(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7610339号
(P7610339)

(45)発行日　令和7年1月8日(2025.1.8)

(24)登録日　令和6年12月24日(2024.12.24)

(51)国際特許分類		FI		
Ａ０１Ｋ　67/027(2024.01)		Ａ０１Ｋ	67/027	ＺＮＡ
Ｃ１２Ｎ　5/10 (2006.01)		Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ｃ１２Ｎ　15/63 (2006.01)		Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ
Ｃ１２Ｑ　1/6851(2018.01)		Ｃ１２Ｑ	1/6851	Ｚ
Ｇ０１Ｎ　33/53 (2006.01)		Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｍ

請求項の数　33　（全98頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-568280(P2021-568280)
(86)(22)出願日　令和2年6月3日(2020.6.3)
(65)公表番号　特表2022-534867(P2022-534867A)
(43)公表日　令和4年8月4日(2022.8.4)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/035859
(87)国際公開番号　WO2020/247452
(87)国際公開日　令和2年12月10日(2020.12.10)
審査請求日　令和5年5月19日(2023.5.19)
(31)優先権主張番号　62/856,999
(32)優先日　令和1年6月4日(2019.6.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(54)【発明の名称】　ベータスリップ変異を有するヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物と使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ゲノムに遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含むマウスであって、Ｔｔｒコード配列と非コード配列の両方を含む前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、ＴＴＲコード配列と非コード配列の両方を含む対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、

前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、内因性Ｔｔｒプロモーターを含み、前記ヒトＴＴＲ配列が、前記内因性Ｔｔｒプロモーターに作動可能に連結されており、

前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、コードされたトランスサイレチンタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含み、

前記コードされたトランスサイレチンタンパク質がヒトトランスサイレチンタンパク質と最適に整列している場合、前記変異が、前記ヒトトランスサイレチンタンパク質のＧ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓに対応する三重変異であり、前記ヒトトランスサイレチンタンパク質が配列番号１のアミノ酸残基２１～１４７からなり、ここで：

（Ｉ）前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の全Ｔｔｒコード配列が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、Ｔｔｒ開始コドンからＴｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、そして前記コードされたトランスサイレチンタンパク質が前記ヒトトランスサイレチンタンパク質と最適に整列している場合、前記対応するヒトＴＴＲ配列が、前記ヒトトランスサイレチンタンパク質のＧ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓに対応する前記三重変異を含む、または

（ＩＩ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、シグナルペプチドを含むトランスサイレチン前駆体タンパク質をコードし、前記シグナルペプチドをコードする前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられておらず、第２のＴｔｒエキソンの開始からＴｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、そして記コードされたトランスサイレチンタンパク質が前記ヒトトランスサイレチンタンパク質と最適に整列している場合、前記対応するヒトＴＴＲ配列が、前記ヒトトランスサイレチンタンパク質のＧ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓに対応する前記三重変異を含む、
マウス。

【請求項２】

前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の前記全Ｔｔｒコード配列が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、そして前記Ｔｔｒ開始コドンから前記Ｔｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の前記領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられている、請求項１に記載のマウス。

【請求項３】

前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、ヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含む、および／または

内因性Ｔｔｒ５’非翻訳領域が削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない、請求項２に記載のマウス。

【請求項４】

前記Ｔｔｒ開始コドンから前記Ｔｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の前記領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列およびヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含むヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、かつ

内因性Ｔｔｒ５’非翻訳領域が削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられておらず、かつ

前記内因性Ｔｔｒプロモーターが削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない、請求項１または２に記載のマウス。

【請求項５】

（ｉ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座の前記ヒトＴＴＲ配列が、配列番号１４に記載の配列と同一の配列を含むか、または

（ｉｉ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、配列番号９に記載の配列と同一の配列を含むタンパク質をコードし、

（ｉｉｉ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、配列番号１０に記載の配列と同一の配列を含むコード配列を含むか、または

（ｉｖ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、配列番号１２もしくは１３に記載の配列と同一の配列を含む、請求項４に記載のマウス。

【請求項６】

前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、シグナルペプチドを含むトランスサイレチン前駆体タンパク質をコードし、前記シグナルペプチドをコードする前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の前記領域が削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられておらず、そして前記第２のＴｔｒエキソンの開始からＴｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の前記領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられている、請求項１に記載のマウス。

【請求項７】

前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の第１のエキソンおよび第１のイントロンが削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない、請求項６に記載のマウス。

【請求項８】

前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、ヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含む、請求項６または７に記載のマウス。

【請求項９】

前記第２のＴｔｒエキソンから前記Ｔｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の前記領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列およびヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含むヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、かつ
内因性Ｔｔｒ５’非翻訳領域が削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられておらず、かつ
前記内因性Ｔｔｒプロモーターが削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない、請求項６～８のいずれか一項に記載のマウス。
【請求項１０】
前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、選択カセットまたはレポーター遺伝子を含まない、請求項１～９のいずれか一項に記載のマウス。
【請求項１１】
前記マウスが、前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座についてホモ接合性である、請求項１～１０のいずれか一項に記載のマウス。
【請求項１２】
前記マウスが、その生殖系列において前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載のマウス。
【請求項１３】
（Ｉ）前記マウスが、対照の野生型マウスまたは前記変異を伴わない遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含むマウスと比較して活動亢進的である；および／または
（ＩＩ）前記マウスが、後肢ジストニアを示す；および／または
（ＩＩＩ）前記マウスが、アミロイド沈着を含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載のマウス。
【請求項１４】
前記活動亢進が、オープンフィールド試験における総距離、総活動量、もしくは総立ち上がり（ｔｏｔａｌ　ｒｅａｒｉｎｇ）のうちの１つ以上またはすべてによって測定される、請求項１３に記載のマウス。
【請求項１５】
前記マウスが、坐骨神経にアミロイド沈着を含む、請求項１３または１４に記載のマウス。
【請求項１６】
前記マウスが、約２ヶ月齢までにアミロイドーシスを発症する、請求項１３～１５のいずれか一項に記載のマウス。
【請求項１７】
ゲノムに遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含むマウス細胞であって、Ｔｔｒコード配列と非コード配列の両方を含む前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、ＴＴＲコード配列と非コード配列の両方を含む対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、
前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、内因性Ｔｔｒプロモーターを含み、前記ヒトＴＴＲ配列が、前記内因性Ｔｔｒプロモーターに作動可能に連結されており、
前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、コードされたトランスサイレチンタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含み、
前記コードされたトランスサイレチンタンパク質がヒトトランスサイレチンタンパク質と最適に整列している場合、前記変異が、前記ヒトトランスサイレチンタンパク質のＧ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓに対応する三重変異であり、前記ヒトトランスサイレチンタンパク質が配列番号１のアミノ酸残基２１～１４７からなり、ここで：
（Ｉ）前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の全Ｔｔｒコード配列が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、Ｔｔｒ開始コドンからＴｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、そして前記コードされたトランスサイレチンタンパク質が前記ヒトトランスサイレチンタンパク質と最適に整列している場合、前記対応するヒトＴＴＲ配列が、前記ヒトトランスサイレチンタンパク質のＧ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓに対応する前記三重変異を含む、または

（ＩＩ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、シグナルペプチドを含むトランスサイレチン前駆体タンパク質をコードし、前記シグナルペプチドをコードする前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられておらず、第２のＴｔｒエキソンの開始からＴｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、そして前記コードされたトランスサイレチンタンパク質が前記ヒトトランスサイレチンタンパク質と最適に整列している場合、前記対応するヒトＴＴＲ配列が、前記ヒトトランスサイレチンタンパク質のＧ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓに対応する前記三重変異を含む、マウス細胞。

【請求項１８】

インビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価する方法であって、

（ａ）請求項１～１６のいずれか一項に記載のマウスに前記ヒトＴＴＲ標的化試薬を投与することと、

（ｂ）前記マウスにおける前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価することと、を含む、方法。

【請求項１９】

前記投与が、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介送達、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）媒介送達、または流体力学的送達（ＨＤＤ）を含む、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】

前記投与が、ＡＡＶ８媒介送達を含む、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

ステップ（ｂ）が、前記マウスから肝臓を単離することと、前記肝臓における前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価することとを含む、請求項１８～２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２２】

ステップ（ｂ）が、前記肝臓以外の器官または組織における前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価することをさらに含む、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】

前記評価が、

（Ｉ）前記遺伝子改変されたＴｔｒ遺伝子座の改変を評価すること；ならびに／あるいは

（ＩＩ）前記遺伝子改変されたＴｔｒ遺伝子座によってコードされるＴｔｒメッセンジャーＲＮＡの発現を評価すること、または前記遺伝子改変されたＴｔｒ遺伝子座によってコードされるＴＴＲタンパク質の発現を評価すること

を含む、請求項１８～２２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２４】

前記ＴＴＲタンパク質の発現を評価することが、前記マウスにおける前記ＴＴＲタンパク質の血清レベルを測定することを含む、請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

前記評価が、活動亢進、後肢ジストニアまたはアミロイド沈着を評価することを含む、請求項１８～２４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６】

前記評価が、坐骨神経におけるアミロイド沈着を評価することを含む、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記評価が、未処置の対照マウスとの比較で行われる、請求項１８～２６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２８】

前記ヒトＴＴＲ標的化試薬が、

（Ｉ）ヒトＴＴＲ遺伝子の領域を標的化するように設計されたヌクレアーゼ剤；

（ＩＩ）外因性ドナー核酸であって、前記外因性ドナー核酸が、前記ヒトＴＴＲ遺伝子

と組換えるように設計されている、外因性ドナー核酸；
（ＩＩＩ）抗原結合タンパク質；あるいは
（ＩＶ）ＲＮＡｉ剤またはアンチセンスオリゴヌクレオチド
を含む、請求項１８～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
前記ヌクレアーゼ剤が、Ｃａｓタンパク質および前記ヒトＴＴＲ遺伝子のガイドＲＮＡ標的配列を標的化するように設計されたガイドＲＮＡを含み、前記Ｃａｓタンパク質が、Ｃａｓ９タンパク質である、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記外因性ドナー核酸が、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）である、請求項２８に記載の方法。
【請求項３１】
インビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を最適化する方法であって、
（Ｉ）請求項１８～３０のいずれか一項に記載の方法を、ゲノムに前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む第１のマウスにおいて、１回目に実行することと、
（ＩＩ）可変要素（ｖａｒｉａｂｌｅ）を変更し、ステップ（Ｉ）の前記方法を、ゲノムに前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む第２のマウスにおいて、変更された可変要素を用いて２回目に実行することと、
（ＩＩＩ）ステップ（Ｉ）の前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の前記活性を、ステップ（ＩＩ）の前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の前記活性と比較し、より高い有効性、より高い精度、より高い一貫性、またはより高い特異性をもたらす方法を選択することと、を含む、方法。
【請求項３２】
ステップ（ＩＩ）における前記変更された可変要素が、前記ヒトＴＴＲ標的化試薬を前記マウスに導入する送達方法、前記ヒトＴＴＲ標的化試薬を前記マウスに導入する投与経路、前記マウスに導入された前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の濃度または量、前記マウスに導入された前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の形態、あるいは、前記マウスに導入された前記ヒトＴＴＲ標的化試薬である、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
請求項１～１６のいずれか一項に記載のマウスを作製する方法であって、
（Ｉ）（ａ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含むように、マウス胚性幹（ＥＳ）細胞のゲノムを改変することと、
（ｂ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む前記遺伝子改変されたマウスＥＳ細胞を同定または選択することと、
（ｃ）前記遺伝子改変されたマウスＥＳ細胞をマウス宿主胚に導入することと、
（ｄ）代理マウス母に前記マウス宿主胚を懐胎させることと、を含むか、または
（ＩＩ）（ａ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含むように、マウスの１細胞期胚のゲノムを改変することと、
（ｂ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む前記遺伝子改変されたマウスの１細胞期胚を選択することと、
（ｃ）代理マウス母に前記遺伝子改変されたマウスの１細胞期胚を懐胎させることと、を含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
この出願は、２０１９年６月４日に出願された米国出願第６２／８５６，９９９号の利益を主張し、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
ＥＦＳ　ＷＥＢを介してテキストファイルとして提出された配列表への参照
ファイル５４７０２８ＳＥＱＬＩＳＴ．ｔｘｔに記述された配列表は１２４キロバイト

であり、２０２０年５月２５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】
トランスサイレチン（ＴＴＲ）は、血清および脳脊髄液に含まれるタンパク質で、甲状腺ホルモンとレチノール結合タンパク質をレチノールに運ぶ。肝臓はＴＴＲを血中に分泌し、脈絡叢はそれを脳脊髄液に分泌する。ＴＴＲは網膜色素上皮でも産生され、硝子体に分泌される。アミロイド疾患老人性全身性アミロイドーシス（ＳＳＡ）、家族性アミロイド多発神経障害（ＦＡＰ）、および家族性アミロイド心筋症（ＦＡＣ）では、誤って折りたたまれて凝集したＴＴＲは複数の組織および器官に蓄積する。
【０００４】
内因性Ｔｔｒ遺伝子座でのヒトＴＴＲ標的化試薬の真のヒト標的または真のヒト標的の厳密な近似を提供し、それによって生きている動物におけるそのような薬剤の有効性および作用機序の試験だけでなく、ヒト化タンパク質とヒト化遺伝子が存在するＴＴＲの唯一のバージョンである環境での薬物動態学および薬力学研究を可能にする、適切な非ヒト動物の必要性が残っている。
【発明の概要】
【０００５】
ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物、ならびにそのような非ヒト動物を使用する方法が提供される。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノム、ならびにそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムを作製および使用する方法も提供される。非ヒト動物ＴＴＲ遺伝子のヒト化に使用するためのベータスリップ変異を含むヒト化非ヒト動物ＴＴＲ遺伝子、ヌクレアーゼ剤および／または標的化ベクター、ならびにそのようなヒト化ＴＴＲ遺伝子を作製および使用する方法も提供される。
【０００６】
一態様では、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物が提供される。およびベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座をそれらのゲノムに含む非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムも提供される。そのような非ヒト動物は遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含むことができ、Ｔｔｒコード配列と非コード配列の両方を含む内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除されてＴＴＲコード配列と非コード配列の両方を含むオーソロガスヒトＴＴＲ配列で置き換えられ、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、コードされたトランスサイレチンタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含む。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムは、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含むことができ、Ｔｔｒコード配列と非コード配列の両方を含む内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除されてＴＴＲコード配列と非コード配列の両方を含む対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられ、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、コードされたトランスサイレチンタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含む。任意選択で、コードされたトランスサイレチンタンパク質がヒトトランスサイレチンタンパク質と最適に整列している場合、変異は、ヒトトランスサイレチンタンパク質の残基Ｌ５８に対応する残基を、ヒトトランスサイレチンタンパク質の残基Ｌ５５に対応する残基が通常占める位置に配置する、ベータ鎖Ｄの３残基シフトを引き起す。任意選択で、変異は、コードされたトランスサイレチンタンパク質がヒトトランスサイレチンタンパク質と最適に整列している場合、ヒトトランスサイレチンタンパク質のＧ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓに対応する三重変異である。任意選択で、三重変異はオーソロガスなヒトＴＴＲ配列にある。任意選択で、三重変異は対応するヒトＴＴＲ配列にある。
【０００７】
いくつかのそのような非ヒト動物では、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、内因性Ｔｔｒプロモーターを含む。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムにおいて、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、内因性Ｔｔ

ｒプロモーターを含み、ヒトＴＴＲ配列は、内因性Ｔｔｒプロモーターに作動可能に連結される。任意選択で、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の少なくとも１つのイントロンおよび少なくとも１つのエキソンが削除され、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置き換えられている。任意選択で、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の少なくとも１つのイントロンおよび少なくとも１つのエキソンが削除され、対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられている。

【０００８】

いくつかのそのような非ヒト動物では、内因性Ｔｔｒ遺伝子座のＴｔｒコード配列全体が削除され、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列に置き換えられている。任意選択で、Ｔｔｒ開始コドンからＴｔｒ終止コドンまでの内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置き換えられている。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、内因性Ｔｔｒ遺伝子座のＴｔｒコード配列全体が削除され、対応するヒトＴＴＲ配列に置き換えられている。任意選択で、Ｔｔｒ開始コドンからＴｔｒ終止コドンまでの内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられている。

【０００９】

いくつかのそのような非ヒト動物では、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、ヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含む。いくつかのそのような非ヒト動物では、内因性のＴｔｒ５’非翻訳領域が削除されておらず、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列に置き換えられていない。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、ヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含む。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、内因性Ｔｔｒ５’非翻訳領域が削除されておらず、対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない。

【００１０】

いくつかのそのような非ヒト動物では、Ｔｔｒ開始コドンからＴｔｒ終止コドンまでの内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列およびヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含むヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、内因性Ｔｔｒ５’非翻訳領域は削除されておらず、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列に置き換えられておらず、ならびに内因性Ｔｔｒプロモーターは削除されておらず、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列に置き換えられていない。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、Ｔｔｒ開始コドンからＴｔｒ終止コドンまでの内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、対応するヒトＴＴＲ配列およびヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含むヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、ならびに内因性Ｔｔｒ５’非翻訳領域は削除されておらず、対応するヒトＴＴＲ配列に置き換えられておらず、ならびに内因性Ｔｔｒプロモーターは削除されておらず、対応するヒトＴＴＲ配列に置き換えられていない。任意選択で、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座のヒトＴＴＲ配列は、配列番号１４に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。任意選択で、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座におけるヒトＴＴＲ配列は、配列番号１４に記載の配列と少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。任意選択で、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、配列番号９に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなるタンパク質をコードする。任意選択で、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、配列番号９に記載の配列と少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなるタンパク質をコードする。任意選択で、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、配列番号１０に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなるコード配列を含む。任意選択で、遺伝子

改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、配列番号１０に記載の配列と少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含む、それから本質的になる、またはそれからなるコード配列を含む。任意選択で、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、配列番号１２または１３に記載の配列と少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。任意選択で、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、配列番号１２または１３に記載の配列と少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【００１１】

いくつかのそのような非ヒト動物では、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座はシグナルペプチドを含むトランスサイレチン前駆体タンパク質をコードし、シグナルペプチドをコードする内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域は削除されておらず、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない。任意選択で、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の第１のエキソンは削除されておらず、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない。任意選択で、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の第１のエキソンと第１のイントロンは削除されておらず、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない。任意選択で、第２のＴｔｒエキソンの開始からＴｔｒ終止コドンまでの内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置き換えられている。任意選択で、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、ヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含む。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、シグナルペプチドを含むトランスサイレチン前駆体タンパク質をコードし、シグナルペプチドをコードする内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域は削除されておらず、対応するヒトＴＴＲ配列に置き換えられていない。任意選択で、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の第１のエキソンは削除されておらず、対応するヒトＴＴＲ配列に置き換えられていない。任意選択で、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の第１のエキソンと第１のイントロンは削除されておらず、対応するヒトＴＴＲ配列に置き換えられていない。任意選択で、第２のＴｔｒエキソンの開始からＴｔｒ終止コドンまでの内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、対応するヒトＴＴＲ配列に置き換えられている。任意選択で、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、ヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含む。

【００１２】

いくつかのそのような非ヒト動物では、第２のＴｔｒエキソンからＴｔｒ終止コドンまでの内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、オーソロガスヒトＴＴＲ配列およびヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含むヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、内因性Ｔｔｒ５’非翻訳領域は削除されておらず、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列に置き換えられておらず、内因性Ｔｔｒプロモーターは削除されておらず、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列に置き換えられていない。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムにおいて、第２のＴｔｒエキソンからＴｔｒ終止コドンまでの内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、対応するヒトＴＴＲ配列およびヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含むヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、内因性Ｔｔｒ５’非翻訳領域は削除されておらず、対応するヒトＴＴＲ配列に置き換えられておらず、内因性Ｔｔｒプロモーターは削除されておらず、対応するヒトＴＴＲ配列に置き換えられていない。

【００１３】

いくつかのそのような非ヒト動物では、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、選択カセットまたはレポーター遺伝子を含まない。いくつかのそのような非ヒト動物では、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、選択カセットまたはレポーター遺伝子を含む。いくつかのそのような非ヒト動物では、非ヒト動物は、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座についてホモ接合性である。いくつかのそのような非ヒト動物では、非ヒト動物は、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座についてヘテロ接合性である。いくつかのそ

のような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、選択カセットまたはレポーター遺伝子を含まない。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、選択カセットまたはレポーター遺伝子を含む。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、非ヒト動物は、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座についてホモ接合性である。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、非ヒト動物は、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座についてヘテロ接合性である。いくつかのそのような非ヒト動物では、非ヒト動物は、その生殖系列において遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む。

【００１４】

いくつかのそのような非ヒト動物では、非ヒト動物は哺乳動物である。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムにおいて、非ヒト動物は哺乳動物である。任意選択で、哺乳動物はげっ歯動物である。任意選択で、げっ歯動物はラットまたはマウスである。任意選択で、非ヒト動物はマウスである。

【００１５】

いくつかのそのような非ヒト動物では、非ヒト動物は、対照の野生型非ヒト動物または変異を伴わない遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む非ヒト動物と比較して活動亢進的である。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、非ヒト動物は、対照の野生型非ヒト動物または変異を伴わない遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む非ヒト動物と比較して活動亢進的である。任意選択で、活動亢進は、オープンフィールド試験における総距離、総活動量、もしくは総立ち上がり（ｔｏｔａｌ　ｒｅａｒｉｎｇ）のうちの１つ以上またはすべてによって測定される。いくつかのそのような非ヒト動物では、非ヒト動物は後肢ジストニアを示す。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、非ヒト動物は後肢ジストニアを示す。いくつかのそのような非ヒト動物では、非ヒト動物はアミロイド沈着を含む。いくつかのそのような非ヒト動物、非ヒト動物細胞、および非ヒト動物ゲノムでは、非ヒト動物はアミロイド沈着を含む。任意選択で、非ヒト動物は、坐骨神経にアミロイド沈着を含む。任意選択で、非ヒト動物は２ヶ月齢までにアミロイドーシスを発症する。

【００１６】

別の態様では、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を生成するための標的化ベクターが提供され、Ｔｔｒコード配列と非コード配列の両方を含む内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、ＴＴＲコード配列と非コード配列の両方を含む対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、コードされたトランスサイレチンタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含み、この標的化ベクターは、内因性Ｔｔｒ遺伝子座で５’標的配列を標的とする５’相同性アーム（ｈｏｍｏｌｏｇｙ　ａｒｍ）におよび内因性Ｔｔｒ遺伝子座で３’標的配列を標的とする３’相同性アームに隣接する対応するヒトＴＴＲ配列を含む挿入核酸を含む。

【００１７】

別の態様では、遺伝子改変された非ヒト動物Ｔｔｒ遺伝子が提供され、Ｔｔｒコード配列と非コード配列の両方を含む内因性Ｔｔｒ遺伝子の領域が削除され、ＴＴＲコード配列と非コード配列の両方を含む対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、遺伝子改変された非ヒト動物のＴｔｒ遺伝子が、コードされたトランスサイレチンタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含む。

【００１８】

別の態様では、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物を使用して、インビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価する方法が提供される。そのような方法は、（ａ）上記の非ヒト動物のいずれかにヒトＴＴＲ標的化試薬を投与することと、（ｂ）非ヒト動物におけるヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価することと、を含むことができる。

【００１９】

いくつかのそのような方法では、導入は、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介送達、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）媒介送達、または流体力学的送達（ＨＤＤ）を含む。任意選択で、導入は、ＬＮＰ媒介送達を含む。任意選択で、導入は、ＡＡＶ８媒介送達を含む。

