chromosome 17; and (iii) genomic coordinates of about 92,827,563 to about

International Application No. PCT/US2023/066343

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

92,828,592 on mouse chromosome 4.

---

3. claims: 251-268

Method of identifying one or more genomic safe harbor loci in a tissue or cell type of interest, comprising (a) identifying accessible genomic loci in the tissue or cell type of interest; (b) selecting genomic loci identified in step (a) based on safety criteria, functional silencing criteria, and/or structural accessibility criteria; and (c) selecting genomic loci identified in step (b) based on guide RNA availability, efficacy, and specificity.

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）
Ｃ１２Ｎ	***5/10 (2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	***5/071(2010.01)***	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ１２Ｎ	*9/16 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/071		
		Ｃ１２Ｎ	9/16	Ｚ	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,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

弁理士　石川 大輔

(74)代理人　230113332

弁護士　山本 健策

(72)発明者　ボネッティ， チーロ

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　ヘ， ジン

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　リウ， ジンルイ

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　ワルショー， グレッグ

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　チャオ， エリック

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 AA93X AB01 BA02 CA44 CA60