【００２０】

いくつかのそのような方法では、ステップ（ｂ）は、非ヒト動物から肝臓を単離し、肝臓におけるヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価することを含む。任意選択で、ステップ（ｂ）は、肝臓以外の器官または組織におけるヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価することをさらに含む。

【００２１】

いくつかのそのような方法では、評価は、遺伝子改変されたＴｔｒ遺伝子座の改変を評価することを含む。いくつかのそのような方法では、評価は、遺伝子改変されたＴｔｒ遺伝子座によってコードされるＴｔｒメッセンジャーＲＮＡの発現を評価することを含む。いくつかのそのような方法では、評価は、遺伝子改変されたＴｔｒ遺伝子座によってコードされるＴＴＲタンパク質の発現を評価することを含む。任意選択で、ＴＴＲタンパク質の発現を評価することは、非ヒト動物におけるＴＴＲタンパク質の血清レベルを測定することを含む。任意選択で、活性は非ヒト動物の肝臓において評価される。

【００２２】

いくつかのそのような方法では、評価は活動亢進を評価することを含む。いくつかのそのような方法では、評価は後肢ジストニアを評価することを含む。いくつかのそのような方法では、評価は、アミロイド沈着を評価することを含む。任意選択で、評価は、坐骨神経におけるアミロイド沈着を評価することを含む。いくつかのそのような方法では、評価は、未処置の対照非ヒト動物との比較で行われる。

【００２３】

いくつかのそのような方法では、ヒトＴＴＲ標的化試薬は、ヒトＴＴＲ遺伝子の領域を標的化するように設計されたヌクレアーゼ剤を含む。任意選択で、ヌクレアーゼ剤は、Ｃａｓタンパク質およびヒトＴＴＲ遺伝子のガイドＲＮＡ標的配列を標的とするように設計されたガイドＲＮＡを含む。任意選択で、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、ヒトＴＴＲ標的化試薬は、外因性ドナー核酸を含み、外因性ドナー核酸は、ヒトＴＴＲ遺伝子と組換えるように設計されている。任意選択で、外因性ドナー核酸は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）である。いくつかのそのような方法では、ヒトＴＴＲ標的化試薬は、抗原結合タンパク質を含む。いくつかのそのような方法では、ヒトＴＴＲ標的化試薬は、ＲＮＡｉ剤またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

【００２４】

いくつかのそのような方法では、非ヒト動物におけるヒト－ＴＴＲ標的化試薬の活性を評価することは、トランスサイレチン活性を評価することを含む。いくつかのそのような方法では、評価は、未処理の対照非ヒト動物と比較される。

【００２５】

別の態様では、インビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を最適化する方法が提供される。そのような方法は、（Ｉ）インビボでヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価する上記の方法のいずれかを、第１の非ヒト動物において１回目に実行することと、（ＩＩ）可変要素（ｖａｒｉａｂｌｅ）を変更し、ステップ（Ｉ）の方法を、第２の非ヒト動物において変更された可変要素を用いて２回目に実行することと、（ＩＩＩ）ステップ（Ｉ）のヒトＴＴＲ標的化試薬の活性をステップ（ＩＩ）のヒトＴＴＲ標的化試薬の活性と比較し、より高い有効性、より高い精度、より高い一貫性、またはより高い特異性をもたらす方法を選択することと、を含むことができる。そのような方法は、（Ｉ）インビボでヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価する上記の方法のいずれかを、ゲノムに遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む第１の非ヒト動物において１回目に実行することと、（ＩＩ）可変要素を変更し、ステップ（Ｉ）の方法を、ゲノムに遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む第２の非ヒト動物において変更された可変要素を用いて２回目に実行することと

、（ＩＩＩ）ステップ（Ｉ）のヒトＴＴＲ標的化試薬の活性をステップ（ＩＩ）のヒトＴＴＲ標的化試薬の活性と比較し、より高い有効性、より高い精度、より高い一貫性、またはより高い特異性をもたらす方法を選択することと、を含むことができる。

【００２６】

任意選択で、ステップ（ＩＩ）で変更された可変要素は、ヒトＴＴＲ標的化試薬を非ヒト動物に導入する送達方法である。任意選択で、ステップ（ＩＩ）で変更された可変要素は、ヒトＴＴＲ標的化試薬を非ヒト動物に導入する投与経路である。任意選択で、ステップ（ＩＩ）で変更された可変要素は、非ヒト動物に導入されたヒトＴＴＲ標的化試薬の濃度または量である。任意選択で、ステップ（ＩＩ）で変更された可変要素は、非ヒト動物に導入されたヒトＴＴＲ標的化試薬の形態である。任意選択で、ステップ（ＩＩ）で変更された可変要素は、非ヒト動物に導入されたヒトＴＴＲ標的化試薬である。

【００２７】

別の態様では、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物を作製する方法が提供される。そのような方法は、（ａ）遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含むように多能性非ヒト動物細胞のゲノムを改変することと、（ｂ）遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む遺伝子改変された多能性非ヒト動物細胞を同定または選択することと、（ｃ）遺伝子改変された多能性非ヒト動物細胞を非ヒト動物宿主胚に導入することと、（ｄ）代理母に非ヒト動物宿主胚を懐胎させることと、を含むことができる：あるいは、そのような方法は、以下を含むことができる。（ａ）遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含むように非ヒト動物の１細胞期胚のゲノムを改変することと、（ｂ）遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む遺伝子改変された非ヒト動物の１細胞期胚を選択することと、（ｃ）代理母に遺伝子改変された非ヒト動物の１細胞期胚を懐胎させることと、を含むことができる。

【図面の簡単な説明】

【００２８】

【図１Ａ】マウス、ヒト野生型、およびヒトベータスリップトランスサイレチン（ＴＴＲ）前駆体タンパク質（それぞれ配列番号５、１、および９）のアラインメントを示す。シグナルペプチド、Ｔ４結合ドメイン、フェーズ０のエキソン／イントロン境界、およびフェーズ１／２のエキソン／イントロン境界が、ベータスリップ変異とともに示されている。

【図１Ｂ】マウス、ヒト野生型、およびヒトベータスリップトランスサイレチン（ＴＴＲ）コード配列（それぞれ配列番号８、４、および１０）のアラインメントを示す。シグナルペプチド、Ｔ４結合ドメイン、フェーズ０のエキソン／イントロン境界、およびフェーズ１／２のエキソン／イントロン境界が、ベータスリップ変異とともに示されている。

【図２】野生型マウスＴｔｒ遺伝子座、野生型ヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座（野生型ヒトＴＴＲ）、変異型ヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座（ベータスリップヒトＴＴＲ）の概略図（縮尺どおりに描かれていない）を示す。エキソン、イントロン、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）、３’ＵＴＲ、開始コドン（ＡＴＧ）、終止コドン（ＴＧＡ）、および選択カセットからのｌｏｘＰ　ｓｃａｒが示されている。白いボックスはマウスの配列を示し、黒いボックスはヒトの配列を示す。

【図３】変異型（ベータスリップ）のヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座を作成するための標的化の概略図（縮尺どおりに描かれていない）を示す。野生型マウスＴｔｒ遺伝子座、自己欠失型ネオマイシン（ＳＤＣ－Ｐｕｒｏ）選択カセット（ＭＡＩＤ８５３０）を備えた変異型ヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座のＦ０対立遺伝子、およびＳＤＣ－Ｐｕｒｏ選択カセット（ＭＡＩＤ８５３１）の除去によるｌｏｘＰ　ｓｃａｒを有する変異型ヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座のＦ１対立遺伝子が示されている。白いボックスはマウスの配列を示し、黒いボックスはヒトの配列を示す。

【図４】対立遺伝子喪失アッセイ（７５７６ｍＴＵ、４５５２ｍＴＵ、９２１２ｍＴＵ、７６５５ｍＴＵ、９０９０ｍＴＭ、７５７６ｍＴＤ、９２１２ｍＴＤ、および７６５５ｍＴＤ）、対立遺伝子の獲得アッセイ（７５７６ｈＴＵ、７６５５ｈＴＵ、７５７６ｈＴＤ、Ｐｕｒｏ）、保持アッセイ（９２０４ｍｒｅｔＵ、９０９０ｒｅｔＵ、９０９０ｒｅｔ

Ｕ２、９０９０ｒｅｔＵ３、９０９０ｒｅｔＤ、９０９０ｒｅｔＤ２、９０９０ｒｅｔＤ３、９２０４ｍｒｅｔＤ）、およびＣＲＩＳＰＲガイドによって破壊された領域をカバーするように設計されたＣＲＩＳＰＲアッセイ（９０９０ｍＴＧＵ、ｍＧＵ、９０９０ｍＴＧＤ、およびｍＧＤ）を含む、標的マウスＴｔｒ遺伝子座のスクリーニング戦略の概略図（縮尺どおりに描かれていない）を示す。白いボックスはマウスの配列を示し、黒いボックスはヒトの配列を示す。

【図５Ａ－Ｄ】２ヶ月齢のヒト化ＴＴＲ野生型マウス、ヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、およびＦ１Ｈ４対照マウスにおける血漿ｈＴＴＲレベル（図５Ａ）、血清総Ｔ４レベル（図５Ｂ）、無血清Ｔ４レベル（図５Ｃ）、および体温（図５Ｄ）を示す。ジストニアマウスは、丸で囲まれた赤い三角形でマークされている。ＴＴＲおよびＴ４レベルはＥＬＩＳＡによって測定された。

【図６Ａ】２ヶ月齢のヒト化ＴＴＲベータスリップマウスの血漿サンプルの変性ＰＡＧＥ後のウエスタンブロットを示す。Ｆ１Ｈ４試料を陰性対照として使用し、組換えＷＴヒトＴＴＲを陽性対照として使用した。トランスフェリンを負荷対照（ｌｏａｄｉｎｇ　ｃｏｎｔｒｏｌ）として使用した。

【図６Ｂ】２ヶ月齢のヒト化ＴＴＲベータスリップマウスの血漿試料と２ヶ月齢のヒト化ＴＴＲ野生型マウスの試料のネイティブＰＡＧＥ後のウエスタンブロットを示す。Ｆ１Ｈ４試料を陰性対照として使用し、組換えＷＴヒトＴＴＲを陽性対照として使用した。

【図７Ａ】ヒト化ＴＴＲベータスリップマウスにおけるジストニア表現型を示す。図７Ａは、２ヶ月齢のヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、および対照Ｆ１Ｈ４マウスの、体の軸に対する後肢の角度を評価するために首の後ろをつかんだ後の、写真を示す。図７Ｂは、正常なマウスの数とジストニア表現型を持つマウスの数の定量化を示す。ジストニアマウスは、丸で囲まれた赤い点でマークされている。

【図７Ｂ】同上

【図８Ａ－Ｃ】２ヶ月齢のヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、および対照Ｆ１Ｈ４マウスの、オープンフィールド行動試験における総距離（図８Ａ）、総活動量（図８Ｂ）、および立ち上がり（図８Ｃ）を含む、様々な読み取り値を示す。

【図９Ａ】２ヶ月齢のヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、および対照Ｆ１Ｈ４マウスの体重（図９Ａ）および握力（図９Ｂ）を示す。ジストニアマウスは、丸で囲まれた赤い三角形と点でマークされている。

【図９Ｂ】同上。

【図１０Ａ】２ヶ月齢のヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、対照Ｆ１Ｈ４マウスから単離した坐骨神経試料（図１０Ａ）と肝臓試料（図１０Ｂ）のコンゴーレッド染色を示す。それぞれの上部は、白色光の下で画像化された染色組織を示す。それぞれの下部は、直線偏光を使用して照射された染色組織を示す。

【図１０Ｂ】同上。

【発明を実施するための形態】

【００２９】

定義

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

【００３０】

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

関する。
【００３１】
本明細書で互換的に使用される、「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはそれらの類似体もしくは修飾バージョンを含む、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を含む。これらには、一本鎖、二本鎖、および多重鎖ＤＮＡもしくはＲＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド、ならびにプリン塩基、ピリミジン塩基、または他の天然、化学的に修飾された、生化学的に修飾された、非天然、もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれる。
【００３２】
１つのモノヌクレオチドペントース環の５’リン酸塩がホスホジエステル結合を介して一方向で、その隣の３’酸素に結合する手法でオリゴヌクレオチドを作製するように、モノヌクレオチドが反応するため、核酸は、「５’末端」および「３’末端」を有すると言われている。オリゴヌクレオチドの末端は、その５’リン酸塩がモノヌクレオチドペントース環の３’酸素に連結されていない場合、「５’末端」と呼ばれる。オリゴヌクレオチドの末端は、その３’酸素が別のモノヌクレオチドペントース環の５’リン酸塩に連結されていない場合、「３’末端」と呼ばれる。核酸配列は、より大きなオリゴヌクレオチドの内部に存在するとしても、５’および３’末端を有するとも言われ得る。線状または環状ＤＮＡ分子のいずれかにおいて、別個のエレメントは、「上流」または「下流」の５’もしくは３’エレメントであると呼ばれる。
【００３３】
「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、任意のプロトコルを使用してよい。
【００３４】
「発現ベクター」または「発現コンストラクト」または「発現カセット」という用語は、特定の宿主細胞または生命体における作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な適切な核酸配列に作動可能に連結された所望のコード配列を含む組換え核酸を指す。原核生物での発現に必要な核酸配列には、通常、プロモーター、オペレーター（任意選択）、リボソーム結合部位、およびその他の配列が含まれる。真核細胞は一般に、プロモーター、エンハンサー、終結およびポリアデニル化シグナルを利用することが知られており、必要な発現を犠牲にすることなく、一部の要素を削除したり、他の要素を追加したりできる。
【００３５】
「標的化ベクター」という用語は、相同組換え、非相同末端結合媒介ライゲーション、または細胞のゲノム中の標的位置への組換えの任意の他の手段によって導入され得る組換え核酸を指す。
【００３６】
「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つのエレメントを含み、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、またはそれを許容するエレメントを含む、組換え核酸を指す。ベクターおよび／または粒子は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、または他の核酸を、インビトロ、エクスビボ、またはインビボで細胞に導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。
【００３７】
タンパク質、核酸、および細胞に関して「単離された」という用語は、タンパク質、核酸、または細胞の実質的に純粋な調製物まで、通常はインサイチュに存在し得る他の細胞または生物成分に関して比較的精製されたタンパク質、核酸、細胞を含む。「単離された」という用語はまた、天然に存在する対応物を有さない細胞、タンパク質、および核酸、あるいは化学的に合成され、したがって他のタンパク質または核酸によって実質的に汚染されていないタンパク質または核酸を含む。「単離された」という用語はまた、それらが自然に付随する他のほとんどの細胞成分または生物成分（例えば、他の細胞タンパク質、

核酸、または細胞または細胞外成分）から分離または精製されたタンパク質、核酸、または細胞を含む。

【００３８】

「野生型」という用語は、（変異型、病変した、改変したなどとは対照的に）正常な状態または文脈に見られるような構造および／または活性を有する実体を指す。野生型遺伝子およびポリペプチドは、多くの場合、複数の異なる形態（例えば、対立遺伝子）で存在する。

【００３９】

「内因性配列」という用語は、細胞または非ヒト動物内で自然に発生する核酸配列を指す。例えば、非ヒト動物の内因性Ｔｔｒ配列は、非ヒト動物のＴｔｒ遺伝子座で天然に存在する天然のＴｔｒ配列を指す。

【００４０】

「外因性」分子または配列には、その形態の細胞には通常存在しない分子または配列が含まれる。通常の存在には、細胞の特定の発生段階および環境条件に関する存在が含まれる。外因性分子または配列には、例えば、内因性配列のヒト化バージョンなど、細胞内の対応する内因性配列の変異バージョンが含まれ得るか、または細胞内であるが、異なる形態の（すなわち、染色体内ではない）内因性配列に対応する配列が含まれ得る。対照的に、内因性分子または配列は、その形態で、特定の細胞において、特定の発生段階で、特定の環境条件下で通常存在する分子または配列を含む。

【００４１】

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

【００４２】

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

【００４３】

「遺伝子座」という用語は、遺伝子（または重要な配列）、ＤＮＡ配列、ポリペプチドコード配列、または生物のゲノムの染色体上の位置（ｐｏｓｉｔｉｏｎ）の特定の位置（

ｌｏｃａｔｉｏｎ）を指す。例えば、「Ｔｔｒ遺伝子座」は、Ｔｔｒ遺伝子、ＴｔｒＤＮＡ配列、トランスサイレチンをコードする配列、またはそのような配列が常駐すると同定されている生物のゲノムの染色体上のＴｔｒの位置の特定の位置を指し得る。「Ｔｔｒ遺伝子座」は、例えば、エンハンサー、プロモーター、５’および／もしくは３’非翻訳領域（ＵＴＲ）、またはそれらの組み合わせを含む、Ｔｔｒ遺伝子の調節エレメントを含み得る。

【００４４】

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

【００４５】

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

【００４６】

遺伝子の「コード領域」または「コード配列」は、タンパク質をコードする、エキソンで構成される遺伝子のＤＮＡまたはＲＮＡの部分で構成される。この領域は、５’末端の開始コドンで始まり、３’末端の終止コドンで終わる。

【００４７】

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

【００４８】

「作動可能な連結」または「作動可能に連結されている」とは、その両方の成分が正常に機能し、かつ成分の少なくとも１つが他の成分のうちの少なくとも１つに及ぶ機能を媒介し得る可能性を許すような、２つ以上の成分（例えば、プロモーターおよび別の配列エレメント）の並列を含む。例えば、プロモーターが、１つ以上の転写調節因子の存在または非存在に応じてコード配列の転写のレベルを制御する場合、そのプロモーターは、コード配列に作動可能に連結され得る。作動可能な連結は、そのような配列が相互に近接していること、またはトランスに作用する（例えば、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。

【００４９】
核酸の「相補性」とは、核酸の一方の鎖のヌクレオチド配列が、その核酸塩基基の配向のために、反対側の核酸鎖の別の配列と水素結合を形成することを意味する。ＤＮＡの相補的塩基は通常ＡとＴ、ＣとＧである。ＲＮＡでは通常ＣとＧ、ＵとＡである。相補性は完全または実質的／十分であり得る。２つの核酸間の完全な相補性は、２つの核酸が二重鎖を形成できることを意味し、二重鎖のすべての塩基がワトソン－クリック対形成によって相補的な塩基に結合する。「実質的」または「十分」に相補的とは、一方の鎖の配列が反対側の鎖の配列と完全におよび／または完全に相補的ではないが、２つの鎖の塩基間で十分な結合が起こり、ハイブリダイゼーション条件のセット（例えば、塩濃度と温度）で安定したハイブリッド複合体を形成することを意味する。このような条件は、配列と標準的な数学的計算を使用してハイブリダイズした鎖のＴｍ（融解温度）を予測するか、日常的な方法を使用してＴｍを経験的に決定することによって予測できる。Ｔｍは、２つの核酸鎖の間に形成されるハイブリダイゼーション複合体の集団が５０％変性する（すなわち、二本鎖核酸分子の集団が一本鎖に半分解離する）温度を含む。Ｔｍより低い温度では、ハイブリダイゼーション複合体の形成が有利であるが、Ｔｍより高い温度では、ハイブリダイゼーション複合体中の鎖の融解または分離が有利である。他の既知のＴｍ計算は核酸の構造的特徴を考慮するが、Ｔｍは、例えば、Ｔｍ＝８１．５＋０．４１（Ｇ＋Ｃ％）を使用することにより、１Ｍ　ＮａＣｌ水溶液中の既知のＧ＋Ｃ含有量を有する核酸について推定され得る。

【００５０】
「ハイブリダイゼーション条件」には、相補鎖相互作用および水素結合によって１つの核酸鎖が第２の核酸鎖に結合してハイブリダイゼーション複合体を生成する累積的環境が含まれる。そのような条件には、核酸を含む水溶液または有機溶液の化学成分およびそれらの濃度（例えば、塩、キレート剤、ホルムアミド）、および混合物の温度が含まれる。インキュベーション時間の長さや反応チャンバーの寸法などの他の要因が環境に寄与する可能性がある。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２．ｓｕｐ．ｎｄ　ｅｄ．，ｐｐ．１．９０－１．９１，９．４７－９．５１，１１．４７－１１．５７（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９）を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００５１】
ハイブリダイゼーションは、２つの核酸が相補配列を含むことを必要とするが、塩基間のミスマッチが可能である。２つの核酸間のハイブリダイゼーションに適切な条件は、周知の変数である、核酸の長さおよび相補性の度合いに依存する。２つの核酸配列間の相補性の度合いがより大きいと、それらの配列を有する核酸のハイブリッドの融解温度（Ｔｍ）の値がより大きくなる。短い区間の相補性（例えば、３５以下、３０以下、２５以下、２２以下、２０以下、または１８以下のヌクレオチドにわたる相補性）を有する核酸間のハイブリダイゼーションについて、ミスマッチの位置は、重要になる（上述のＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．の１１．７～１１．８を参照）。典型的には、ハイブリダイズ可能な核酸の長さは少なくとも約１０ヌクレオチドである。ハイブリダイズ可能な核酸の例示的な最小の長さは、少なくとも約１５ヌクレオチド、少なくとも約２０ヌクレオチド、少なくとも約２２ヌクレオチド、少なくとも約２５ヌクレオチド、および少なくとも約３０ヌクレオチドを含む。さらに、温度および洗浄溶液の塩濃度は、相補性の領域の長さおよび相補性の度合いなどの要素に従って、必要に応じて調整され得る。

【００５２】
ポリヌクレオチドの配列は、特異的にハイブリダイズするべきその標的核酸の配列と１００％相補性である必要はない。さらに、ポリヌクレオチドは、１つ以上のセグメントにわたってハイブリダイズし、介在するセグメント、または隣接するセグメントがハイブリダイゼーション事象に関与しない（例えば、ループ構造、またはヘアピン構造）ようにな

ってもよい。ポリヌクレオチド（例えば、ｇＲＮＡ）は、それらが標的とされている標的核酸配列内の標的領域に対する少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列相補性を含み得る。例えば、２０ヌクレオチドのうち１８ヌクレオチドが標的領域に相補的であり、したがって特異的にハイブリダイズするであろうｇＲＮＡは、９０％の相補性を表すであろう。この例において、残りの非相補性ヌクレオチドは、相補性ヌクレオチドとクラスターを形成するか、散在していてもよく、互いに、または相補性ヌクレオチドと連続的である必要はない。

【００５３】

核酸内の核酸配列の特定のストレッチ間の相補性のパーセントは、ＢＬＡＳＴプログラム（基本的なローカルアラインメント検索ツール）およびＰｏｗｅｒＢＬＡＳＴプログラム（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０、Ｚｈａｎｇ ａｎｄ Ｍａｄｄｅｎ（１９９７）Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．７：６４９－６５６、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）を使用することによりまたはＧＡＰプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ８ ｆｏｒ Ｕｎｉｘ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｋ，Ｍａｄｉｓｏｎ Ｗｉｓ．）を使用することにより、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ（１９８１）Ａｄｖ． Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２－４８９（すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。）のアルゴリズムを使用するデフォルト設定を使用して、日常的に決定することができる。

【００５４】

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

【００５５】

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

【００５６】

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

【００５７】

２つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」または「同一性」は、特定の比較ウィンドウで最大の一致のためにアラインさせる場合、同じである２つの配列の残基を指す。タンパク質に関して、配列同一性のパーセンテージを使用する場合、同一ではない残基位置は多くの場合に、保存的アミノ酸置換によって異なり、

その保存的アミノ酸置換では、アミノ酸残基は同様の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する他のアミノ酸残基で置換されており、したがって、分子の機能特性を変化させない。配列が保存的置換で異なる場合、配列同一性パーセントを、置換の保存的性質について補正するために、上方に調整してもよい。そのような保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有すると言われている。この調整を行う手段は、周知である。典型的には、これは、保存的置換を完全なミスマッチではなく部分的なミスマッチとしてスコアリングして、それによって、配列同一性パーセンテージを増加させることを含む。したがって、例えば、同一のアミノ酸が１のスコアを与えられ、非保存的置換が０のスコアを与えられる場合に、保存的置換は、０～１のスコアを与えられる。保存的置換のスコアリングは、例えば、プログラムＰＣ／ＧＥＮＥ（Ｉｎｔｅｌｌｉｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）で実行されるように計算される。

【００５８】

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

【００５９】

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

【００６０】

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

【表１】

表１．アミノ酸の分類

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

【００６１】

「相同」配列（例えば、核酸配列）は、例えば、既知の参照配列と少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるような、既知の参照配列と同一であるか、または実質的に同様である配列を含む。相同配列は、例えば、オルソログ配列およびパラロガス配列を含み得る。例えば、相同遺伝子は典型的には、種分化事象（オルソログ遺伝子）または遺伝子重複事象（パラロガス遺伝子）のいずれかを介して、共通の祖先ＤＮＡ配列に由来する。「オルソログ」遺伝子には、種分化によって共通の祖先遺伝子から進化した様々な種の遺伝子が含まれる。オルソログは典型的には、進化の過程で同じ機能を保持する。「パラロガス」遺伝子には、ゲノム内の重複によって関連する遺伝子が含まれる。パラログは、進化の過程で新しい機能を進化させることができる。

【００６２】

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

【００６３】

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

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

【００６４】

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

【００６５】

二本鎖切断（ＤＳＢ）に応答する修復は、主に２つの保存されたＤＮＡ修復経路（相同組換え（ＨＲ）と非相同末端結合（ＮＨＥＪ））を介して行われる。Ｋａｓｐａｒｅｋ＆Ｈｕｍｐｈｒｅｙ（２０１１）Ｓｅｍｉｎａｒｓ　ｉｎ　Ｃｅｌｌ＆Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．２２：８８６－８９７を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。同様に、外因性ドナー核酸によって媒介される標的核酸の修復は、２つのポリヌクレオチド間の遺伝情報の交換の任意のプロセスを含み得る。

【００６６】

「組換え」という用語は、２つのポリヌクレオチド間で遺伝情報を交換する任意のプロセスを含み、任意のメカニズムによって起こり得る。組換えは、相同性指向修復（ＨＤＲ）または相同組換え（ＨＲ）を介して起こり得る。ＨＤＲまたはＨＲには、ヌクレオチド配列の相同性を必要とし得る核酸修復の形式が含まれ、「標的」分子（すなわち、二本鎖切断を経験した分子）の修復のテンプレートとして「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝的情報の伝達をもたらす。いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、そのような伝達は、壊れた標的とドナーとの間に形成されるヘテロ二本鎖ＤＮＡのミスマッチ補正、および／またはドナーが標的の一部となる遺伝的情報を再合成するために使用される合成依存性鎖アニーリング、および／または関連するプロセスを含み得る。いくつかの場合では、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部が標的ＤＮＡに組み込まれる。Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｃｅｌｌ　１５３：９１０－９１８、Ｍａｎｄａｌｏｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１２）ＰＬＯＳ　ＯＮＥ　７：ｅ４５７６８：１－９、およびＷａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１：５３０－５３２を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００６７】

非相同末端結合（ＮＨＥＪ）は、相同テンプレートを必要とせずに、切断末端を互いにまたは外因性配列への直接ライゲーションによる、核酸における二本鎖切断の修復を含む

。ＮＨＥＪによる非隣接配列のライゲーションは、多くの場合、二本鎖切断の部位の近くで欠失、挿入、または転座をもたらし得る。例えば、ＮＨＥＪはまた、切断末端を外因性ドナー核酸の末端と直接ライゲーションすることにより、外因性ドナー核酸の標的化組み込みをもたらすことができる（すなわち、ＮＨＥＪベースの捕捉）。そのようなＮＨＥＪ媒介標的化組み込みは、相同性指向修復（ＨＤＲ）経路が容易に使用することができない場合（例えば、非分裂細胞、一次細胞、および相同性に基づくＤＮＡ修復を不十分に行う細胞）、外因性ドナー核酸の挿入に好ましい場合がある。さらに、相同性指向修復とは対照的に、切断部位に隣接する配列同一性の大きな領域に関する知識は必要なく、これは、ゲノム配列の知識が限られているゲノムを有する生物への標的化挿入を試みるときに有益であり得る。組み込みは、外因性ドナー核酸と切断されたゲノム配列との間の平滑末端のライゲーションを介して、または切断されたゲノム配列においてヌクレアーゼ剤によって生成されたものに適合するオーバーハングに隣接する外因性ドナー核酸を使用する粘着末端（すなわち、５’または３’オーバーハングを有する）のライゲーションを介して進行することができる。例えば、ＵＳ２０１１／０２０７２２、ＷＯ２０１４／０３３６４４、ＷＯ２０１４／０８９２９０、およびＭａｒｅｓｃａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．２３（３）：５３９－５４６を参照されたく、これらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。平滑末端がライゲーションされている場合、断片結合に必要なマイクロホモロジーの生成領域のために、標的および／またはドナーの切除が必要になる場合があり、これにより、標的配列に望ましくない改変が生じ得る。

【００６８】

「抗原結合タンパク質」という用語は、抗原に結合する任意のタンパク質を含む。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（二重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）、またはデイビスボディが含まれる（すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，５８６，７１３号）。

【００６９】

「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。

【００７０】

「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また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、さらに通常は、少なくとも５または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線結晶学および２次元核磁気共鳴が含まれる。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＥｐｉｔｏｐｅ　Ｍａｐｐｉｎｇ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，ｉｎ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．６６，Ｇｌｅｎｎ　Ｅ．Ｍｏｒｒｉｓ，Ｅｄ．（１９９６）を参照されたい。

【００７１】

本明細書に記載の抗体パラトープは、一般に、少なくとも、異種エピトープを特異的に認識する相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む（例えば、重鎖および／または軽鎖可変ドメイ

ンのＣＤＲ３領域）。
【００７２】
「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）鎖および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、重鎖可変ドメインおよび重鎖定常領域（C_H）を含む。重鎖の定数領域は、C_H1、C_H2、およびC_H3の３つのドメインを含む。各軽鎖は、軽鎖可変ドメインおよび軽鎖定常領域（C_L）を含む。重鎖およ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さらに分割され得る。各重鎖およ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で配置された３つのＣＤＲおよび４つのＦＲを含む：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４（重鎖ＣＤＲはＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、およびＨＣＤＲ３と略され得；軽鎖ＣＤＲはＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、およびＬＣＤＲ３と省略され得る）。「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、または約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。
【００７３】
その標的抗原への抗原結合タンパク質の特異的結合は、少なくとも10^6、10^7、10^8、10^9、または$10^{10}M^{-1}$の親和性での結合が含まれる。特異的結合は検出可能に大きさが高く、少なくとも１つの無関係な標的に対して起こる非特異的結合と区別できる。特異的結合は、特定の官能基間の結合の形成または特定の空間的適合（例えば、ロックおよびキータイプ）の結果である可能性があるが、非特異的結合は通常、ファンデルワールス力の結果である。しかしながら、特異的結合は、必ずしも抗原結合タンパク質が唯一の標的に結合することを意味するわけではない。
【００７４】
「アンチセンスＲＮＡ」という用語は、細胞内で転写されたメッセンジャーＲＮＡ鎖に相補的な一本鎖ＲＮＡを指す。
【００７５】
「低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）」という用語は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）経路を誘導する典型的な二本鎖ＲＮＡ分子を指す。これらの分子は長さが異なり（一般に１８～３０塩基対の間）、アンチセンス鎖の標的ｍＲＮＡに対して様々な程度の相補性を含む。すべてではないが、一部のｓｉＲＮＡは、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の５’または３’末端に不対オーバーハング塩基を有している。「ｓｉＲＮＡ」という用語は、２本の別々の鎖の二本鎖、ならびに二本鎖領域を含むヘアピン構造を形成することができる一本鎖を含む。二本鎖構造は、例えば、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０ヌクレオチド未満の長さであり得る。例えば、二本鎖構造は、長さが約２１～２３ヌクレオチド、長さが約１９～２５ヌクレオチド、または長さが約１９～２３ヌクレオチドであり得る。
【００７６】
「ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）」という用語は、ヘアピン構造で自己ハイブリダイズし、処理時にＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）経路を誘導できるＲＮＡ塩基の一本鎖を指す。これらの分子の長さは様々である（通常、約５０～９０ヌクレオチドの長さ、場合によっては最大２５０ヌクレオチドを超える長さである（例えば、ｍｉｃｒｏＲＮＡに適合したｓｈＲＮＡの場合））。ｓｈＲＮＡ分子は細胞内で処理されてｓｉＲＮＡを形成し、それが遺伝子発現をノックダウンする可能性がある。ｓｈＲＮＡはベクターに組み込むことができる。「ｓｈＲＮＡ」という用語は、短いヘアピンＲＮＡ分子が転写される可能性のあるＤＮＡ分子も指す。
【００７７】
１つ以上の列挙された要素を「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」または「含む（ｉｎｃ

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

【００７８】

「任意選択的の」または「任意選択で」は、続いて記載された事象または状況が起こっても起こらなくてもよく、ならびに説明が、当該事象または状況が起こる場合およびそれが起こらない場合を含むことを意味する。

【００７９】

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

【００８０】

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

【００８１】

「および／または」という用語は、関連する列挙された項目の１つ以上のありとあらゆる可能な組み合わせ、ならびに代替物（「または」）で解釈されるときの組み合わせの欠如を指し、包含する。

【００８２】

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

【００８３】

冠詞「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」の単数形は、文脈が別段に明確に規定していない限り、複数形の言及を含む。例えば、「タンパク質」または「少なくとも１つのタンパク質」という用語は、それらの混合物を含む複数のタンパク質を含み得る。

【００８４】

統計的に有意とは、ｐ≦０．０５を意味する。

［発明を実施するための形態］

【００８５】

Ⅰ．概要

本明細書に開示されるのは、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物細胞および非ヒト動物、ならびにそのような非ヒト動物細胞および非ヒト動物を使用する方法である。そのような非ヒト動物細胞および非ヒト動物を作製する方法も本明細書に開示される。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物ゲノム、およびそのような非ヒト動物ゲノムを使用する方法も本明細書に開示される。ベータスリップ変異を含むヒト化非ヒト動物ＴＴＲ遺伝子およびヌクレアーゼ剤ならびに非ヒト動物ＴＴＲ遺伝子をヒト化するのに使用するための標的化ベクターも本明細書に開示される。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物細胞または非ヒト動物は、ヒトトランスサイレチンタンパク質またはヒトトランスサイレチンタンパク質の１つ以上の断片を含むキメラトランスサイレチンタンパク質を発現する。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物は、非常に早期にアミロイドーシスを発症する。例えば、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含むマウスは、約２ヶ月齢でアミロイドーシスを発症する。これは、アミロイドーシスを非常に急速に発症するＴＴＲアミロイドーシスの最初に報告されたインビボモデルである。このような非ヒト動物細胞および非ヒト動物は、エクスビボまたはインビボでヒトＴＴＲ標的化剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ゲノム編集剤）の送達または有効性を評価するために使用

できる、エクスビボまたはインビボでのそのような薬剤の有効性または送達を最適化する方法で使用することができる。

【００８６】

本明細書に開示される非ヒト動物細胞および非ヒト動物のいくつかでは、非ヒト動物ゲノムＤＮＡのほとんどまたはすべてが、オーソロガスヒトゲノムＤＮＡと１対１で置き換えられている。保存された調節エレメントは無傷のままである可能性が高く、ＲＮＡプロセシングを受けるスプライシング転写物はｃＤＮＡよりも安定しているため、ｃＤＮＡが挿入された非ヒト動物と比較して、イントロン－エキソン構造とスプライシング機構が維持されている場合、発現レベルは高くなるはずである。対照的に、非ヒト動物のＴｔｒ遺伝子座へのヒトＴＴＲ　ｃＤＮＡの挿入（例えば、５’ＵＴＲへの人工ベータグロビンイントロンの挿入とともに）は、非ヒト動物Ｔｔｒの最初のエキソンおよびイントロン内に含まれるものなどの保存された調節エレメントを消滅させる。非ヒト動物のゲノム配列をオーソロガスなヒトゲノム配列に置き換えると、内因性Ｔｔｒ遺伝子座からの導入遺伝子が忠実に発現する可能性が高くなる。同様に、内因性の非ヒト動物のＴｔｒ遺伝子座ではなくランダムなゲノム遺伝子座にヒトＴＴＲコード配列をトランスジェニック挿入したトランスジェニック非ヒト動物は、Ｔｔｒ発現の内因性調節を正確に反映しない。非ヒト動物ゲノムＤＮＡのほとんどまたはすべてを１対１でオーソロガスヒトゲノムＤＮＡに置き換えることで生じるヒト化ＴＴＲ対立遺伝子は、真のヒト標的またはヒトＴＴＲ標的化試薬の真のヒト標的の近似値を提供する（例えば、ヒトＴＴＲを標的とするように設計されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９試薬）、それにより、生きている動物におけるそのような薬剤の有効性と作用機序の試験、ならびにヒト化タンパク質とヒト化遺伝子が存在するＴＴＲの唯一のバージョンである環境での薬物動態学および薬力学研究を可能にする。

【００８７】

ＩＩ．ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物

本明細書に開示される細胞および非ヒト動物は、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む細胞または非ヒト動物は、ヒトトランスサイレチンタンパク質または部分的にヒト化されたキメラトランスサイレチンタンパク質を発現し、ネイティブトランスサイレチンタンパク質の１つ以上の断片がヒトトランスサイレチンからの対応する断片で置き換えられている。

【００８８】

Ａ．トランスサイレチン（ＴＴＲ）

本明細書に記載の細胞および非ヒト動物は、ベータスリップ変異を含むヒト化トランスサイレチン（Ｔｔｒ）遺伝子座を含む。トランスサイレチン（ＴＴＲ）は、１２７アミノ酸、５５ｋＤａの血清および脳脊髄液輸送タンパク質であり、主に肝臓で合成されるが、脈絡叢によっても産生される。プレアルブミン、チロキシン結合プレアルブミン、ＡＴＴＲ、ＴＢＰＡ、ＣＴＳ、ＣＴＳ１、ＨＥＬ１１１、ＨｓＴ２６５１、ＰＡＬＢとも呼ばれている。本来の状態では、ＴＴＲは四量体として存在する。ホモ接合体では、ホモ四量体は同一の１２７アミノ酸のベータシートに富むサブユニットを含む。ヘテロ接合体では、ＴＴＲ四量体は変異型および／または野生型サブユニットで構成され、通常は統計的に組み合わされる。ＴＴＲは、血清と脳脊髄液の両方でチロキシン（Ｔ４）とレチノール結合ＲＢＰ（レチノール結合タンパク質）を運ぶ役割を果たす。

【００８９】

文脈から別段明らかでない限り、ヒトトランスサイレチン（ＴＴＲ）またはその断片またはドメインへの言及は、アイソフォームおよびその対立遺伝子変異体を含む天然の野生型ヒトアミノ酸配列を含む。トランスサイレチン前駆体タンパク質にはシグナル配列（通常は２０アミノ酸）が含まれているが、成熟したトランスサイレチンタンパク質には含まれていない。例示的なＴＴＲポリペプチド配列は、アクセッション番号ＮＰ＿０００３６２．１（ＮＣＢＩ）およびＰ０２７６６．１（ＵｎｉＰｒｏｔ）（同一、それぞれ配列番号１に記載）によって示される。残基には、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ０２７６６．１に従って番号を付けることができ、成熟タンパク質の最初のアミノ酸（つまり、

２０アミノ酸のシグナル配列を含まない）を残基１と指定する。その他のＴＴＲタンパク質では、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ０２７６６．１の対応する残基に従って、最大アラインメントで残基に番号が付けられる。

【００９０】

ヒトＴＴＲ遺伝子は１８番染色体上に位置しており、４つのエキソンと３つのイントロンが含まれている。例示的なヒトＴＴＲ遺伝子は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＧ＿００９４９０．１（配列番号３）によって示される配列の残基５００１～１２２５８に由来する。配列番号３の４つのエキソンは、それぞれ、残基１～２０５、１１３０～１２６０、３３５４～３４８９、および６８０２～７２５８を含む。配列番号３のＴＴＲコード配列は、残基１３７～２０５、１１３０～１２６０、３３５４～３４８９、および６８０２～６９０９を含む。例示的なヒトＴＴＲ　ｍＲＮＡは、ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿０００３７１．３（配列番号２）によって示される。Ｇ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓベータスリップ変異を含むＴＴＲタンパク質をコードする例示的なヒトＴＴＲコード配列は、配列番号１０に記載されている。Ｇ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓベータスリップ変異を含むトランスサイレチン前駆体タンパク質は、配列番号９に記載されている。

【００９１】

マウスのＴｔｒ遺伝子は１８番染色体に位置しており、４つのエキソンと３つのイントロンも含まれている。例示的なマウスＴｔｒ遺伝子は、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＣ＿０００００８４．６（配列番号７）によって示される配列の残基２０６６５２５０～２０６７４３２６に由来する。配列番号７の４つのエキソンは、それぞれ、残基１～２５８、１２０７～１３３７、４７３０～４８６５、および８３８２～９０７７を含む。配列番号７のＴｔｒコード配列は、残基１９０～２５８、１２０７～１３３７、４７３０～４８６５、および８３８２～８４８９を含む。例示的なマウスＴＴＲタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ０７３０９．１またはＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿０３８７２５．１（同一であり、それぞれ配列番号５に記載されている）によって示される。例示的なマウスＴｔｒ　ｍＲＮＡは、ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿０１３６９７．５（配列番号６）によって示される。

【００９２】

例示的なラットＴＴＲタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ０２７６７によって示されている。例示的なブタＴＴＲタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ５０３９０によって示されている。例示的なニワトリＴＴＲタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ２７７３１によって示されている。例示的なウシＴＴＲタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｏ４６３７５によって示されている。例示的なヒツジＴＴＲタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ１２３０３によって示されている。例示的なチンパンジーＴＴＲタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｑ５Ｕ７Ｉ５によって示されている。例示的なオランウータンＴＴＲタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｑ５ＮＶＳ２によって示されている。例示的なウサギＴＴＲタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ０７４８９によって示されている。例示的なカニクイザル（マカク）ＴＴＲタンパク質は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｑ８ＨＸＷ１によって示されている。

【００９３】

トランスサイレチン（ＴＴＲ）アミロイドーシスは、病原性の誤って折り畳まれたＴＴＲと、ＴＴＲで構成されるアミロイド線維の細胞外沈着を特徴とする全身性疾患である。ＴＴＲアミロイドーシスは一般に、ネイティブＴＴＲ四量体形態の不安定化（環境条件または遺伝的条件による）によって引き起こされ、ＴＴＲの解離、誤った折り畳み、およびアミロイド線維への凝集を引き起こし、様々な器官や組織に蓄積して進行性の機能障害を引き起こす。解離したモノマーは、誤って折り畳まれたタンパク質凝集体およびアミロイド線維を形成する傾向がある。

【００９４】

ヒトでは、野生型ＴＴＲ四量体と、変異型サブユニットと野生型サブユニットで構成さ

れる混合四量体の両方が、有糸分裂後の組織の変性につながるアミロイド形成の過程で、解離、誤った折り畳み、および凝集し得る。したがって、ＴＴＲアミロイドーシスは、ＴＴＲの変異に起因する、または変異していない誤って折り畳まれたＴＴＲに起因する病原性の折り畳まれたＴＴＲによって引き起こされる疾患を包含する。

【００９５】

老人性全身性アミロイドーシス（ＳＳＡ）および老人性心アミロイドーシス（ＳＣＡ）は、心臓の心筋細胞の外側および内側に野生型ＴＴＲアミロイドが沈着することから生じる加齢に伴うタイプのアミロイドーシスである。ＴＴＲアミロイドーシスは、遺伝性（家族性）アミロイドーシスの最も一般的な形態でもあり、ＴＴＲタンパク質を不安定化させる変異によって引き起こされる。ＴＴＲ遺伝子の点変異に関連するＴＴＲアミロイドーシスには、家族性アミロイド多発神経障害（ＦＡＰ）、家族性アミロイド心筋症（ＦＡＣ）、および中枢神経系選択的アミロイドーシス（ＣＮＳＡ）が含まれる。

【００９６】

Ｂ．ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座

本明細書に記載のヒト化ＴＴＲ遺伝子座は、ベータスリップ変異を含む。ベータスリップ変異の例は、ヒトトランスサイレチン三重変異体Ｇ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓによって引き起こされるコンフォメーション変化を説明するものである。本明細書および以下の残基の番号付けは、シグナルペプチドを含まない成熟ヒトトランスサイレチンタンパク質の番号付けを指す（例えば、トランスサイレチン前駆体タンパク質の残基２１から始まるので、トランスサイレチン前駆体タンパク質のこれらの残基は、それぞれ残基７３、７４、および７５になる）。ベータ鎖Ｄの３残基シフトにより、Ｌ５８は通常Ｌ５５が占める位置に配置される。これにより、残基Ｓ５０～Ｇ６３を含むＣＤループ、ベータ鎖Ｄ、およびＤＥループ領域の隣接する残基に構造的な影響が生じるが、ベータ鎖Ｃの位置はそのまま残る。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＥｎｅｑｖｉｓｔ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ ６：１２０７－１２１８を参照されたい。Ｇ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓバリアントは、生理学的条件で自発的に重合し、まだ可溶性であることを除いて、アミロイドのすべての特性を示す高分子量の凝集体を生じさせる。Ｇ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓバリアントは、チオフラビンＴとコンゴーレッドに結合し、トリプシンに対する感受性が高く、線維性構造を形成し、これにより、クロスベータ構造と一致する繊維回折パターンが生成される。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＥｎｅｑｖｉｓｔ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ ６：１２０７－１２１８を参照されたい。

【００９７】

一般に、本明細書で言及されるベータスリップ変異は、ＴＴＲタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含む。ベータ鎖Ｄとは、ヒトＴＴＲタンパク質またはヒトＴＴＲタンパク質と最適に整列した場合の非ヒトＴＴＲタンパク質の対応する領域におけるベータ鎖Ｄを意味する。例えば、変異したＴＴＲタンパク質がヒトＴＴＲタンパク質と最適に整列している場合、変異は、ヒトＴＴＲの残基Ｌ５８に対応する残基を、ヒトＴＴＲの残基Ｌ５５に対応する残基が通常占める位置に配置する、ベータ鎖Ｄの３残基シフトを引き起こす可能性がある。より具体的には、ベータスリップ変異は、変異したＴＴＲタンパク質がヒトＴＴＲタンパク質と最適に整列している場合、ヒトＴＴＲタンパク質のＧ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓに対応する三重変異であり得る。内因性Ｔｔｒ遺伝子（またはＴＴＲタンパク質）の残基（例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸）は、特定の比較ウィンドウ（例えば、ＴＴＲコード配列）にわたって最大の一致を得るために２つの配列を最適に整列させることによって、ヒトＴＴＲ遺伝子（またはＴＴＲタンパク質）の残基に対応するように決定することができ、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド（またはアミノ酸）配列の部分は、２つの配列の最適なアラインメント（例えば、配列の同一性および相補性に関して本明細書の他の場所での議論を参照されたい）のための参照配列（付加または欠失は含まれない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。最適に整列されたときに同じ位置にある場合に、２つの残基は一致する。

【００９８】
本明細書に開示されるヒト化ベータスリップＴＴＲ遺伝子座は、Ｔｔｒ遺伝子全体がベータスリップ変異を含む対応するオーソロガスヒトＴＴＲ配列で置き換えられているＴｔｒ遺伝子座であり得るか、またはそれは、Ｔｔｒ遺伝子の一部のみが対応するオーソロガスなヒトＴＴＲ配列に置き換えられている（すなわち、ヒト化されている）Ｔｔｒ遺伝子座であり得る。あるいは、それは、Ｔｔｒ遺伝子の一部が削除され、対応するオーソロガスなヒトＴＴＲ配列の一部が挿入されているＴｔｒ遺伝子座であり得る。Ｔｔｒ遺伝子座の一部のみがヒト化されている場合、ベータスリップ変異は残りの内因性Ｔｔｒ配列または挿入されたオーソロガスヒトＴＴＲ配列に存在する可能性がある。いくつかの例において、挿入されるオーソロガスなヒトＴＴＲ遺伝子座の部分は、内因性Ｔｔｒ遺伝子座から削除されるよりも多くのヒトＴＴＲ遺伝子座を含む。内因性Ｔｔｒ配列の特定のセグメントに対応するヒトＴＴＲ配列は、ヒトＴＴＲおよび内因性Ｔｔｒが最適に整列される（完全に一致する残基の最大数）場合に、内因性Ｔｔｒ配列の特定のセグメントと整列するヒトＴＴＲの領域を指す。対応するオーソロガスなヒト配列は、例えば、相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）またはゲノムＤＮＡを含み得る。任意選択で、対応するオーソロガスなヒトＴＴＲ配列は、非ヒト動物におけるコドン使用頻度に基づいてコドン最適化されるように改変される。置換または挿入された（すなわち、ヒト化された）領域は、エキソンなどのコード領域、イントロンなどの非コード領域、非翻訳領域、もしくは調節領域（例えば、プロモーター、エンハンサー、もしくは転写リプレッサー結合要素）、またはそれらの任意の組み合わせを含み得る。ヒト化ＴＴＲ遺伝子座はまた、対応するオーソロガスな内因性配列を置き換えることなく、内因性Ｔｔｒ遺伝子座に挿入されたヒトＴＴＲ配列を含み得る。一例として、ヒトＴＴＲ遺伝子の１、２、３、もしくは４つすべてのエキソン（または１、２、３、もしくは４つすべてのエキソンのすべてまたは一部）に対応するエキソンをヒト化することができる。特定の例では、エキソン２および３に対応するエキソンおよびエキソン１および４のコード領域（すなわち、５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲを含まない）を内因性ＴＴＲ遺伝子座から削除することができ、ヒトＴＴＲ遺伝子のエキソン２～４を含むヒトＴＴＲ遺伝子の領域およびエキソン１のコード領域（すなわち、５’ＵＴＲを含まない）を挿入することができる。特定の例では、エキソン２および３に対応するエキソンおよびエキソン１および４のコード領域（すなわち、５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲを含まない）を内因性ＴＴＲ遺伝子座から削除することができ、エキソン２および３を含むヒトＴＴＲ遺伝子の領域およびエキソン１および４のコード領域、ならびにヒトＴＴＲ遺伝子の３’ＵＴＲの全部または一部（すなわち、５’ＵＴＲを含まない）を挿入することができる。あるいは、抗ヒトＴＴＲ抗原結合タンパク質によって認識されるエピトープをコードするＴＴＲの領域、またはヒトＴＴＲ標的化試薬（例えば、小分子）によって標的化される領域をヒト化することができる。同様に、ヒトＴＴＲ遺伝子の１、２、または３つすべてのイントロンに対応するイントロンは、ヒト化することも、内因性のままにすることもできる。一例では、ヒトＴＴＲ遺伝子の３つのイントロンすべてに対応するイントロンをヒト化することができる（例えば、内因性遺伝子座から削除し、対応するヒトイントロンで置き換える）。

【００９９】
ヒト化ＴＴＲ遺伝子座は、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列（例えば、オーソロガスな野生型ヒトＴＴＲ配列）で置き換えられたものであり得る。一例として、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の置換された領域は、コード配列（すなわち、エキソンの全部または一部）および非コード配列（すなわち、イントロンの全部または一部）、例えば、少なくとも１つのエキソンおよび少なくとも１つのイントロンの両方を含み得る。例えば、置換された領域は、少なくとも１つのエキソンおよび少なくとも１つのイントロンを含むことができる。コード配列と非コード配列の両方を含む置換領域は、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の隣接領域であり得、置換されたコード配列と置換された非コード配列との間に介在配列がないことを意味する。例えば、置換された領域は、少なくとも１つのエキソンおよび少なくとも１つの隣接するイントロンを含むことができる。置換さ

れた領域は、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の１つのエキソン、２つのエキソン、３つのエキソン、４つのエキソン、またはすべてのエキソンを含むことができる。挿入されたヒトＴＴＲ配列は、ヒトＴＴＲ遺伝子の１つのエキソン、２つのエキソン、３つのエキソン、４つのエキソン、またはすべてのエキソンを含むことができる。同様に、置換された領域は、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の１つのイントロン、２つのイントロン、３つのイントロン、またはすべてのイントロンを含むことができる。挿入されたヒトＴＴＲ配列は、ヒトＴＴＲ遺伝子の１つのイントロン、２つのイントロン、３つのイントロン、またはすべてのイントロンを含むことができる。任意選択で、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の１つ以上のイントロンおよび／または１つ以上のエキソンは、改変されないままである（すなわち、削除および置換されない）。例えば、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の第１のエキソンは変更されないままにすることができる。同様に、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の第１のエキソンと第１のイントロンは変更されないままにすることができる。

【０１００】

ヒト化ＴＴＲ遺伝子座によってコードされるトランスサイレチン前駆体タンパク質は、天然のトランスサイレチン前駆体タンパク質および／またはヒトトランスサイレチン前駆体タンパク質の活性を保持することができる。例えば、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座によってコードされるトランスサイレチン前駆体タンパク質は、ベータスリップ変異を含む天然のトランスサイレチン前駆体タンパク質および／またはベータスリップ変異を含むヒトトランスサイレチン前駆体タンパク質の活性を保持することができる。

【０１０１】

１つの特定の例では、トランスサイレチン前駆体タンパク質の全コード配列を削除して、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置き換えることができる。例えば、開始コドンで始まり終止コドンで終わる内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域を削除して、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置き換えることができる。

【０１０２】

調節配列を含む隣接する非翻訳領域もヒト化することができる。あるいは、調節配列を含む隣接する非翻訳領域は、内因性のままであり得る。Ｔｔｒ遺伝子座の最初のエキソンには、通常、開始コドンの上流に５’非翻訳領域が含まれる。同様に、Ｔｔｒ遺伝子座の最後のエキソンには、通常、終止コドンの下流に３’非翻訳領域が含まれている。Ｔｔｒ開始コドンの上流およびＴｔｒ終止コドンの下流の領域は、改変されていないか、または削除されてオーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置き換えられ得る。例えば、５’非翻訳領域（ＵＴＲ）、３’ＵＴＲ、もしくは５’ＵＴＲと３’ＵＴＲの両方をヒト化することができ、または５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、もしくは５’ＵＴＲと３’ＵＴＲの両方を内因性のままにできる。ヒトの５’および３’ＵＴＲの一方または両方を挿入することができ、および／または内因性の５’および３’ＵＴＲの一方または両方を削除することができる。１つの特定の例では、５’ＵＴＲは内因性のままである。別の特定の例では、３’ＵＴＲはヒト化されているが、５’ＵＴＲは内因性のままである。別の特定の例では、５’ＵＴＲは内因性のままであり、ヒトＴＴＲ　３’ＵＴＲは内因性Ｔｔｒ遺伝子座に挿入される。例えば、ヒトＴＴＲ　３’ＵＴＲは、内因性３’ＵＴＲを置き換えることができるか、または内因性３’ＵＴＲを置き換えることなく挿入することができる（例えば、内因性３’ＵＴＲの上流に挿入することができる）。例えば、内因性５’ＵＴＲ（またはその一部）および内因性３’ＵＴＲ（またはその一部）は、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座に留まり得、そしてヒト３’ＵＴＲ（またはその一部）は、内因性３’ＵＴＲの上流に挿入され得る。

【０１０３】

トランスサイレチン前駆体タンパク質の１つ以上のドメインをコードする内因性Ｔｔｒ遺伝子座の１つ以上の領域をヒト化することができる。同様に、トランスサイレチン前駆体タンパク質の１つ以上のドメインをコードする内因性Ｔｔｒ遺伝子座の１つ以上の領域は、改変されないままであることができる（すなわち、削除および置換されない）。例えば、トランスサイレチン前駆体タンパク質は、通常、Ｎ末端にシグナルペプチドを有している。シグナルペプチドは、例えば、長さが約２０アミノ酸であり得る。シグナルペプチ

ドをコードする内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域は、改変されないままである（すなわち、削除および置換されない）か、または削除されて、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置換され得る。同様に、抗ヒトＴＴＲ抗原結合タンパク質によって認識されるエピトープをコードする内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域をヒト化することができる。

【０１０４】

オルソログ配列による置換の程度に応じて、プロモーターなどの調節配列は、内因性であるか、または置換するヒトオルソログ配列によって供給され得る。例えば、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座は、内因性の非ヒト動物Ｔｔｒプロモーターを含むことができる。遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座でのトランスサイレチン前駆体タンパク質のコード配列は、内因性Ｔｔｒプロモーターに作動可能に連結することができる。

【０１０５】

特定の例として、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座は、内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、Ｔｔｒ開始コドンから終止コドンまでの領域を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるものであってよい。挿入されるヒトＴＴＲ配列は、ヒトＴＴＲ　３’ＵＴＲをさらに含むことができる。例えば、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座でのヒトＴＴＲ配列は、ＴＴＲ開始コドンから３’ＵＴＲの末端までの領域を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。任意選択で、改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座のＴｔｒコード配列は、内因性Ｔｔｒプロモーターに作動可能に連結されている。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座におけるヒトＴＴＲ配列は、配列番号１４と少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座でのヒトＴＴＲ配列は、配列番号１４と少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座は、配列番号１２または１３と少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座は、配列番号１２または１３と少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座のコード配列（ＣＤＳ）は、配列番号１０（または同じタンパク質をコードするその縮重）と、少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座のコード配列（ＣＤＳ）は、配列番号１０（または同じタンパク質をコードするその縮重）と、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座によってコードされる結果として生じるヒトトランスサイレチン前駆体タンパク質は、配列番号９と少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含む、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座によってコードされる結果として生じるヒトトランスサイレチン前駆体タンパク質は、配列番号９と少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含む、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。

【０１０６】

ヒト化ＴＴＲ野生型遺伝子座を含む対照の非ヒト動物も生成することができる。ヒト化ＴＴＲ遺伝子座での野生型ヒトＴＴＲ配列は、配列番号１７と少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ヒト化ＴＴＲ遺伝子座での野生型ヒトＴＴＲ配列は、配列番号１７と少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ヒト化ＴＴＲ野生型遺伝子座は、配列番号１５または１６と少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ヒト化ＴＴＲ野生型遺伝子座は、配列番号１５または１６と少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ヒト化ＴＴＲ野生型遺伝子座のコード配列（ＣＤＳ）は、配列番号４（または同じタンパク質をコードするその縮重）と、少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ヒト化ＴＴＲ野生型遺伝子座のコード配列（ＣＤＳ）は、配列番号４（または同じタンパク質をコードするその縮重）と、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ヒト化ＴＴＲ野生型遺伝子座によってコードされる結果として生じるヒトトランスサイレチン前駆体タンパク質は、配列番号１と少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。ヒト化ＴＴＲ野生型遺伝子座によってコードされる結果として生じるヒトトランスサイレチン前駆体タンパク質は、配列番号１と少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、または約１００％同一の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。

【０１０７】

別の特定の例として、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座は、削除され、オーソロガスなヒトＴＴＲ配列で置き換えられる内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が、第２のＴｔｒエキソンの開始から終止コドンへの領域を含む、それから本質的になる、またはそれからなるものであり得る。挿入されるヒトＴＴＲ配列は、ヒトＴＴＲ　３’ＵＴＲをさらに含むことができる。例えば、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座でのヒトＴＴＲ配列は、第２のヒトＴＴＲエキソンの開始から３’ＵＴＲの末端までの領域を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。任意選択で、改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座のＴｔｒコード配列は、内因性Ｔｔｒプロモーターに作動可能に連結されている。

【０１０８】

ヒト化ＴＴＲ遺伝子座から発現されるＴＴＲタンパク質は、完全にヒトＴＴＲタンパク質またはキメラ内因性／ヒトＴＴＲタンパク質（例えば、非ヒト動物がマウスである場合、キメラマウス／ヒトＴＴＲタンパク質）であり得る。例えば、トランスサイレチン前駆体タンパク質のシグナルペプチドは内因性であり得、タンパク質の残りはヒトであり得る。あるいは、トランスサイレチン前駆体タンパク質のＮ末端は内因性であり得、タンパク質の残りはヒトであり得る。例えば、Ｎ末端５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５アミノ酸は内因性である可能性があり、残りはヒトである可能性がある。特定の例では、Ｎ末端の２３アミノ酸は内因性であり、タンパク質の残りはヒトである。

【０１０９】

任意選択で、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座は他の要素を含むことができる。そのような要素の

例には、選択カセット、レポーター遺伝子、リコンビナーゼ認識部位、または他の要素が含まれ得る。一例として、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座は、リコンビナーゼ認識配列（例えば、ｌｏｘＰ部位）に隣接する取り外し可能な選択カセット（例えば、自己欠失（ｓｅｌｆ－ｄｅｌｅｔｉｎｇ）選択カセット）を含むことができる。あるいは、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座は他の要素を欠く可能性がある（例えば、選択カセットを欠く可能性があり、および／またはレポーター遺伝子を欠く可能性がある）。適切なレポーター遺伝子およびレポータータンパク質の例は、本明細書の他の場所に開示されている。適切な選択マーカーの例には、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（ｎｅｏ$_{r}$）、ハイグロマイシンＢホスホトランスフェラーゼ（ｈｙｇ$_{r}$）、ピューロマイシン－Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ（ｐｕｒｏ$_{r}$）、ブラストサイジンＳデアミナーゼ（ｂｓｒ$_{r}$）、キサンチン／グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ｇｐｔ）、または単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ＨＳＶ－ｋ）が含まれる。リコンビナーゼの例には、Ｃｒｅ、Ｆｌｐ、およびＤｒｅリコンビナーゼが含まれる。Ｃｒｅリコンビナーゼ遺伝子の一例はＣｒｅｉであり、Ｃｒｅリコンビナーゼをコードする２つのエキソンがイントロンによって分離され、原核細胞での発現を防ぐ。そのようなリコンビナーゼは、核への局在化を促進するための核局在化シグナルをさらに含むことができる（例えば、ＮＬＳ－Ｃｒｅｉ）。リコンビナーゼ認識部位には、部位特異的リコンビナーゼによって認識され、組換え事象の基質として機能することができるヌクレオチド配列が含まれる。リコンビナーゼ認識部位の例には、ＦＲＴ、ＦＲＴ１１、ＦＲＴ７１、ａｔｔｐ、ａｔｔ、ｒｏｘ、ならびにｌｏｘＰ、ｌｏｘ５１１、ｌｏｘ２２７２、ｌｏｘ６６、ｌｏｘ７１、ｌｏｘＭ２、およびｌｏｘ５１７１などのｌｏｘ部位が含まれる。

【０１１０】

レポーター遺伝子や選択カセットなどの他の要素は、リコンビナーゼ認識部位に隣接する自己欠失カセットである可能性がある。例えば、すべての目的のためにそれぞれ全体が参照により本明細書に組み込まれる、ＵＳ８，６９７，８５１およびＵＳ２０１３／０３１２１２９を参照されたい。一例として、自己欠失カセットは、マウスＰｒｍ１プロモーターに作動可能に連結されたＣｒｅｉ遺伝子（イントロンによって分離されたＣｒｅリコンビナーゼをコードする２つのエキソンを含む）およびヒトユビキチンプロモーターに作動可能に連結されたネオマイシン耐性遺伝子を含み得る。Ｐｒｍ１プロモーターを使用することにより、Ｆ０動物のオスの生殖細胞で特異的に自己欠失カセットを削除することができる。選択マーカーをコードするポリヌクレオチドは、標的とされる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。プロモーターの例は、本明細書のいずこかに記載されている。別の特定の例として、自己欠失選択カセットは、１つ以上のプロモーター（例えば、ヒトユビキチンおよびＥＭ７プロモーターの両方）に作動可能に連結されたハイグロマイシン耐性遺伝子コード配列、それに続くポリアデニル化シグナル、続いて１つ以上のプロモーター（例えば、ｍＰｒｍ１プロモーター）に作動可能に連結されたＣｒｅｉコード配列、続いて別のポリアデニル化シグナルを含み得、カセット全体がｌｏｘＰ部位に隣接している。

【０１１１】

ヒト化ＴＴＲ遺伝子座も条件付き対立遺伝子である可能性がある。例えば、条件付き対立遺伝子は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＵＳ２０１１／０１０４７９９に記載されているように、多機能対立遺伝子であってよい。例えば、条件付き対立遺伝子は、以下を含むことができる：（ａ）標的遺伝子の転写に関してセンス方向の作動配列、（ｂ）センスまたはアンチセンス方向の薬物選択カセット（ＤＳＣ）、（ｃ）アンチセンス配向の目的のヌクレオチド配列（ＮＳＩ）、（ｄ）逆方向の条件付き反転モジュール（ＣＯＩＮ、エキソン分割イントロンと反転可能な遺伝子トラップのようなモジュールを利用）。例えばＵＳ２０１１／０１０４７９９を参照されたい。条件付き対立遺伝子は、第１のリコンビナーゼへの曝露時に再結合して、（ｉ）作動配列およびＤＳＣを欠き、（ｉｉ）センス方向のＮＳＩとアンチセンス方向のＣＯＩＮを含む、条件付き対立遺伝子を形成する再結合可能なユニットをさらに含むことができる。例えば

ＵＳ２０１１／０１０４７９９を参照されたい。
【０１１２】
Ｃ．ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト細胞および非ヒト動物
本明細書の他の場所に記載されているように、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物細胞および非ヒト動物が提供される。本明細書の他の場所に記載されているようなベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物ゲノムもまた提供される。ゲノム、細胞、または非ヒト動物は、雄または雌であってよい。細胞または非ヒト動物は、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座に対してヘテロ接合性またはホモ接合性であり得る。同様に、ゲノムは、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座に対してヘテロ接合性またはホモ接合性であり得る。二倍体生物は、各遺伝子座に２つの対立遺伝子を有する。対立遺伝子の各対は、特定の遺伝子座の遺伝子型を表す。遺伝子型は、特定の遺伝子座に２つの同一の対立遺伝子がある場合はホモ接合として、および２つの対立遺伝子が異なる場合はヘテロ接合として記載されている。ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物は、その生殖系列にヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含むことができる。
【０１１３】
本明細書で提供される非ヒト動物細胞は、例えば、Ｔｔｒ遺伝子座またはヒトＴＴＲ遺伝子座と相同またはオーソロガスなゲノム遺伝子座を含む任意の非ヒト細胞であり得る。同様に、本明細書で提供される非ヒト動物ゲノムは、例えば、Ｔｔｒ遺伝子座またはヒトＴＴＲ遺伝子座に相同またはオーソロガスなゲノム遺伝子座を含む任意の非ヒト動物ゲノムであり得る。細胞は、例えば、動物細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、およびヒト細胞を含む真核細胞であり得る。「動物」という用語には、哺乳類、魚類、鳥類が含まれる。同様に、ゲノムは真核細胞に由来する可能性がある。哺乳動物細胞は、例えば、非ヒト哺乳動物細胞、げっ歯類細胞、ラット細胞、マウス細胞、またはハムスター細胞であり得る。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、非ヒト霊長類、サル、類人猿、オランウータン、ネコ、イヌ、ウサギ、ウマ、家畜（例えば、雌ウシ、去勢雄ウシ他などのウシ種、ヒツジ、ヤギ他などのヒツジ種、ならびにブタおよびイノシシなどのブタ種）が含まれる。家畜および農業動物も含まれる。「非ヒト」という用語はヒトを除外する。
【０１１４】
細胞はまた、任意のタイプの未分化または分化状態であり得る。例えば、細胞は、全能性細胞、多能性細胞（例えば、ヒト多能性細胞、またはマウス胚性幹（ＥＳ）細胞またはラットＥＳ細胞などの非ヒト多能性細胞）、または非多能性細胞であってよい。全能性細胞には、任意の細胞型を生じさせることができる未分化細胞が含まれ、多能性細胞には、複数の分化細胞型に発達する能力を有する未分化細胞が含まれる。そのような多能性および／または全能性細胞は、例えば、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞などのＥＳ細胞またはＥＳ様細胞であり得る。ＥＳ細胞には、胚への導入時に発達中の胚の任意の組織に寄与することができる胚由来の全能性または多能性細胞が含まれる。ＥＳ細胞は、胚盤胞の内部細胞塊に由来するものであり得、３つの脊椎動物胚葉（内胚葉、外胚葉、および中胚葉）のうちのいずれかの細胞に分化することができる。
【０１１５】
本明細書で提供される細胞はまた、生殖細胞（例えば、精子または卵母細胞）であってよい。細胞は、有糸分裂能力のある細胞または有糸分裂的に不活性な細胞、減数分裂能力のある細胞または減数分裂的に不活性な細胞であり得る。同様に、細胞はまた、初代体細胞または初代体細胞ではない細胞であり得る。体細胞には、配偶子、生殖細胞、配偶子細胞、または未分化幹細胞ではない任意の細胞が含まれる。例えば、細胞は、肝芽細胞または肝細胞などの肝細胞であり得る。
【０１１６】
本明細書で提供される適切な細胞には、一次細胞も含まれる。一次細胞には、生物、器官、または組織から直接単離された細胞または細胞の培養物が含まれる。一次細胞には、形質転換も不死化もされていない細胞が含まれる。それらには、以前に組織培養で継代さ

れなかったか、または以前に組織培養で継代されたが、組織培養で無限に継代することができない生物、器官、または組織から得られた任意の細胞が含まれる。そのような細胞は、従来の技術によって単離することができ、例えば、肝細胞を含む。

【０１１７】

本明細書で提供される他の適切な細胞には、不死化細胞が含まれる。不死化細胞には、通常は無限に増殖することはないが、変異または改変に起因して、正常な細胞老化を回避し、代わりに分裂を続けることができる多細胞生物からの細胞も含まれる。そのような変異または改変は、自然に発生し得るか、または意図的に誘導され得る。不死化細胞株の特定の例は、ＨｅｐＧ２ヒト肝癌細胞株である。多くの種類の不死化細胞が周知である。不死化細胞または一次細胞には、典型的には、組換え遺伝子またはタンパク質の培養または発現に使用される細胞が含まれる。

【０１１８】

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

【０１１９】

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

【０１２０】

特定の例では、非ヒト動物細胞は、胚性幹（ＥＳ）細胞または肝細胞であり、例えばマウスまたはラットのＥＳ細胞または肝細胞である。

【０１２１】

本明細書に記載のベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物は、本明細書の他の場所に記載されている方法によって作製することができる。「動物」という用語には、哺乳類、魚類、鳥類が含まれる。他の非ヒト哺乳動物には、例えば、非ヒト霊長類、サル、類人猿、オランウータン、ネコ、イヌ、ウマ、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター、およびモルモット）、ならびに家畜（例えば、雌ウシおよび去勢雄ウシなどのウシ種、ヒツジおよびヤギなどのヒツジ種、ならびにブタおよびイノシシなどのブタ種）が含まれる。家畜および農業動物も含まれる。「非ヒト動物」という用語は、ヒトを除外する。好ましい非ヒト動物には、例えば、マウスおよびラットなどのげっ歯類が含まれる。

【０１２２】

非ヒト動物は、あらゆる遺伝的背景からのものであってよい。例えば、適切なマウスは、１２９系統、Ｃ５７ＢＬ／６系統、１２９とＣ５７ＢＬ／６の雑種、ＢＡＬＢ／ｃ系統、またはスイスウェブスター系統からのものであり得る。１２９系統の例には、１２９Ｐ１、１２９Ｐ２、１２９Ｐ３、１２９Ｘ１、１２９Ｓ１（例えば、１２９Ｓ１／ＳＶ、１２９Ｓ１／Ｓｖｌｍ）、１２９Ｓ２、１２９Ｓ４、１２９Ｓ５、１２９Ｓ９／ＳｖＥｖＨ、１２９Ｓ６（１２９／ＳｖＥｖＴａｃ）、１２９Ｓ７、１２９Ｓ８、１２９Ｔ１、および１２９Ｔ２が含まれる。例えば、Ｆｅｓｔｉｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｇｅｎｏｍｅ １０：８３６を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。Ｃ５７ＢＬ系統の例には、Ｃ５７ＢＬ／Ａ、Ｃ５７ＢＬ／Ａｎ、Ｃ５７ＢＬ／ＧｒＦａ、Ｃ５７ＢＬ／Ｋａｌ＿ｗＮ、Ｃ５７ＢＬ／６、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ、Ｃ５７ＢＬ／６ＢｙＪ、Ｃ５７ＢＬ／６ＮＪ、Ｃ５７ＢＬ／１０、Ｃ５７ＢＬ／１０ＳｃＳｎ、Ｃ５７ＢＬ／１０Ｃｒ、およびＣ５７ＢＬ／Ｏｌａが含まれる。適切なマウスはまた、前述の１２９系統と前述のＣ５７ＢＬ／６系統の雑種（例えば、５０％１２９と５０％Ｃ５７ＢＬ／６）からのものであり得る。同様に、適切なマウスは、前述の１２９系統の雑種または前述のＢＬ／６系統の雑種（例えば、１２９Ｓ６（１２９／ＳｖＥｖＴａｃ）系統）からのものであり得る。

【０１２３】

同様に、ラットは、例えば、ＡＣＩラット系統、Ｄａｒｋ　Ａｇｏｕｔｉ（ＤＡ）ラット系統、Ｗｉｓｔａｒラット系統、ＬＥＡラット系統、Ｓｐｒａｇｕｅ　Ｄａｗｌｅｙ（ＳＤ）ラット系統、またはフィッシャーＦ３４４またはフィッシャーＦ６などのフィッシャーラット系統からのものであり得る。ラットはまた、上述の２つ以上の系統の雑種に由来する系統から得ることができる。例えば、適切なラットは、ＤＡ系統またはＡＣＩ系統からのものであり得る。ＡＣＩラット系統は、白い腹と足、およびＲＴ１^{av1}ハプロタイプを有する黒いアグーチを持っていることを特徴としている。このような系統は、Ｈａｒｌａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓを含む様々な供給源から入手できる。Ｄａｒｋ　Ａｇｏｕｔｉ（ＤＡ）ラット系統は、アグーチコートとＲＴ１^{av1}ハプロタイプを有することを特徴としている。このようなラットは、Ｃｈａｒｌｅｓ　ＲｉｖｅｒおよびＨａｒｌａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓを含む様々な供給源から入手できる。いくつかの適切なラットは近交系ラット系統に由来する可能性がある。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＵＳ２０１４／０２３５９３３を参照されたい。

【０１２４】

ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物は、いくつかの表現型を有する可能性がある。一例として、そのような非ヒト動物は、対照の野生型非ヒト動物またはベータスリップ変異のないヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む対照動物と比較して活動亢進し得る。作業例でより詳細に説明されているように、オープンフィールド試験で総距離、総活動量、および総立ち上がりの１つ以上を測定することにより、活動亢進を評価できる。

【０１２５】

非ヒト動物はまた、ジストニアまたは異所性筋表現型（ｄｙｓｔｏｐｉｃ　ｍｕｓｃｌｅ　ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ）を示す可能性がある。例えば、非ヒト動物は、作業例でより詳細に説明されるように、後肢ジストニアまたは後肢ジストニア表現型（例えば、ジストニア性後肢収縮（ｒｅｔｒａｃｔｉｏｎ））を示し得る。

【０１２６】

非ヒト動物はまた、凝集形態のＴＴＲおよび／またはアミロイド沈着（例えば、具体的にはＴＴＲアミロイド沈着）を含み得る。例えば、アミロイド沈着は、作業例でより詳細に示されているように、坐骨神経にあり得る。ただし、アミロイド沈着は他の器官や組織にも存在する可能性がある。

【０１２７】

いくつかの非ヒト動物では、これらの表現型（例えば、アミロイド沈着）のいずれかが、早くも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２ヶ月齢には明らかになる。例えば、表現型（例えば、アミロイド沈着）は、約２ヶ月齢までに明らかになる可能性がある。

【０１２８】

ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物は、任意のレベルでヒト化ＴＴＲタンパク質を発現することができる。例えば、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物は、血清中で少なくとも約０．１、少なくとも約０．２、または少なくとも約０．３μｇ／ｍＬのレベルでヒト化ＴＴＲタンパク質を発現することができる。あるいは、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物は、血清中で、少なくとも約０．５、少なくとも約１、少なくとも約２、少なくとも約３、少なくとも約４、少なくとも約５、少なくとも約６、少なくとも約７、少なくとも約８、少なくとも約９、少なくとも約１０、少なくとも約１２、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１８、少なくとも約２０、少なくとも約２２、少なくとも約２４、少なくとも約２５、少なくとも約２６、少なくとも約２８、または少なくとも約３０μｇ／ｍＬのレベルでヒト化ＴＴＲタンパク質を発現することができる。

【０１２９】

ＩＩＩ．インビボまたはエクスビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の有効性を評価するための

ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物を使用する方法
インビボまたはエクスビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬（例えば、治療用分子または複合体）の送達または有効性を評価または最適化するために、本明細書の他の場所に記載されるベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物を使用するための様々な方法が提供される。非ヒト動物は、アミロイド沈着およびヒトにおけるＴＴＲアミロイドーシスの表現型を反映する表現型をもたらすベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲタンパク質を産生する。これらの表現型とアミロイド沈着は非常に早い齢で起こる。これは、アミロイドーシスを非常に急速に発症するＴＴＲアミロイドーシスの最初の報告されたインビボモデルであるため、非ヒト動物は、ＴＴＲアミロイドーシスを研究するための有用なツールである。さらに、非ヒト動物はヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含むため、非ヒト動物はヒトＴＴＲ標的化試薬の有効性をより正確に反映する。本明細書に開示される非ヒト動物は、ランダムなゲノム遺伝子座でのヒトＴＴＲ配列のトランスジェニック挿入ではなくヒト化内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含み、かつヒト化内因性Ｔｔｒ遺伝子座は、人工ｃＤＮＡ配列ではなく、コード領域と非コード領域の両方からのオーソロガスなヒトゲノムＴＴＲ配列を含むため、このような非ヒト動物は、ヒトＴＴＲ遺伝子を標的とするように設計されたゲノム編集試薬をテストするのに特に有用である。

【０１３０】

Ａ．インビボまたはエクスビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の有効性を試験する方法
本明細書の他の場所に記載されているように、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物を使用して、インビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の送達または有効性を評価するための様々な方法が提供される。そのような方法は、（ａ）非ヒト動物にヒトＴＴＲ標的化試薬を導入することと、（ｂ）ヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価することと、を含むことができる。

【０１３１】

ヒトＴＴＲ標的化試薬は、ヒトＴＴＲ遺伝子座（ヒトＴＴＲ遺伝子）、ヒトＴＴＲ　ｍＲＮＡ、またはヒトトランスサイレチンタンパク質を標的化する任意の生物学的または化学的薬剤であり得る。ヒトＴＴＲ標的化試薬の例は、本明細書の他の場所に開示されている。例えば、ヒトＴＴＲ標的化試薬は、ＴＴＲ標的化核酸（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓガイド ＲＮＡ、ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、もしくは低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ））またはＴＴＲ標的化タンパク質（例えば、Ｃａｓ９、ＺＦＮ、もしくはＴＡＬＥＮなどのＣａｓタンパク質）をコードする核酸であり得る。あるいは、ヒトＴＴＲ標的化試薬は、ＴＴＲ標的化抗体または抗原結合タンパク質、あるいはヒトＴＴＲを標的化する他の任意の大分子または小分子であり得る。

【０１３２】

そのようなヒトＴＴＲ標的化試薬は、本明細書の他の場所でより詳細に開示されるような任意の送達方法（例えば、ＡＡＶ、ＬＮＰ、またはＨＤＤ）および任意の投与経路によって投与することができる。治療用複合体および分子を送達する手段および投与経路は、本明細書の他の場所でより詳細に開示されている。特定の方法では、試薬はＡＡＶを介した送達を介して送達される。例えば、ＡＡＶ８を使用して肝臓を標的にすることができる。他の特定の方法では、試薬はＬＮＰを介した送達によって送達される。他の特定の方法では、試薬は流体力学的送達（ＨＤＤ）によって送達される。用量は、任意の適切な用量であり得る。例えば、試薬（例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡ）がＬＮＰ媒介送達によって送達されるいくつかの方法では、用量は、約０．０１～約１０ｍｇ／ｋｇの間、約０．０１～約５ｍｇ／ｋｇの間、約０．０１～約４ｍｇ／ｋｇの間、約０．０１～約３ｍｇ／ｋｇの間、約０．０１～約２ｍｇ／ｋｇの間、約０．０１～約１ｍｇ／ｋｇの間、約０．１～約１０ｍｇ／ｋｇの間、約０．１～約６ｍｇ／ｋｇの間；約０．１～約５ｍｇ／ｋｇの間、約０．１～約４ｍｇ／ｋｇの間、約０．１～約３ｍｇ／ｋｇの間、約０．１～約２ｍｇ／ｋｇの間、約０．１～約１ｍｇ／ｋｇの間、約０．３～約１０ｍｇ／ｋｇの間、約０．３～約６ｍｇ／ｋｇの間、約０．３～約５ｍｇ／ｋｇの間、約０．３～約４ｍｇ／ｋｇの間、約０．３～約３ｍｇ／ｋｇの間、約０．３～約２ｍｇ／ｋｇの間、約

０．３～約１ｍｇ／ｋｇの間、約０．１ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、または約３ｍｇ／ｋｇであり得る。特定の例では、用量は約０．１～約６ｍｇ／ｋｇの間、約０．１～約３ｍｇ／ｋｇの間、または約０．１～約２ｍｇ／ｋｇの間である。特定の例では、ヒトＴＴＲ標的化試薬はゲノム編集試薬であり、ＬＮＰ用量は約１ｍｇ／ｋｇであり、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座でのゲノム編集パーセントは約７０％から約８０％の間である。別の特定の例では、ヒトＴＴＲ標的化試薬はゲノム編集試薬であり、ＬＮＰ用量は約０．３ｍｇ／ｋｇであり、編集パーセントは約５０％～約８０％の間である。別の特定の例では、ヒトＴＴＲ標的化試薬はゲノム編集試薬であり、ＬＮＰ用量は約０．１ｍｇ／ｋｇであり、編集パーセントは約２０％～約８０％の間である。別の特定の例では、ＬＮＰ用量は約１ｍｇ／ｋｇであり、血清ＴＴＲレベルは、対照レベルの約０％～約１０％の間、または約０％～約３５％の間で低下する。別の特定の例では、ＬＮＰ用量は約０．３ｍｇ／ｋｇであり、血清ＴＴＲレベルは、対照レベルの約０％～約２０％または約０％～約９５％に低下する。別の特定の例では、ＬＮＰ用量は約０．１ｍｇ／ｋｇであり、血清ＴＴＲレベルは、対照レベルの約０％～約６０％または約０％～約９９％に低下する。

【０１３３】

ヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価するための方法はよく知られており、本明細書の他の場所で提供されている。活性の評価は、本明細書の他の場所に開示されているように、任意の細胞型、任意の組織型、または任意の器官型であり得る。いくつかの方法では、活性の評価は肝細胞で行われる。一例として、評価は、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座での非相同末端結合（ＮＨＥＪ）活性の測定を含み得る。これは、例えば、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座内の挿入または欠失の頻度を測定することを含み得る。ＴＴＲ標的化試薬がゲノム編集試薬（例えば、ヌクレアーゼ剤）である場合、そのような方法は、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座の改変を評価することを含み得る。例えば、評価は、非ヒト動物から単離された１つ以上の細胞におけるヒト化ＴＴＲ遺伝子座の配列決定（例えば、次世代シーケンシング）を含み得る。評価は、非ヒト動物から標的器官（例えば、肝臓）または組織を単離することと、標的器官または組織におけるヒト化ＴＴＲ遺伝子座の改変を評価することと、を含み得る。評価はまた、標的器官または組織内の２つ以上の異なる細胞型におけるヒト化ＴＴＲ遺伝子座の改変を評価することを含み得る。同様に、評価は、非標的器官または組織（例えば、２つ以上の非標的器官または組織）を非ヒト動物から単離することと、および非標的器官または組織におけるヒト化ＴＴＲ遺伝子座の改変を評価することと、を含み得る。

【０１３４】

そのような方法はまた、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座によって産生されるｍＲＮＡの発現レベルを測定すること、またはベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座によってコードされるタンパク質の発現レベルを測定することを含む。例えば、タンパク質レベルは、特定の細胞、組織、または器官のタイプ（例えば、肝臓）で測定することができ、または分泌レベルは、血清で測定することができる。ヒト化ＴＴＲ遺伝子座から発現されるＴｔｒ　ｍＲＮＡまたはタンパク質の発現を評価するための方法は、本明細書の他の場所で提供されており、よく知られている。

【０１３５】

１つの特定の例として、ヒトＴＴＲ標的化試薬がゲノム編集試薬（ヌクレアーゼ剤など）である場合、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座での編集パーセント（例えば、溶解した細胞のプールからＰＣＲ反応で読み取られた配列の総数に対して観察された挿入または欠失の総数）を評価することができる（例えば、肝細胞において）。

【０１３６】

一例として、ヒトＴＴＲ標的化試薬がゲノム編集試薬（例えば、ヌクレアーゼ剤）である場合、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座での編集パーセントを評価することができる（例えば、肝細胞において）。例えば、編集パーセント（例えば、溶解した細胞のプールからＰＣＲ反応で読み取られた配列の総数に対して観察された挿入または欠失の総数）は、少なくとも

約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％であり得、または例えば、約１％～約９９％、約１０％～約９９％、約２０％から～約９９％、約３０％～約９９％、約４０％～約９９％、約５０％～約９９％、約６０％～約９９％、約１％～約９０％、約１０％～約９０％、約２０％～約９０％、約３０％～約９０％、約４０％～約９０％、約５０％～約９０％、約６０％～約９０％、約１％～約８０％、約１０％～約８０％、約２０％～約８０％、約３０％～約８０％、約４０％～約８０％、約５０％～約８０％、または約６０％～約８０％の間であり得る。

【０１３７】

別の例として、血清ＴＴＲレベルを評価することができる。例えば、血清ＴＴＲレベルは、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％低下させることができ、または例えば、約１％～約９９％、約１０％～約９９％、約２０％～約９９％、約３０％～約９９％、約４０％～約９９％、約５０％～約９９％、約６０％～約９９％、約７０％～約９９％、約８０％～約９９％、約１％～約９０％、約１０％～約９０％、約２０％～約９０％、約３０％～約９０％、約４０％～約９０％、約５０％～約９０％、約６０％～約９０％、約７０％～約９０％、または約８０％～約９０％低下させることができる。

【０１３８】

そのような方法はまた、本明細書の他の場所でより詳細に記載されるようなオープンフィールド試験などにおいて、非ヒト動物の活動／活動亢進を評価することを含み得る。そのような方法はまた、本明細書の他の場所でより詳細に記載されるように、ＴＴＲの凝集形態の存在を評価すること（例えば、ネイティブＰＡＧＥおよびウエスタンブロットによって）またはアミロイド沈着の存在を評価することを含み得る。そのような方法はまた、本明細書の他の場所でより詳細に記載されるように、非ヒト動物がジストニアまたはジストニア表現型を示すかどうかを評価することを含み得る。

【０１３９】

インビボでの活性を評価するための上記で提供される様々な方法はまた、本明細書の他の場所に記載されるように、エクスビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価するために使用され得る。

【０１４０】

いくつかの方法において、ヒトＴＴＲ標的化試薬は、ヒトＴＴＲ遺伝子を標的化するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼ剤などのヌクレアーゼ剤である。そのような方法は、例えば、（ａ）ヒトＴＴＲ遺伝子を切断するように設計されたヌクレアーゼ剤（例えば、Ｃａｓ９などのタンパク質およびヒトＴＴＲ遺伝子のガイドＲＮＡ標的配列を標的とするように設計されたガイドＲＮＡ）を非ヒト動物に導入することと、（ｂ）ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座の改変を評価することと、を含み得る。

【０１４１】

例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓヌクレアーゼの場合、ガイドＲＮＡがＣａｓタンパク質と複合体を形成し、Ｃａｓタンパク質をヒト化ＴＴＲ遺伝子座に向けると、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座の改変が誘導され、Ｃａｓ／ガイドＲＮＡ複合体はガイドＲＮＡ標的配列を切断し、細胞による修復を引き起こす（例えば、ドナー配列が存在しない場合、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）を介して）。

【０１４２】

任意選択で、２つ以上のガイドＲＮＡを導入することができ、それぞれが、ヒトＴＴＲ遺伝子内の異なるガイドＲＮＡ標的配列を標的とするように設計されている。例えば、２つのガイドＲＮＡは、２つのガイドＲＮＡ標的配列の間のゲノム配列を切除するように設計することができる。ヒト化ＴＴＲ遺伝子座の改変は、第１のガイドＲＮＡがＣａｓタン

パク質と複合体を形成してＣａｓタンパク質をヒト化ＴＴＲ遺伝子座に向け、第２のガイドＲＮＡがＣａｓタンパク質と複合体を形成してＣａｓタンパク質をヒト化ＴＴＲ遺伝子座に向け、第１のＣａｓ／ガイドＲＮＡ複合体が第１のガイドＲＮＡ標的配列を切断し、かつ第２のＣａｓ／ガイドＲＮＡ複合体が第２のガイドＲＮＡ標的配列を切断したときに誘導され、その結果、介在する配列が切除される。

【０１４３】

任意選択で、ヒトＴＴＲ遺伝子と再結合できおよび改変することができる外因性ドナー核酸もまた、非ヒト動物に導入される。任意選択で、ヌクレアーゼ剤またはＣａｓタンパク質は、本明細書の他の場所に記載されているように、外因性ドナー核酸に係留され得る。ヒト化ＴＴＲ遺伝子座の改変は、例えば、ガイドＲＮＡがＣａｓタンパク質と複合体を形成し、Ｃａｓタンパク質をヒト化ＴＴＲ遺伝子座に向け、Ｃａｓ／ガイドＲＮＡ複合体がガイドＲＮＡ標的配列を切断し、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座は外因性ドナー核酸と再結合してヒト化ＴＴＲ遺伝子座を改変する。次に、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座は、例えば、相同性指向修復（ＨＤＲ）またはＮＨＥＪ媒介挿入を介して、外因性ドナー核酸で修復することができる。任意のタイプの外因性ドナー核酸を使用することができ、その例は本明細書の他の場所に提供されている。

【０１４４】

Ｂ．インビボまたはエクスビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の送達または有効性を最適化する方法

細胞または非ヒト動物へのヒトＴＴＲ標的化試薬の送達を最適化するため、またはインビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の活性または有効性を最適化するために、様々な方法が提供される。そのような方法は、例えば、以下を含むことができる。（ａ）第１の非ヒト動物または第１の細胞において、上記のようなヒトＴＴＲ標的化試薬の有効性を試験する方法を１回目に実行することと、（ｂ）可変要素を変更し、方法を第２の非ヒト動物（すなわち、同じ種の）または第２の細胞において変更された可変要素を用いて２回目に実行することと、（ｃ）ステップ（ａ）のヒト－ＴＴＲ標的化試薬の活性をステップ（ｂ）のヒト－ＴＴＲ標的化試薬の活性と比較し、より高い活性をもたらす方法を選択することと、を含むことができる。

【０１４５】

ヒト－ＴＴＲ標的化試薬の送達、有効性、または活性を測定する方法は、本明細書の他の場所に開示されている。例えば、そのような方法は、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座の改変を測定することを含み得る。ヒト化ＴＴＲ遺伝子座のより効果的な改変は、非ヒト動物または細胞内の望ましい効果に応じて異なることを意味し得る。例えば、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座のより効果的な改変は、より高いレベルの改変、より高い精度、より高い一貫性、またはより高い特異性の１つ以上またはすべてを意味し得る。ヒト化ＴＴＲ遺伝子座のより高いレベルの改変（すなわち、より高い効力）は、特定の標的細胞型内、特定の標的組織内、または特定の標的器官（例えば、肝臓）内で標的とされる細胞のより高いパーセンテージを指す。より高い精度は、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座のより正確な改変を指す（例えば、同じ改変を有するか、または余分な意図しない挿入および欠失なしに所望の改変を有する標的細胞のより高いパーセンテージ（例えば、ＮＨＥＪインデル））。より高い一貫性とは、複数のタイプの細胞、組織、または器官が標的にされている場合、異なるタイプの標的細胞、組織、または器官の間でヒト化ＴＴＲ遺伝子座のより一貫した改変を指す（例えば、肝臓内のより多くの細胞型の改変）。特定の器官が標的にされている場合、より高い一貫性は、器官内（例えば、肝臓）のすべての場所全体でより一貫性のある改変を指すこともできる。より高い特異性は、標的とされるゲノム遺伝子座もしくは複数の遺伝子座に関するより高い特異性、標的とされる細胞型に関するより高い特異性、標的とされる組織型に関するより高い特異性、または標的とされる器官に関するより高い特異性を指すことができる。例えば、ゲノム遺伝子座の特異性の増加は、オフターゲットゲノム遺伝子座の改変が少ないことを指す（例えば、標的ゲノム遺伝子座の改変に変えて、あるいは加えて、意図しないオフターゲットゲノム遺伝子座に改変を有する標的細

胞のパーセンテージが低い）。同様に、細胞型、組織、または器官型の特異性の増加は、特定の細胞型、組織型、または器官型が標的にされている場合、オフターゲットの細胞型、組織型、または器官型の改変が少ないことを指す。（例えば、特定の器官（例えば、肝臓）が標的とされる場合、意図された標的ではない器官または組織の細胞の改変が少ない）。

【０１４６】

あるいは、そのような方法は、ＴＴＲ ｍＲＮＡまたはＴＴＲタンパク質の発現を測定することを含み得る。一例では、より効果的なヒトＴＴＲ標的化剤は、ＴＴＲ ｍＲＮＡまたはＴＴＲタンパク質発現のより大きな減少をもたらす。あるいは、そのような方法は、ＴＴＲ活性を測定することを含み得る。一例では、より効果的なヒトＴＴＲ標的化剤は、ＴＴＲ活性のより大きな減少をもたらす。

【０１４７】

変更される可変要素は、任意のパラメーターにすることができる。一例として、変更された可変要素は、ヒトＴＴＲ標的化試薬または複数の試薬が細胞または非ヒト動物に導入されるパッケージングまたは送達方法であり得る。ＬＮＰ、ＨＤＤ、およびＡＡＶなどの送達方法の例は、本明細書の他の場所に開示されている。例えば、変更された可変要素はＡＡＶ血清型であり得る。同様に、投与はＬＮＰ媒介送達を含み得、変更された可変要素はＬＮＰ製剤であり得る。別の例として、変更された可変要素は、ヒトＴＴＲ標的化試薬または複数の試薬を細胞または非ヒト動物に導入するための投与経路であり得る。静脈内、硝子体内、実質内、および鼻腔内注入（ｎａｓａｌ ｉｎｓｔｉｌｌａｔｉｏｎ）などの投与経路の例は、本明細書の他の場所に開示されている。

【０１４８】

別の例として、変更された可変要素は、導入された１つ以上のヒトＴＴＲ標的化試薬の濃度または量であり得る。別の例として、変更された可変要素は、導入された別のヒトＴＴＲ標的化試薬（例えば、ガイドＲＮＡ、Ｃａｓタンパク質、外因性ドナー核酸、ＲＮＡｉ剤、またはＡＳＯ）の濃度または量と比較した、導入された１つのヒトＴＴＲ標的化試薬（例えば、ガイドＲＮＡ、Ｃａｓタンパク質、外因性ドナー核酸、ＲＮＡｉ剤、またはＡＳＯ）の濃度または量であり得る。

【０１４９】

別の例として、変更された可変要素は、試薬の活性または有効性を評価するタイミングと比較した、ヒトＴＴＲ標的化試薬または複数の試薬を導入するタイミングであり得る。別の例として、変更された可変要素は、ヒトＴＴＲ標的化試薬または複数の試薬が導入される回数または頻度であり得る。別の例として、変更された可変要素は、導入された別のヒトＴＴＲ標的化試薬（例えば、ガイドＲＮＡ、Ｃａｓタンパク質、外因性ドナー核酸、ＲＮＡｉ剤、またはＡＳＯ）の導入のタイミングと比較した、導入された１つのヒトＴＴＲ標的化試薬（例えば、ガイドＲＮＡ、Ｃａｓタンパク質、外因性ドナー核酸、ＲＮＡｉ剤、またはＡＳＯ）の導入のタイミングであり得る。

【０１５０】

別の例として、変更された可変要素は、ヒトＴＴＲ標的化試薬または複数の試薬が導入される形態であり得る。例えば、ガイドＲＮＡは、ＤＮＡの形態またはＲＮＡの形態で導入することができる。Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９）は、ＤＮＡの形態、ＲＮＡの形態、またはタンパク質の形態（例えば、ガイドＲＮＡと複合体を形成している）で導入することができる。外因性ドナー核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、一本鎖、二本鎖、線状、環状などであり得る。同様に、各構成要素は、安定性のため、オフターゲット効果を低減するため、送達を容易にするためなどのための改変の様々な組み合わせを含むことができる。同様に、例えば、ＲＮＡｉ剤およびＡＳＯは、安定性、オフターゲット効果を低減するため、送達を容易にするためなどのための改変の様々な組み合わせを含むことができる。別の例として、変更された可変要素は、導入されるヒトＴＴＲ標的化試薬または複数の試薬であり得る（例えば、異なる配列を有する異なるガイドＲＮＡを導入する、異なるＣａｓタンパク質を導入する（例えば、異なる配列を有する異なるＣａｓタンパク質、または

異なる配列を有するが同じＣａｓタンパク質アミノ酸配列をコードする核酸を導入する）、または異なる配列を有する異なる外因性ドナー核酸を導入する）。

【０１５１】

特定の例では、ヒトＴＴＲ標的化試薬は、Ｃａｓタンパク質と、ヒトＴＴＲ遺伝子のガイドＲＮＡ標的配列を標的化するように設計されたガイドＲＮＡとを含む。そのような方法では、変更された可変要素は、ガイドＲＮＡ配列および／またはガイドＲＮＡ標的配列であり得る。同様に、ヒトＴＴＲ標的化試薬がＲＮＡｉ剤またはＡＳＯを含む場合、変更された可変要素は、異なる配列を有する異なるＲＮＡｉ剤またはＡＳＯを導入することができる。いくつかのそのような方法において、Ｃａｓタンパク質およびガイドＲＮＡは、それぞれＲＮＡの形態で投与することができ、変更された可変要素は、ガイドＲＮＡに対するＣａｓ　ｍＲＮＡの比であり得る（例えば、ＬＮＰ製剤において）。いくつかのそのような方法において、変更された可変要素は、ガイドＲＮＡ改変であり得る（例えば、改変を有するガイドＲＮＡは、改変されていないガイドＲＮＡと比較される）。

【０１５２】

Ｃ．ヒトＴＴＲ標的化試薬

ヒトＴＴＲ標的化試薬は、ヒトＴＴＲ遺伝子、ヒトＴＴＲ　ｍＲＮＡ、またはヒトＴＴＲタンパク質を標的化する任意の試薬であり得る。ヒトＴＴＲ標的化試薬は、ヒトＴＴＲ遺伝子、ヒトＴＴＲ　ｍＲＮＡ、またはヒトＴＴＲタンパク質の任意の領域を標的とすることができる（すなわち、ベータスリップ変異を含む領域だけでなく、他の任意の領域も同様に）。例えば、それはヒトＴＴＲ遺伝子内の標的配列を切断するヌクレアーゼ剤などのゲノム編集試薬であり得、それはヒトＴＴＲ　ｍＲＮＡを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得、それはヒトＴＴＲタンパク質のエピトープを標的とする抗原結合タンパク質であり得、またはそれはヒトＴＴＲを標的とする小分子であり得る。本明細書に開示される方法におけるヒトＴＴＲ標的化試薬は、既知のヒトＴＴＲ標的化試薬であり得るか、推定上のＴＴＲ標的化試薬（例えば、ヒトＴＴＲを標的化するように設計された候補試薬）であり得るか、またはヒトＴＴＲ標的化活性についてスクリーニングされている試薬であり得る。

【０１５３】

（１）ヒトＴＴＲ遺伝子を標的とするヌクレアーゼ剤

ヒトＴＴＲ標的化試薬は、ヒトＴＴＲ遺伝子内の標的配列を切断するヌクレアーゼ剤などのゲノム編集試薬であり得る。ヌクレアーゼ標的配列は、ヌクレアーゼ剤によってニックまたは二本鎖切断が誘導されるＤＮＡ配列を含む。ヌクレアーゼ剤の標的配列は、細胞に対して内因性（または天然）であり得るか、または標的配列は、細胞に対して外因性であり得る。細胞にとって外因性である標的配列は、細胞のゲノム内で天然に存在しない。標的配列はまた、標的遺伝子座に配置されることを望む目的のポリヌクレオチドに対して外因性であり得る。場合によっては、標的配列は宿主細胞のゲノムに一度だけ存在する。

【０１５４】

標的配列の長さは変動してもよく、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）対の場合は約３０～３６ｂｐ（すなわち、各ＺＦＮについて約１５～１８ｂｐ）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）の場合は約３６ｂｐ、またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ガイドＲＮＡの場合は約２０ｂｐの標的配列を含む。

【０１５５】

所望の標的配列においてニックまたは二本鎖切断を誘導する任意のヌクレアーゼ剤を、本明細書に開示される方法および組成物で使用することができる。ヌクレアーゼ剤が所望の標的配列においてニックまたは二本鎖切断を誘導する限り、天然に存在するまたは天然のヌクレアーゼ剤を使用することができる。あるいは、改変または操作されたヌクレアーゼ剤を使用することができる。「操作されたヌクレアーゼ剤」は、その天然の形態から操作された（改変または誘導された）ヌクレアーゼを含み、所望の標的配列においてニックまたは二本鎖切断を特異的に認識および誘導する。したがって、操作されたヌクレアーゼ剤は、天然の天然に存在するヌクレアーゼ剤から誘導することができ、または人工的に作

成または合成することができる。操作されたヌクレアーゼは、例えば、標的配列においてニックまたは二本鎖切断を誘導することができ、標的配列は、天然の（非操作または非修飾）ヌクレアーゼ剤によって認識されたであろう配列ではない。ヌクレアーゼ剤の改変は、タンパク質切断剤中のわずか１アミノ酸または核酸切断剤中の１ヌクレオチドであってもよい。標的配列または他のＤＮＡにニックまたは二本鎖切断を生じさせることは、本明細書では、標的配列または他のＤＮＡを「切断する（ｃｕｔｔｉｎｇ）」または「切断する（ｃｌｅａｖｉｎｇ）」と呼ぶことができる。

【０１５６】

例示された標的配列の活性バリアントおよび断片も提供される。そのような活性変異体は、所与の標的配列に対して少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％以上の配列同一性を含むことができ、活性変異体は生物学的活性を保持し、したがって配列特異的様式でヌクレアーゼ剤によって認識および切断され得る。ヌクレアーゼ剤による標的配列の二本鎖切断を測定するためのアッセイは公知である。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＦｒｅｎｄｅｗｅｙ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ４７６：２９５－３０７を参照されたい。

【０１５７】

ヌクレアーゼ剤の標的配列は、Ｔｔｒ遺伝子座の中または近くのどこであってもよい。標的配列は、Ｔｔｒ遺伝子のコード領域内、または遺伝子の発現に影響を及ぼす調節領域内に位置してもよい。ヌクレアーゼ剤の標的配列は、イントロン、エキソン、プロモーター、エンハンサー、調節領域、または任意の非タンパク質コード領域に位置してもよい。

【０１５８】

ヌクレアーゼ剤の１つの種類は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）である。ＴＡＬエフェクターヌクレアーゼは、原核生物または真核生物のゲノム内の特定の標的配列で二本鎖切断を行うために使用できる配列特異的ヌクレアーゼのクラスである。ＴＡＬエフェクターヌクレアーゼは、天然または操作された転写活性化因子様（ＴＡＬ）エフェクター、またはその機能的部分を、例えば、ＦｏｋＩなどのエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合することによって作成される。独自のモジュラーＴＡＬエフェクターＤＮＡ結合ドメインにより、特定のＤＮＡ認識特異性を備えたタンパク質の設計が可能になる。したがって、ＴＡＬエフェクターヌクレアーゼのＤＮＡ結合ドメインは、特定のＤＮＡ標的部位を認識するように操作することができ、したがって、所望の標的配列で二本鎖切断を行うために使用することができる。ＷＯ２０１０／０７９４３０、Ｍｏｒｂｉｔｚｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１０）ＰＮＡＳ １０．１０７３／ｐｎａｓ．１０１３１３３１０７、Ｓｃｈｏｌｚｅ ＆ Ｂｏｃｈ（２０１０）Ｖｉｒｕｌｅｎｃｅ １：４２８－４３２、Ｃｈｒｉｓｔｉａｎ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（２０１０）１８６：７５７－７６１、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（２０１０）ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｑ７０４、およびＭｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２９：１４３－１４８を参照されたく、これらのうちのそれぞれが、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１５９】

適切なＴＡＬヌクレアーゼの例、および適切なＴＡＬヌクレアーゼを調製するための方法は、例えば、これらのうちのそれぞれがその全体が参照により本明細書に組み込まれる、ＵＳ２０１１／０２３９３１５Ａ１、ＵＳ２０１１／０２６９２３４Ａ１、ＵＳ２０１１／０１４５９４０Ａ１、ＵＳ２００３／０２３２４１０Ａ１、ＵＳ２００５／０２０８４８９Ａ１、ＵＳ２００５／００２６１５７Ａ１、ＵＳ２００５／００６４４７４Ａ１、ＵＳ２００６／０１８８９８７Ａ１、およびＵＳ２００６／００６３２３１Ａ１に開示されている。様々な実施形態では、例えば、目的の遺伝子座または目的のゲノム遺伝子座において標的核酸配列内またはその近くを切断するＴＡＬエフェクターヌクレアーゼが操作され、ここで、標的核酸配列は、ターゲティングベクターによって改変される配列または

その近くにある。本明細書で提供される様々な方法および組成物での使用に適したＴＡＬヌクレアーゼには、本明細書に記載の標的ベクターによって改変される標的核酸配列またはその近くに結合するように特別に設計されたものが含まれる。

【０１６０】

一部のＴＡＬＥＮでは、ＴＡＬＥＮの各モノマーは、２つの超可変残基を介して単一の塩基対を認識する３３～３５のＴＡＬリピートを含む。一部のＴＡＬＥＮでは、ヌクレアーゼ剤は、ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼなどの独立したヌクレアーゼに作動可能に連結されたＴＡＬリピートベースのＤＮＡ結合ドメインを含むキメラタンパク質である。例えば、ヌクレアーゼ剤は、第１のＴＡＬリピートベースのＤＮＡ結合ドメインおよび第２のＴＡＬリピートベースのＤＮＡ結合ドメインを含むことができ、第１および第２のＴＡＬリピートベースのＤＮＡ結合ドメインのそれぞれは、ＦｏｋＩヌクレアーゼに作動可能に連結され、第１および第２のＴＡＬリピートベースのＤＮＡ結合ドメインは、様々な長さ（１２～２０ｂｐ）のスペーサー配列によって分離された標的ＤＮＡ配列の各鎖における２つの隣接する標的ＤＮＡ配列を認識し、ＦｏｋＩヌクレアーゼサブユニットは二量体化して、標的配列で二本鎖切断を行う活性ヌクレアーゼを作成する。

【０１６１】

本明細書に開示される様々な方法および組成物で使用されるヌクレアーゼ剤は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）をさらに含むことができる。一部のＺＦＮでは、ＺＦＮの各モノマーは３つ以上のジンクフィンガーベースのＤＮＡ結合ドメインを含み、各ジンクフィンガーベースのＤＮＡ結合ドメインは３ｂｐのサブサイトに結合する。他のＺＦＮでは、ＺＦＮは、ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼなどの独立したヌクレアーゼに作動可能に連結されたジンクフィンガーベースのＤＮＡ結合ドメインを含むキメラタンパク質である。例えば、ヌクレアーゼ剤は、第１のＺＦＮおよび第２のＺＦＮを含むことができ、第１および第２のＺＦＮのそれぞれは、ＦｏｋＩヌクレアーゼサブユニットに作動可能に連結され、第１および第２のＺＦＮは、約５～７ｂｐのスペーサーで分離された標的ＤＮＡ配列の各鎖における２つの隣接する標的ＤＮＡ配列を認識し、ＦｏｋＩヌクレアーゼサブユニットは二量体化して、二本鎖切断を行う活性ヌクレアーゼを生成する。例えば、これらのうちのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる、ＵＳ２００６／０２４６５６７、ＵＳ２００８／０１８２３３２、ＵＳ２００２／００８１６１４、ＵＳ２００３／００２１７７６、ＷＯ／２００２／０５７３０８Ａ２、ＵＳ２０１３／０１２３４８４、ＵＳ２０１０／０２９１０４８、ＷＯ／２０１１／０１７２９３Ａ２、およびＧａｊ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３１（７）：３９７－４０５を参照されたい。

【０１６２】

別のタイプのヌクレアーゼ剤はメガヌクレアーゼである。メガヌクレアーゼは、保存された配列モチーフに基づいて４つのファミリーに分類されており、ファミリーはＬＡＧＬＩＤＡＤＧ、ＧＩＹ－ＹＩＧ、Ｈ－Ｎ－Ｈ、およびＨｉｓ－Ｃｙｓボックスファミリーである。これらのモチーフは、金属イオンの配位とホスホジエステル結合の加水分解に関与する。メガヌクレアーゼは、それらの長い標的配列、およびそれらのＤＮＡ基質におけるいくつかの配列多型を許容することで注目に値する。メガヌクレアーゼドメインは、構造および機能は既知であり、例えば、Ｇｕｈａｎ ａｎｄ Ｍｕｎｉｙａｐｐａ（２００３）Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３８：１９９－２４８、Ｌｕｃａｓ ｅｔ ａｌ．，（２００１）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２９：９６０－９、Ｊｕｒｉｃａ ａｎｄ Ｓｔｏｄｄａｒｄ，（１９９９）Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ ５５：１３０４－２６、Ｓｔｏｄｄａｒｄ，（２００６）Ｑ Ｒｅｖ Ｂｉｏｐｈｙｓ ３８：４９－９５、およびＭｏｕｒｅ ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｎａｔ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｌ ９：７６４を参照されたい。いくつかの例では、天然に存在する変異体および／または操作された誘導体メガヌクレアーゼが使用される。動態、補因子相互作用、発現、最適条件、および／または標的配列特異性を改変するための方法、および活性のスクリーニングは公知である。例えば、これらのうちのそれぞれは、その全体が参照により本明

細書に組み込まれる、Ｅｐｉｎａｔ ｅｔ ａｌ．，（２００３）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３１：２９５２－６２、Ｃｈｅｖａｌｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ １０：８９５－９０５、Ｇｉｍｂｌｅ ｅｔ ａｌ．，（２００３）Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３３４：９９３－１００８、Ｓｅｌｉｇｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３０：３８７０－９、Ｓｕｓｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（２００４）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３４２：３１－４１、Ｒｏｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，（２００６）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３４：４７９１－８００、Ｃｈａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，（２００５）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３３：ｅ１７８、Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，（２００６）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３４：ｅ１４９、Ｇｒｕｅｎ ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３０：ｅ２９、Ｃｈｅｎ ａｎｄ Ｚｈａｏ，（２００５）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３３：ｅ１５４、ＷＯ２００５／１０５９８９、ＷＯ２００３／０７８６１９、ＷＯ２００６／０９７８５４、ＷＯ２００６／０９７８５３、ＷＯ２００６／０９７７８４、およびＷＯ２００４／０３１３４６を参照されたい。

【０１６３】

例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＳｃｅＶ、Ｉ－ＳｃｅＶＩ、Ｉ－ＳｃｅＶＩＩ、Ｉ－ＣｅｕＩ、Ｉ－ＣｅｕＡＩＩＰ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＰ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＩＰ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＩＩＰ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＶＰ、Ｉ－ＴｌｉＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ、Ｆ－ＳｃｅＩ、Ｆ－ＳｃｅＩＩ、Ｆ－ＳｕｖＩ、Ｆ－ＴｅｖＩ、Ｆ－ＴｅｖＩＩ、Ｉ－ＡｍａＩ、Ｉ－ＡｎｉＩ、Ｉ－ＣｈｕＩ、Ｉ－ＣｍｏｅＩ、Ｉ－ＣｐａＩ、Ｉ－ＣｐａＩＩ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＣｖｕＩ、Ｉ－ＣｖｕＡＩＰ、Ｉ－ＤｄｉＩ、Ｉ－ＤｄｉＩＩ、Ｉ－ＤｉｒＩ、Ｉ－ＤｍｏＩ、Ｉ－ＨｍｕＩ、Ｉ－ＨｍｕＩＩ、Ｉ－ＨｓＮＩＰ、Ｉ－ＬｌａＩ、Ｉ－ＭｓｏＩ、Ｉ－ＮａａＩ、Ｉ－ＮａｎＩ、Ｉ－ＮｃＩＩＰ、Ｉ－ＮｇｒＩＰ、Ｉ－ＮｉｔＩ、Ｉ－ＮｊａＩ、Ｉ－Ｎｓｐ２３６ＩＰ、Ｉ－ＰａｋＩ、Ｉ－ＰｂｏＩＰ、Ｉ－ＰｃｕＩＰ、Ｉ－ＰｃｕＡＩ、Ｉ－ＰｃｕＶＩ、Ｉ－ＰｇｒＩＰ、Ｉ－ＰｏｂＩＰ、Ｉ－ＰｏｒＩ、Ｉ－ＰｏｒＩＩＰ、Ｉ－ＰｂｐＩＰ、Ｉ－ＳｐＢｅｔａＩＰ、Ｉ－ＳｃａＩ、Ｉ－ＳｅｘＩＰ、Ｉ－ＳｎｅＩＰ、Ｉ－ＳｐｏｍＩ、Ｉ－ＳｐｏｍＣＰ、Ｉ－ＳｐｏｍＩＰ、Ｉ－ＳｐｏｍＩＩＰ、Ｉ－ＳｑｕＩＰ、Ｉ－Ｓｓｐ６８０３Ｉ、Ｉ－ＳｔｈＰｈｉＪＰ、Ｉ－ＳｔｈＰｈｉＳＴ３Ｐ、Ｉ－ＳｔｈＰｈｉＳＴｅ３ｂＰ、Ｉ－ＴｄｅＩＰ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩＩ、Ｉ－ＵａｒＡＰ、Ｉ－ＵａｒＨＧＰＡＩＰ、Ｉ－ＵａｒＨＧＰＡ１３Ｐ、Ｉ－ＶｉｎＩＰ、Ｉ－ＺｂｉＩＰ、ＰＩ－ＭｔｕＩ、ＰＩ－ＭｔｕＨＩＰ、ＰＩ－ＭｔｕＨＩＩＰ、ＰＩ－ＰｆｕＩ、ＰＩ－ＰｆｕＩＩ、ＰＩ－ＰｋｏＩ、ＰＩ－ＰｋｏＩＩ、ＰＩ－Ｒｍａ４３８１２ＩＰ、ＰＩ－ＳｐＢｅｔａＩＰ、ＰＩ－ＳｃｅＩ、ＰＩ－ＴｆｕＩ、ＰＩ－ＴｆｕＩＩ、ＰＩ－ＴｈｙＩ、ＰＩ－ＴｌｉＩ、ＰＩ－ＴｌｉＩＩ、またはそれらのアクティブな変異体またはフラグメントを含む、任意のメガヌクレアーゼを使用することができる。

【０１６４】

メガヌクレアーゼは、例えば、１２～４０塩基対の二本鎖ＤＮＡ配列を認識することができる。場合によっては、メガヌクレアーゼは、ゲノム内の完全に一致する１つの標的配列を認識する。

【０１６５】

一部のメガヌクレアーゼは、ホーミングヌクレアーゼである。ホーミングヌクレアーゼの１つのタイプは、例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＣｒｅＩ、およびＩ－Ｄｍｏｌを含むホーミングヌクレアーゼのＬＡＧＬＩＤＡＤＧファミリーである。

【０１６６】

ヌクレアーゼ剤は、以下により詳細に記載されるように、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムをさらに含むことができる。

【０１６７】

ヌクレアーゼ剤（すなわち、操作されたヌクレアーゼ剤）の活性バリアントおよび断片

も提供される。そのような活性バリアントは、天然のヌクレアーゼ剤に対して、少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上の配列同一性を有していてもよく、活性バリアントは、所望の標的配列で切断する能力を保持し、したがって、ニックまたは二本鎖切断誘導活性を保持する。例えば、本明細書に記載のヌクレアーゼ剤のいずれも、天然エンドヌクレアーゼ配列から改変し、天然ヌクレアーゼ剤によって認識されなかった標的配列でニックまたは二本鎖切断を認識および誘導するように設計してもよい。したがって、いくつかの操作されたヌクレアーゼは、対応する天然のヌクレアーゼ剤標的配列とは異なる標的配列でニックまたは二本鎖切断を誘導する特異性を有する。ニックまたは二本鎖切断誘導活性のためのアッセイは知られており、一般に、標的配列を含むＤＮＡ基質上のエンドヌクレアーゼの全体的な活性および特異性を測定する。

【０１６８】

ヌクレアーゼ剤は、任意の既知の手段によって細胞または非ヒト動物に導入することができる。ヌクレアーゼ剤をコードするポリペプチドは、細胞または非ヒト動物に直接導入してもよい。代替的に、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドを細胞または非ヒト動物に導入してもよい。ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドが導入されると、ヌクレアーゼ剤は、一時的、条件付き、または構成的に細胞内で発現され得る。ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは、発現カセットに含まれ得、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターに作動可能に連結され得る。プロモーターの例は、本明細書の他の場所でさらに詳細に論じられている。代替的に、ヌクレアーゼ剤は、ヌクレアーゼ剤をコードするｍＲＮＡとして細胞に導入され得る。

【０１６９】

ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは、細胞のゲノムに安定して組み込まれ、細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結され得る。あるいは、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは、標的化ベクター内にあり得る。

【０１７０】

ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドの導入によりヌクレアーゼ剤が細胞に提供される場合、ヌクレアーゼ剤をコードするそのようなポリヌクレオチドは、天然に存在するヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチド配列と比較して、目的の細胞においてより高い使用頻度を有するコドンを置換するように改変され得る。例えば、ヌクレアーゼ剤をコードするポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、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、または任意の他の目的の宿主細胞を含む、目的の所与の真核細胞においてより頻度高く使用される代替コドンへと改変することができる。

【０１７１】

（２）ヒトＴＴＲ遺伝子を標的とするＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム

特定のタイプのヒトＴＴＲ標的化試薬は、ヒトＴＴＲ遺伝子を標的化するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムであってよい。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系には、Ｃａｓ遺伝子の発現に関与する、またはその活性を指示する転写産物および他のエレメントが含まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、例えば、タイプＩ、タイプＩＩ、タイプＩＩＩ、またはタイプＶシステム（例えば、サブタイプＶ－ＡまたはサブタイプＶ－Ｂ）であり得る。本明細書に開示される組成物および方法で使用されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、非天然発生型であり得る。「非天然発生型」系には、自然発生状態から改変もしくは変異されているか、それらが本質的に自然に関連付けられている少なくとも１つの他の構成要素から少なくとも実質的に自由であるか、またはそれらが自然に関連付けられていない少なくとも１つの他の構成要素に関連付けられている、系の１つ以上の構成要素など、人間の助けの関与を示すものが含まれる。例えば、一部のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、天然に発生しないｇＲＮＡおよびＣａｓタンパク質を一緒に含む非天然発生型ＣＲＩＳＰＲ複合体を用いるか、天然に発生しないＣａｓタンパク質を用いるか、または天然に発生しないｇＲＮＡを用い

る。
【０１７２】
　ＣａｓタンパクおよびキメラＣａｓタンパク質をコードするポリヌクレオチド。Ｃａｓタンパク質は一般に、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ、以下でより詳細に説明される）と相互作用できる少なくとも１つのＲＮＡ認識または結合ドメインを含む。Ｃａｓタンパク質はまた、ヌクレアーゼドメイン（例えば、ＤＮａｓｅドメインまたはＲＮａｓｅドメイン）、ＤＮＡ結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質－タンパク質相互作用ドメイン、二量体化ドメイン、および他のドメインを含み得る。いくつかのそのようなドメイン（例えば、ＤＮアーゼドメイン）は、天然のＣａｓタンパク質に由来してもよい。他のそのようなドメインを追加して、修飾されたＣａｓタンパク質を作製することができる。ヌクレアーゼドメインは、核酸分子の共有結合の切断を含む、核酸切断に対する触媒活性を有する。切断は、平滑末端または千鳥状の末端を生成することができ、それは一本鎖または二本鎖であり得る。例えば、野生型のＣａｓ９タンパク質は、通常、平滑端切断産物を生成する。あるいは、野生型Ｃｐｆ１タンパク質（例、ＦｎＣｐｆ１）は、５ヌクレオチドの５’オーバーハングを含む切断産物をもたらすことができ、切断は、非標的化鎖のＰＡＭ配列から１８番目の塩基対の後および標的化鎖の２３番目の塩基後に発生する。Ｃａｓタンパク質は、完全な切断活性を有し、標的ゲノム遺伝子座で二本鎖切断を作成することができるか（例えば、平滑末端を含む二本鎖切断）、またはそれは標的ゲノム遺伝子座で一本鎖切断を作成するニッカーゼであり得る。
【０１７３】
　Ｃａｓタンパク質の例には、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ５ｅ（ＣａｓＤ）、Ｃａｓ６、Ｃａｓ６ｅ、Ｃａｓ６ｆ、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８ａ１、Ｃａｓ８ａ２、Ｃａｓ８ｂ、Ｃａｓ８ｃ、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１またはＣｓｘ１２）、Ｃａｓ１０、Ｃａｓ１０ｄ、ＣａｓＦ、ＣａｓＧ、ＣａｓＨ、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１（ＣａｓＡ）、Ｃｓｅ２（ＣａｓＢ）、Ｃｓｅ３（ＣａｓＥ）、Ｃｓｅ４（ＣａｓＣ）、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、およびＣｕ１９６６、ならびにそれらの相同体または修飾バージョンが挙げられる。
【０１７４】
　例示的なＣａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質またはＣａｓ９タンパク質に由来するタンパク質である。Ｃａｓ９タンパク質は、タイプＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に由来するものであり、典型的には、保存されたアーキテクチャを有する４つの重要なモチーフを共有する。モチーフ１、２、および４は、ＲｕｖＣ様モチーフであり、モチーフ３は、ＨＮＨモチーフである。例示的なＣａｓ９タンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ 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、Ｋｔｅｄｏｎｏｂａｃｔｅｒ ｒａｃｅｍｉｆｅｒ、Ｍｅｔｈａｎｏｈａｌｏｂｉｕｍ ｅｖｅｓｔｉｇａｔｕｍ、Ａｎａｂａｅｎａ ｖａｒｉａｂｉｌｉｓ、Ｎｏｄｕｌａｒｉａ ｓｐｕｍｉｇｅｎａ、Ｎｏｓｔｏｃ ｓｐ．、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｍａｘｉｍａ、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｐｌａｔｅｎｓｉｓ、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｓｐ．、Ｌｙｎｇｂｙａ ｓｐ．、Ｍｉｃｒｏｃｏｌｅｕｓ ｃｈｔｈｏｎｏｐｌａｓｔｅｓ、Ｏｓｃｉｌｌａｔｏｒｉａ ｓｐ．、Ｐｅｔｒｏｔｏｇａ ｍｏｂｉｌｉｓ、Ｔｈｅｒｍｏｓｉｐｈｏ ａｆｒｉｃａｎｕｓ、Ａｃａｒｙｏｃｈｌｏｒｉｓ ｍａｒｉｎａ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、またはＣａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉに由来する。Ｃａｓ９ファミリーメンバーの追加の例は、ＷＯ２０１４／１３１８３３に記載されており、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ（ＳｐＣａｓ９）由来のＣａｓ９（ＳｗｉｓｓＰｒｏｔアクセッション番号Ｑ９９ＺＷ２が割り当てられている）は、例示的なＣａｓ９タンパク質である。Ｓ．ａｕｒｅｕｓ（ＳａＣａｓ９）由来のＣａｓ９（ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｊ７ＲＵＡ５が割り当てられている）は、別の例示的なＣａｓ９タンパク質である。Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ（ＣｊＣａｓ９）由来のＣａｓ９（ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｑ０Ｐ８９７が割り当てられている）は、別の例示的なＣａｓ９タンパク質である。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｎａｔ．Ｃｏｍｍ．８：１４５００を参照されたい。ＳａＣａｓ９は、ＳｐＣａｓ９よりも小さく、ＣｊＣａｓ９は、ＳａＣａｓ９およびＳｐＣａｓ９の両方よりも小さい。

【０１７５】

Ｃａｓタンパク質の別の例は、Ｃｐｆ１（ＰｒｅｖｏｔｅｌｌａおよびＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ １のＣＲＩＳＰＲ）タンパク質である。Ｃｐｆ１は、Ｃａｓ９の対応するドメインに相同なＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインを、Ｃａｓ９の特徴的なアルギニンに富むクラスターの対応物とともに含む大きなタンパク質（約１３００アミノ酸）である。しかしながら、Ｃｐｆ１は、Ｃａｓ９タンパク質に存在するＨＮＨヌクレアーゼドメインを欠いており、ＨＮＨドメインを含む長い挿入を含むＣａｓ９とは対照的に、ＲｕｖＣ様ドメインは、Ｃｐｆ１配列において隣接している。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ １６３（３）：７５９－７７１を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。例示的なＣｐｆ１タンパク質は、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ １、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｎｏｖｉｃｉｄａ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｌｂｅｎｓｉｓ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＣ２０１７ １、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３３＿１０、Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＧＷ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７、Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ ｓｐ．ＳＣＡＤＣ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ ｔｅｒｍｉｔｕｍ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｅｌｉｇｅｎｓ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ ｉｎａｄａｉ、Ｌａｃｈ

ｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ ３、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｄｉｓｉｅｎｓ、およびＰｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｍａｃａｃａｅに由来する。Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｕ１１２由来のＣｐｆ１（ＦｎＣｐｆ１；ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ａ０Ｑ７Ｑ２が割り当てられている）は、例示的なＣｐｆ１タンパク質である。

【０１７６】

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

【０１７７】

Ｃａｓタンパク質は、核酸結合親和性、核酸結合特異性、および酵素活性のうちの１つ以上を増加または減少させるように修飾され得る。Ｃａｓタンパク質はまた、安定性など、タンパク質の他の活性や特性を変更するように改変することができる。例えば、Ｃａｓタンパク質の１つまたは複数のヌクレアーゼドメインを改変、欠失、または不活性化することができ、あるいはＣａｓタンパク質を切断して、タンパク質の機能に必須ではないドメインを除去するか、あるいはＣａｓタンパク質の活性または特性を最適化（例えば、増強または低減）することができる。

【０１７８】

修飾Ｃａｓタンパク質の一例は、修飾ＳｐＣａｓ９－ＨＦ１タンパク質であり、これは、非特異的ＤＮＡ接触を低減するように設計された改変を内包するＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９の忠実度の高いバリアント（Ｎ４９７Ａ／Ｒ６６１Ａ／Ｑ６９５Ａ／Ｑ９２６Ａ）である。例えば、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｎａｔｕｒｅ ５２９（７５８７）：４９０－４９５を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。修飾Ｃａｓタンパク質の別の例は、オフターゲット効果を低減するように設計された修飾ｅＳｐＣａｓ９バリアント（Ｋ８４８Ａ／Ｋ１００３Ａ／Ｒ１０６０Ａ）である。例えば、Ｓｌａｙｍａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３５１（６２６８）：８４－８８を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。他のＳｐＣａｓ９バリアントには、Ｋ８５５ＡおよびＫ８１０Ａ／Ｋ１００３Ａ／Ｒ１０６０Ａが含まれる。

【０１７９】

Ｃａｓタンパク質は、ＤＮａｓｅドメインなどの少なくとも１つのヌクレアーゼドメインを含み得る。例えば、野生型Ｃｐｆ１タンパク質は、一般に、おそらく二量体立体配座で、標的ＤＮＡの両方の鎖を切断するＲｕｖＣ様ドメインを含む。Ｃａｓタンパク質はまた、ＤＮａｓｅドメインなどの少なくとも２つのヌクレアーゼドメインを含み得る。例えば、野生型Ｃａｓ９タンパク質は、一般に、ＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインおよびＨＮＨ様ヌクレアーゼドメインを含む。ＲｕｖＣドメインおよびＨＮＨドメインは各々、二本鎖ＤＮＡの異なる鎖を切断して、ＤＮＡに二本鎖切断を行うことができる。例えば、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３７：８１６－８２１を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１８０】

ヌクレアーゼドメインの１つ以上またはすべてを欠失または変異させることで、それらがもはや機能しなくさせたり、ヌクレアーゼ活性が低下させたりすることができる。例え

ば、Ｃａｓ９タンパク質でヌクレアーゼドメインの１つが欠失または変異している場合、結果として得られるＣａｓ９タンパク質はニッカーゼと呼ばれ、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、相補鎖または非相補鎖を切断できるが、両方を切断することはできない）。ヌクレアーゼドメインの両方が削除または変異された場合、得られたＣａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９）は、二本鎖ＤＮＡの両方の鎖（例えば、ヌクレアーゼヌルまたはヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質、または触媒活性を伴わないＣａｓタンパク質（ｄＣａｓ））を切断する能力が低減される。Ｃａｓ９をニッカーゼに変換する変異の例は、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９のＲｕｖＣドメインにおけるＤ１０Ａ（Ｃａｓ９の１０位でのアスパラギン酸塩からアラニンへ）変異である。同様に、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９のＨＮＨドメインにあるＨ９３９Ａ（アミノ酸８３９位でのヒスチジンからアラニンへ）、Ｈ８４０Ａ（アミノ酸８４０位でのヒスチジンからアラニンへ）、またはＮ８６３Ａ（アミノ酸Ｎ８６３位でのアスパラギンからアラニンへ）は、Ｃａｓ９をニッカーゼに変換し得る。Ｃａｓ９をニッカーゼに変換する変異の他の例には、Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ由来のＣａｓ９への対応する変異が挙げられる。例えば、Ｓａｐｒａｎａｕｓｋａｓ ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ３９）：９２７５－９２８２およびＷＯ２０１３／１４１６８０を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような変異は、部位特異的変異導入、ＰＣＲを介した変異導入、または全遺伝子合成などの方法を使用して生成され得る。ニッカーゼを生成する他の変異の例は、例えば、ＷＯ２０１３／１７６７７２およびＷＯ２０１３／１４２５７８において見出すことができ、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ヌクレアーゼドメインのすべてがＣａｓタンパク質で削除または変異された場合（例えば、ヌクレアーゼドメインの両方がＣａｓ９タンパク質で削除または変異された場合）、得られたＣａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９）は、二本鎖ＤＮＡの両方の鎖（例えば、ヌクレアーゼヌルまたはヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質）を切断する能力が低減される。１つの特定の例は、Ｄ１０Ａ／Ｈ８４０Ａ Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９二重変異体、またはＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９と最適にアラインされた場合の別の種からのＣａｓ９の対応する二重変異体である。別の特定の例は、Ｄ１０Ａ／Ｎ８６３Ａ Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９二重変異体、またはＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９と最適にアラインされた場合の別の種からのＣａｓ９の対応する二重変異体である。

【０１８１】

Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓのＣａｓ９タンパク質の触媒ドメインにおける不活性化変異の例も知られている。例えば、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓのＣａｓ９酵素（ＳａＣａｓ９）は、位置Ｎ５８０での置換（例えば、Ｎ５８０Ａ置換）および位置Ｄ１０での置換（例えば、Ｄ１０Ａ置換）を含み得、ヌクレアーゼ不活性Ｃａｓタンパク質をもたらす。例えば、ＷＯ２０１６／１０６２３６を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１８２】

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

を含み得る。例えば、ＵＳ２０１６／０２０８２４３を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１８３】

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タンパク質は切断ドメインまたはエピジェネティック修飾ドメインに融合させることができる。すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１４／０８９２９０を参照されたい。Ｃａｓタンパク質はまた、安定性の増加または減少を提供する異種ポリペプチドに融合され得る。融合ドメインまたは異種ポリペプチドは、Ｎ末端、Ｃ末端、またはＣａｓタンパク質の内部に位置し得る。

【０１８４】

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してもよい。そのような異種ポリペプチドには、例えば、核を標的とするための単節型（ｍｏｎｏｐａｒｔｉｔｅ）ＳＶ４０　ＮＬＳおよび／または双節型（ｂｉｐａｒｔｉｔｅ）アルファーインポーチンＮＬＳなどの１つ以上の核局在化シグナル（ＮＬＳ）、ミトコンドリアを標的とするためのミトコンドリア局在化シグナル、ＥＲ保持シグナルなどが含まれ得る。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｌａｎｇｅ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８２：５１０１－５１０５を参照されたい。そのような細胞内局在化シグナルは、Ｎ末端、Ｃ末端、またはＣａｓタンパク質内の任意の場所に位置し得る。ＮＬＳは、一続きの塩基性アミノ酸を含むことができ、単節型配列または双節型配列であり得る。任意選択で、Ｃａｓタンパク質は、Ｎ末端にＮＬＳ（例えば、アルファーインポーチンＮＬＳまたは単節型ＮＬＳ）およびＣ末端にＮＬＳ（例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳまたは双節型ＮＬＳ）を含む２つ以上のＮＬＳを含むことができる。Ｃａｓタンパク質はまた、Ｎ末端に２つ以上のＮＬＳおよび／またはＣ末端に２つ以上のＮＬＳを含み得る。

【０１８５】

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

【０１８６】

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

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

【０１８７】

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

【０１８８】

Ｃａｓタンパク質は任意の形態で提供してもよい。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してもよい。代替的に、Ｃａｓタンパク質は、ＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））またはＤＮＡなどの、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸の形態で提供してもよい。任意に、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞または生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化することができる。例えば、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、または任意の他の目的の宿主細胞においてより頻度高く使用される代替コドンへと改変することができる。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、一時的、条件付き、または構成的に細胞内で発現され得る。

【０１８９】
ｍＲＮＡとして提供されるＣａｓタンパク質は、安定性および／または免疫原性の特性を改善するために修飾することができる。修飾は、ｍＲＮＡ内の１つ以上のヌクレオシドに対して行われ得る。ｍＲＮＡ核酸塩基への化学修飾の例には、シュードウリジン、１－メチル－シュードウリジン、および５－メチル－シチジンが挙げられる。例えば、Ｎ１－メチルシュードウリジンを含むキャップされポリアデニル化されたＣａｓ ｍＲＮＡを使用することができる。同様に、Ｃａｓ ｍＲＮＡは、同義コドンを使用してウリジンを枯渇させることによって修飾され得る。
【０１９０】
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することができる。あるいは、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。発現コンストラクトは、遺伝子また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導入することができる任意の核酸コンストラクトを含む。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てもよい。代替的に、それは、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡを含むベクターとは別のベクターまたはプラスミドであってもよい。発現コンストラクトにおいて使用することができるプロモーターとしては、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、多能性細胞、胚性幹（ＥＳ）細胞、成体幹細胞、発生が制限された前駆細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、または１細胞期胚のうちの１つ以上において活性なプロモーターが挙げられる。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、または組織特異的プロモーターであってよい。任意選択で、プロモーターは、一方向のＣａｓタンパク質と他の方向のガイドＲＮＡの両方の発現を駆動する双方向プロモーターであってもよい。こ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）、およびＴＡＴＡボックスの３つの外部制御要素を含む完全な従来の一方向Ｐｏｌ ＩＩＩプロモーター、ならびに（２）ＤＳＥの５’末端に逆方向に融合されたＰＳＥおよびＴＡＴＡボックスを含む第２の基本的なＰｏｌ ＩＩＩプロモーターで構成してもよい。例えば、Ｈ１プロモーターでは、ＤＳＥはＰＳＥとＴＡＴＡボックスに隣接しており、プロモーターは、Ｕ６プロモーターに由来するＰＳＥおよびＴＡＴＡボックスを追加することによって逆方向の転写が制御されるハイブリッドプロモーターを作成することにより、双方向にすることができる。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＵＳ２０１６／００７４５３５を参照されたい。双方向プロモーターを使用してＣａｓタンパク質とガイドＲＮＡをコードする遺伝子を同時に発現させることにより、コンパクトな発現カセットを生成して送達を容易にすることができる。
【０１９１】
ガイドＲＮＡ「ガイドＲＮＡ」または「ｇＲＮＡ」は、Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ９タンパク質）に結合し、かつＣａｓタンパク質を標的ＤＮＡ内の特定の位置に標的化するＲＮＡ分子である。ガイドＲＮＡは、「ＤＮＡ標的化セグメント」および「タンパク質結合セグメント」の２つのセグメントを含み得る。「セグメント」は、ＲＮＡ中のヌクレオチドの連続したストレッチなどの、分子のセクションまたは領域を含む。Ｃａｓ９のものなど、いくつかのｇＲＮＡは、「アクチベーターＲＮＡ」（例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ）および「ターゲッターＲＮＡ」（例えば、ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡまたはｃｒＲＮＡ）の２つの別個のＲＮＡ分子を含み得る。他のｇＲＮＡは、単一ＲＮＡ分子（単一ＲＮＡポリヌクレオチド）であり、これはまた「単一分子ｇＲＮＡ」、「単一ガイドＲＮＡ」、または「ｓｇＲＮＡ」と呼ばれ得る。例えば、ＷＯ２０１３／１７６７７２、ＷＯ２０１４／０６５５９６、ＷＯ２０１４／０８９２９０、ＷＯ２０１４／０９３６２２、ＷＯ２０１４／０９９７５０、ＷＯ２０１３／１４２５７８、およびＷＯ２０１４／１３１８３３を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細

書に組み込まれる。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に融合したｃｒＲＮＡを含み得る。例えば、Ｃｐｆ１の場合、標的配列への結合を実現するために必要なのはｃｒＲＮＡだけである。「ガイドＲＮＡ」および「ｇＲＮＡ」という用語は、二重分子（すなわち、モジュラー）ｇＲＮＡおよび単一分子ｇＲＮＡの両方を含む。

【０１９２】

例示的な２分子ｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ様（「ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」または「ターゲッターＲＮＡ」または「ｃｒＲＮＡ」または「ｃｒＲＮＡリピート」）分子および対応するｔｒａｃｒＲＮＡ様（「トランス作用性ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ」または「アクチベーターＲＮＡ」または「ｔｒａｃｒＲＮＡ」）分子を含む。ｃｒＲＮＡは、ｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント（一本鎖）、およびｇＲＮＡのタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二重鎖の半分を形成するヌクレオチドのストレッチの両方を含む。ＤＮＡ標的化セグメントの下流（３’）に位置するｃｒＲＮＡテールの例は、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵ（配列番号８４）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。本明細書に開示されるＤＮＡ標的化セグメントのいずれも、配列番号８４の５’末端に結合して、ｃｒＲＮＡを形成することができる。

【０１９３】

対応するｔｒａｃｒＲＮＡ（アクチベーターＲＮＡ）は、ｇＲＮＡのタンパク質結合セグメントのｄｓＲＮＡ二重鎖の残りの半分を形成するヌクレオチドのストレッチを含む。ｃｒＲＮＡのヌクレオチドのストレッチは、ｔｒａｃｒＲＮＡのヌクレオチドのストレッチと相補的であり、それをハイブリダイズして、ｇＲＮＡのタンパク質結合ドメインのｄｓＲＮＡ二重鎖を形成する。したがって、各ｃｒＲＮＡは、対応するｔｒａｃｒＲＮＡを有すると言われ得る。ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の例は、ＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵ（配列番号８５）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【０１９４】

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

【０１９５】

所与のｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメント（ｃｒＲＮＡ）は、以下により詳細に記載されるように、標的ＤＮＡの相補鎖上の配列に相補的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化してもよく、ｇＲＮＡおよび標的ＤＮＡが相互作用する標的ＤＮＡ内の位置を決定する。目的のｇＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントは、標的ＤＮＡ内の任意の所望の配列にハイブリダイズするように修飾され得る。天然発生型ｃｒＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系および生物によって異なるが、２１～４６ヌクレオチドの長さの２つのダイレクトリピート（ＤＲ）が隣接する、２１～７２ヌクレオチド長の標的化セグメントを含むことが多い（例えば、ＷＯ２０１４／１３１８３３を参照されたく、すべて

の目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓの場合、ＤＲは３６ヌクレオチド長であり、標的化セグメントは３０ヌクレオチド長である。３’に位置するＤＲは、対応するｔｒａｃｒＲＮＡと相補的であり、それをハイブリダイズし、それは順にＣａｓタンパク質と結合する。

【０１９６】

ＤＮＡ標的化セグメントは、例えば、少なくとも約１２、１５、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、または４０ヌクレオチドの長さを有し得る。そのようなＤＮＡ標的化セグメントは、例えば、約１２～約１００、約１２～約８０、約１２～約５０、約１２～約４０、約１２～約３０、約１２～約２５、または約１２～約２０ヌクレオチドの長さを有し得る。例えば、ＤＮＡ標的化セグメントは、約１５～約２５ヌクレオチド（例えば、約１７～約２０ヌクレオチド、または約１７、１８、１９、もしくは２０ヌクレオチド）であり得る。例えば、ＵＳ２０１６／００２４５２３を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９の場合、典型的なＤＮＡ標的化セグメントは、１６～２０ヌクレオチド長、または１７～２０ヌクレオチド長である。Ｓ．ａｕｒｅｕｓ由来のＣａｓ９の場合、典型的なＤＮＡ標的化セグメントは、２１～２３ヌクレオチド長である。Ｃｐｆ１の場合、典型的なＤＮＡ標的化セグメントは、少なくとも１６ヌクレオチド長または少なくとも１８ヌクレオチド長さである。

【０１９７】

ＴｒａｃｒＲＮＡは、任意の形態（例えば、完全長ｔｒａｃｒＲＮＡまたは活性な部分ｔｒａｃｒＲＮＡ）、および様々な長さであり得る。それらには、一次転写物または処理された形態が含まれ得る。例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡ（単一ガイドＲＮＡの一部として、または２分子ｇＲＮＡの一部としての別個の分子として）は、野生型ｔｒａｃｒＲＮＡ配列（例えば、野生型ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の約２０、２６、３２、４５、４８、５４、６３、６７、８５、またはそれ以上のヌクレオチド）のすべてまたは一部を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり得る。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来の野生型ｔｒａｃｒＲＮＡ配列の例には、１７１ヌクレオチド、８９ヌクレオチド、７５ヌクレオチド、および６５ヌクレオチドのバージョンが挙げられる。例えば、Ｄｅｌｔｃｈｅｖａ ｅｔａｌ．（２０１１）Ｎａｔｕｒｅ ４７１：６０２－６０７、ＷＯ２０１４／０９３６６１を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）内のｔｒａｃｒＲＮＡの例には、ｓｇＲＮＡの＋４８、＋５４、＋６７、および＋８５のバージョン内に見出されるｔｒａｃｒＲＮＡセグメントが挙げられ、「＋ｎ」は、野生型ｔｒａｃｒＲＮＡの最大＋ｎヌクレオチドがｓｇＲＮＡに含まれることを示す。ＵＳ８，６９７，３５９を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１９８】

ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補鎖との間の相補性パーセントは、少なくとも６０％（例えば、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％）であり得る。ＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補鎖との間の相補性パーセントは、約２０個の連続するヌクレオチドにわたって少なくとも６０％であり得る。一例として、ＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補鎖との間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補鎖の５’末端にある１４個の連続するヌクレオチドにわたって１００％であり得、残りの部分にわたって０％まで低くなり得る。そのような場合、ＤＮＡ標的化セグメントは、１４ヌクレオチド長であるとみなされ得る。別の例として、ＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補鎖との間の相補性パーセントは、標的ＤＮＡの相補鎖の５’末端にある７個の連続するヌクレオチドにわたって１００％であり得、残りの部分にわたって０％まで低くなり得る。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ヌクレオ

チドは、標的ＤＮＡの相補鎖に相補的である。例えば、ＤＮＡ標的化セグメントは２０ヌクレオチド長であり得、標的ＤＮＡの相補鎖との１、２、または３個のミスマッチを含み得る。一例では、ミスマッチは、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列に対応する相補鎖（すなわち、ＰＡＭ配列の逆相補体）の領域に隣接していない（例えば、ミスマッチは、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントの５’末端にあるか、またはミスマッチは、ＰＡＭ配列に対応する相補鎖の領域から、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、もしくは１９塩基対離れている）。

【０１９９】

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

【０２００】

単一ガイドＲＮＡは、ＤＮＡ標的化セグメントおよび足場配列（すなわち、ガイドＲＮＡのタンパク質結合またはＣａｓ結合配列）を含み得る。例えば、このようなガイド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てもよい。例示的な足場配列は、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵ（バージョン１；配列番号８６）、ＧＵＵＧＧＡＡＣＣＡＵＵＣＡＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン２；配列番号８７）、ＧＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン３；配列番号８８）、およびＧＵＵＵＡＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＧＡＡＡＣＡＧＣＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＵＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（バージョン４；配列番号８９）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。本明細書に開示されるガイドＲＮＡ標的配列のうちのいずれかを標的化するガイドＲＮＡは、例えば、ガイドＲＮＡの３’末端の例示的なガイドＲＮＡ足場配列のうちのいずれかに融合したガイドＲＮＡの５’末端のＤＮＡ標的化セグメントを含み得る。すなわち、本明細書に開示されるＤＮＡ標的化セグメントのうちのいずれかは、上記の足場配列のうちのいずれか１つの５’末端に結合して、単一ガイドＲＮＡ（キメラガイドＲＮＡ）を形成することができる。

【０２０１】

ガイドＲＮＡは、追加の望ましい特徴（例えば、修飾または調節された安定性；細胞内標的化；蛍光標識による追跡；タンパク質またはタンパク質複合体の結合部位など）を提供する修飾または配列を含み得る。そのような改変の例としては、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、タンパク質および／またはタンパク質複合体による安定性の調節および／または接近性の調節を可能にする）、安定性制御配列、ｄｓＲＮＡ二重鎖を形成する配列（すなわち、ヘアピン）、ＲＮＡを細胞内の位置（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体など）に標的化する改変または配列、追跡を提供する改変または配列（例えば、蛍光分子への直接コンジュゲーション、蛍光検出を容易にする部分へのコンジュゲーション、蛍光検出を可能にする配列など）、タンパク質（例えば、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）に対する結合部位を提供する改変または配列、および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’、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。例え

ば、ＵＳ２０１５／０３７６５８６を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。バルジは、ｃｒＲＮＡ様領域と最小のｔｒａｃｒＲＮＡ様領域で構成される二重鎖内のヌクレオチドの対になっていない領域であり得る。バルジは、二重鎖の片側に、対になっていない５’－ＸＸＸＹ－３’を含むことができ、Ｘは、任意のプリンであり、Ｙは、反対側の鎖のヌクレオチドおよび二重鎖の反対側の対になっていないヌクレオチドの領域とゆらぎ対を形成し得るヌクレオチドであり得る。

【０２０２】

修飾されていない核酸は、分解されやすい場合がある。外因性核酸はまた、自然免疫応答を誘導し得る。修飾は、安定性を導入し、免疫原性を低減するのに役立ち得る。ガイドＲＮＡは、例えば、以下：（１）ホスホジエステル骨格結合において、非結合リン酸酸素の一方または両方および／もしくは結合リン酸酸素の１つ以上の改変または置換、（２）リボース糖の２’ヒドロキシルの改変または置換などのリボース糖の構成要素の改変または置換、（３）リン酸部分のデホスホリンカーによる置換、（４）天然発生型核酸塩基の修飾または置換、（５）リボース－リン酸骨格の置換または修飾、（６）オリゴヌクレオチドの３’末端または５’末端の修飾（例えば、末端リン酸基の除去、修飾、もしくは置換、または部分の複合体化）、ならびに（７）糖の修飾のうちの１つ以上を含む修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドを含み得る。他の可能なガイドＲＮＡ修飾には、ウラシルまたはポリ－ウラシルトラクトの修飾または置換が含まれる。例えば、ＷＯ２０１５／０４８５７７およびＵＳ２０１６／０２３７４５５を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。同様の修飾を、ＣａｓｍＲＮＡなどのＣａｓコード核酸に行うことができる。

【０２０３】

一例として、ガイドＲＮＡの５’または３’末端のヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を含んでもよい（例えば、塩基は、ホスホロチオエート基である修飾リン酸基を有してもよい）。例えば、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの５’または３’末端の２、３、または４つの末端ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含み得る。別の例として、ガイドＲＮＡの５’および／または３’末端のヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル修飾を有し得る。例えば、ガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの５’および／または３’末端（例えば、５’末端）の２、３、または４つの末端ヌクレオチドに２’－Ｏ－メチル修飾を含み得る。例えば、ＷＯ２０１７／１７３０５４Ａ１およびＦｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　２２：１－９を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。１つの特定の例では、ガイドＲＮＡは、最初の３つの５’および３’末端ＲＮＡ残基に２’－Ｏ－メチル類似体および３’ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。別の具体的な例では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓ９タンパク質と相互作用しないすべての２’ＯＨ基が２’－Ｏ－メチル類似体に置き換えられ、Ｃａｓ９と最小限の相互作用をゆするガイドＲＮＡのテール領域は、５’および３’ホスホロチオエートヌクレオチド間結合で修飾されている。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｙｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．３５（１２）：１１７９－１１８７を参照されたい。改変されたガイドＲＮＡの他の例は、例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１８／１０７０２８Ａ１に提供されている。

【０２０４】

ガイドＲＮＡは、任意の形態で提供され得る。例えば、ｇＲＮＡは、２つの分子（別個のｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ）または１つの分子（ｓｇＲＮＡ）のいずれかとしてＲＮＡの形態で、および任意にＣａｓタンパク質との複合体の形態で提供され得る。ｇＲＮＡはまた、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡの形態で提供され得る。ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、単一ＲＮＡ分子（ｓｇＲＮＡ）または別個のＲＮＡ分子（例えば、別個のｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ）をコードすることができる。後者の場合、ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、１つのＤＮＡ分子として、またはｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡをそれぞれコードする別個のＤＮＡ分子として提供され得る。

【０２０５】
ｇＲＮＡがＤＮＡの形態で提供される場合、ｇＲＮＡは、一時的、条件付き、または構成的に細胞内で発現され得る。ｇＲＮＡをコードするＤＮＡは、細胞のゲノムにおいて安定して組み込まれ、細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結され得る。あるいは、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。あるいは、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またはプラスミドであり得る。このような発現コンストラクトにおいて使用することができるプロモーターとしては、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、発生が制限された前駆細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、または１細胞期胚のうちの１つ以上において活性なプロモーターが挙げられる。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、また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ってよい。好適なプロモーターの特定の例には、ヒトＵ６プロモーター、ラットＵ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーター、またはマウスＵ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーターなどのＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターを挙げられる。
【０２０６】
あるいは、ｇＲＮＡは、他の様々な方法で調製され得る。例えば、ｇＲＮＡは、例えば、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを使用するインビトロ転写によって調製され得る（例えば、ＷＯ２０１４／０８９２９０およびＷＯ２０１４／０６５５９６を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。ガイドＲＮＡはまた、化学的合成によって調製された合成的に生成された分子であり得る。
【０２０７】
ガイドＲＮＡ標的配列。ガイドＲＮＡの標的ＤＮＡには、結合に十分な条件が存在する場合に、ｇＲＮＡのＤＮＡ標的セグメントが結合するＤＮＡに存在する核酸配列が含まれる。好適なＤＮＡ／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。他の好適なＤＮＡ／ＲＮＡ結合条件（例えば、無細胞系における条件）は、当該技術分野で知られている（例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ　Ｅｄ．（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ　２００１）を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。ｇＲＮＡに相補的であり、かつそれとハイブリダイズする標的ＤＮＡの鎖は、「相補的鎖」と呼ばれることができ、「相補的鎖」に相補的である（したがって、Ｃａｓタンパク質またはｇＲＮＡに相補的ではない）標的ＤＮＡの鎖は、「非相補鎖」または「テンプレート鎖」と呼ばれることができる。
【０２０８】
標的ＤＮＡは、ガイドＲＮＡがハイブリダイズする相補鎖上の配列と非相補鎖上の対応する配列（例えば、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）に隣接する）の両方を含む。本明細書で使用される「ガイドＲＮＡ標的配列」という用語は、具体的には、特に、ガイドＲＮＡが相補鎖上でハイブリダイズする配列に対応する（すなわち、その逆相補体）非相補鎖上の配列を指す。すなわち、ガイドＲＮＡ標的配列は、ＰＡＭに隣接する非相補鎖上の配列を指す（例えば、Ｃａｓ９の場合、ＰＡＭの上流または５’）。ガイドＲＮＡ標的配列はガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントと同等であるが、ウラシルの代わりにチミンを使用している。一例として、ＳｐＣａｓ９酵素のガイドＲＮＡ標的配列は、非相補鎖上の５’－ＮＧＧ－３’　ＰＡＭの上流の配列を指し得る。　ガイドＲＮＡは、標的ＤＮＡの相補鎖に対して相補性を持つように設計されており、ガイドＲＮＡのＤＮＡ標的化セグメントと標的ＤＮＡの相補鎖とのハイブリダイゼーションにより、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成が促進される。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ＲＮ

Ａが本明細書においてガイドＲＮＡ標的配列を標的とするものとして言及される場合、それは、ガイドＲＮＡが、非相補鎖上のガイドＲＮＡ標的配列の逆相補体である標的ＤＮＡの相補鎖配列にハイブリダイズすることを意味する。

【０２０９】

標的ＤＮＡまたはガイドＲＮＡ標的配列は、任意のポリヌクレオチドを含むことができ、例えば、細胞の核または細胞質内、あるいはミトコンドリアまたは葉緑体などの細胞の細胞小器官内に位置することができる。標的ＤＮＡまたはガイドＲＮＡ標的配列は、細胞に対して内因性または外因性の任意の核酸配列であってよい。ガイドＲＮＡ標的配列は、遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードする配列または非コード配列（例えば、調節配列）であってよく、または両方を含んでもよい。

【０２１０】

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

【０２１１】

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＋ＰＡＭの２つの例は、GN_{19}ＮＧＧ（配列番号９０）またはN_{20}ＮＧＧ（配列番号９１）である。例えば、ＷＯ２０１４／１６５８２５を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。５’末端のグアニンは、細胞内のＲＮＡポリメラーゼによる転写を促進することができる。ガイドＲＮＡ標的配列＋ＰＡＭの他の例は、インビトロでのＴ７ポリメラーゼによる効率的な転写を促進するための、５’末端に２つのグアニンヌクレオチドを含み得る（例えば、GGN_{20}ＮＧＧ；配列番号９２）。例えば、ＷＯ２０１４／０６５５９６を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。他のガイドＲＮＡ標的配列＋ＰＡＭは、５’ＧまたはＧＧおよび３’ＧＧまたはＮＧＧを含む、配列番号９０～９２の４～２２ヌクレオチド長を有し得る。さらに他のガイドＲＮＡ標的配列＋ＰＡＭは、配列番号９０～９２の１４～２０ヌクレオチド長を有し得る。

【０２１２】

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標的配列に対応する領域内またはその近く（すなわち、標的ＤＮＡの非相補鎖上のガイドＲＮＡ標

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

【０２１３】

（３）ヒトＴＴＲ遺伝子を標的とする外因性ドナー核酸

本明細書に開示される方法および組成物は、外因性ドナー核酸を利用して、ヌクレアーゼ剤によるヒト化ＴＴＲ遺伝子座の切断後のベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を改変することができる。このような方法では、ヌクレアーゼ剤タンパク質がヒト化ＴＴＲ遺伝子座を切断して一本鎖切断（ニック）または二本鎖切断を作成し、外因性ドナー核酸が非相同末端結合（ＮＨＥＪ）媒介ライゲーションまたは相同性指向修復事象を介してヒト化ＴＴＲ遺伝子座を再結合する。任意選択で、外因性ドナー核酸による修復は、ヌクレアーゼ標的配列を除去または破壊し、その結果、標的化された対立遺伝子は、ヌクレアーゼ剤によって再標的化され得ない。

【０２１４】

外因性ドナー核酸は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）またはリボ核酸（ＲＮＡ）を含むことができ、それらは一本鎖または二本鎖であり得、そしてそれらは直線状または環状の形態であり得る。例えば、外因性ドナー核酸は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）であり得る。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｙｏｓｈｉｍｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．７：１０４３１を参照されたい。例示的な外因性ドナー核酸は、約５０ヌクレオチド～約５ｋｂの長さであるか、約５０ヌクレオチド～約３ｋｂの長さであるか、または約５０～約１，０００ヌクレオチドの長さである。他の例示的な外因性ドナー核酸は、約４０～約２００ヌクレオチドの長さである。例えば、外因性ドナー核酸は、約５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１１０、１１０～１２０、１２０～１３０、１３０～１４０、１４０～１５０、１５０～１６０、１６０～１７０、１７０～１８０、１８０～１９０、または１９０～２００ヌクレオチドの長さであり得る。あるいは、外因性ドナー核酸は、約５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、または９００～１０００ヌクレオチドの長さであり得る。あるいは、外因性ドナー核酸は、約１～１．５、１．５～２、２～２．５、２．５～３、３～３．５、３．５～４、４～４．５、または４．５～５ｋｂの長さであり得る。あるいは、外因性ドナー核酸は、例えば、５ｋｂ、４．５ｋｂ、４ｋｂ、３．５ｋｂ、３ｋｂ、２．５ｋｂ、２ｋｂ、１．５ｋｂ、１ｋｂ、９００ヌクレオチド、８００ヌクレオチド、７００ヌクレオチド、６００ヌクレオチド、５００ヌクレオチド、４００ヌクレオチド、３００ヌクレオチド、２００ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、または５０ヌクレオチド以下の長さであり得る。外因性ドナー核酸（例えば、標的化ベクター）もより長くなる可能性がある。

【０２１５】

一例では、外因性ドナー核酸は、約８０ヌクレオチド～約２００ヌクレオチドの長さのｓｓＯＤＮである。別の例では、外因性ドナー核酸は、約８０ヌクレオチド～約３ｋｂの長さのｓｓＯＤＮである。そのようなｓｓＯＤＮはまた、例えば、それぞれ約４０ヌクレオチド～約６０ヌクレオチドの長さである相同性アームを有してもよい。そのようなｓｓＯＤＮはまた、例えば、それぞれ約３０ヌクレオチド～１００ヌクレオチドの長さである相同性アームを有してもよい。相同性アームは、対称的であってもよく（例えば、それぞれ４０ヌクレオチドまたはそれぞれ６０ヌクレオチドの長さ）、またはそれらは非対称的（例えば、３６ヌクレオチドの長さである１つの相同性アームと９１ヌクレオチドの長さである１つの相同性アーム）であってもよい。

【０２１６】

外因性ドナー核酸は、追加の望ましい特徴（例えば、修飾または調節された安定性；蛍光標識による追跡または検出；タンパク質またはタンパク質複合体の結合部位など）を提供する修飾または配列を含み得る。外因性ドナー核酸は、１つ以上の蛍光標識、精製タグ、エピトープタグ、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。例えば、外因性ドナー核酸は、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、または少なくとも５つの蛍光標識などの１つ以上の蛍光標識（例えば、蛍光タンパク質または他のフルオロフォアまたは色素）を含んでもよい。例示的な蛍光標識としては、フルオレセイン（例えば、６－カルボキシフルオレセイン（６－ＦＡＭ））、テキサスレッド、ＨＥＸ、Ｃｙ３、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、パシフィックブルー、５－（および－６）－カルボキシテトラメチルローダミン（ＴＡＭＲＡ）およびＣｙ７などのフルオロフォアが挙げられる。オリゴヌクレオチドを標識するための幅広い蛍光色素が市販されている（例えば、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから）。そのような蛍光標識（例えば、内部蛍光標識）は、例えば、外因性ドナー核酸の末端と適合性のある突出端を有する切断された標的核酸に直接組み込まれた外因性ドナー核酸を検出するために使用することができる。標識またはタグは、外因性ドナー核酸の５’末端、３’末端、または内部にあってよい。例えば、外因性ドナー核酸は、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓからＩＲ７００フルオロフォア（５’ＩＲＤＹＥ(登録商標)７００）を有する５’末端にコンジュゲートさせることができる。

【０２１７】

外因性ドナー核酸はまた、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座に組み込まれるＤＮＡのセグメントを含む核酸インサートを含み得る。ヒト化ＴＴＲ遺伝子座での核酸インサートの組み込みは、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座への目的の核酸配列の付加、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座での目的の核酸配列の欠失、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座での目的の核酸配列の置換（すなわち、欠失および挿入）をもたらし得る。いくつかの外因性ドナー核酸は、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座での対応する欠失なしに、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座での核酸インサートの挿入のために設計されている。他の外因性ドナー核酸は、対応する核酸インサートの挿入なしに、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座で目的の核酸配列を削除するように設計されている。さらに他の外因性ドナー核酸は、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座で目的の核酸配列を削除し、それを核酸インサートで置き換えるように設計されている。

【０２１８】

削除および／または置換されるヒト化ＴＴＲ遺伝子座における核酸インサートまたは対応する核酸は、様々な長さであってよい。削除および／または置換されるヒト化ＴＴＲ遺伝子座における例示的な核酸インサートまたは対応する核酸は、約１ヌクレオチド～約５ｋｂの長さであるか、または約１ヌクレオチド～約１，０００ヌクレオチドの長さである。例えば、削除および／または置換されるヒト化ＴＴＲ遺伝子座の核酸インサートまたは対応する核酸は、約１～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１１０、１１０～１２０、１２０～１３０、１３０～１４０、１４０～１５０、１５０～１６０、１６０～１７０、１７０～１８０、１８０～１９０、または１９０～１２０ヌクレオチドの長さであり得る。同様に、削除および／または置換されるヒト化ＴＴＲ遺伝子座の核酸インサ

ートまたは対応する核酸は、１～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、または９００～１０００ヌクレオチドの長さであり得る。同様に、削除および／または置換されるヒト化ＴＴＲ遺伝子座の核酸インサートまたは対応する核酸は、約１～１．５、１．５～２、２～２．５、２．５～３、３～３．５、３．５～４、４～４．５、もしくは４．５～５ｋｂ、またはそれ以上の長さであり得る。

【０２１９】

核酸インサートは、置換の対象となる配列の全部または一部と相同またはオーソロガスである配列を含むことができる。例えば、核酸インサートは、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座での置換を標的とする配列と比較して、１つ以上の点変異（例えば、１、２、３、４、５、またはそれ以上）を含む配列を含むことができる。任意選択で、そのような点変異は、コードされたポリペプチドにおいて保存的アミノ酸置換（例えば、アスパラギン酸［Ａｓｐ、Ｄ］のグルタミン酸［Ｇｌｕ、Ｅ］への置換）をもたらし得る。

【０２２０】

非相同末端結合媒介挿入のためのドナー核酸。他の外因性ドナー核酸は、５’末端および／または３’末端に短い一本鎖領域を有し、これらは、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座でのヌクレアーゼ媒介切断によって作成される１つ以上のオーバーハングに相補的である。これらのオーバーハングは、５’および３’相同性アームと呼ばれることもある。例えば、いくつかの外因性ドナー核酸は、５’末端および／または３’末端に短い一本鎖領域を有し、これらはヒト化ＴＴＲ遺伝子座の５’および／または３’標的配列でのヌクレアーゼ媒介切断によって作成された１つ以上のオーバーハングに相補的である。いくつかのそのような外因性ドナー核酸は、５’末端のみまたは３’末端のみに相補的領域を有する。例えば、いくつかのそのような外因性ドナー核酸は、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座の５’標的配列で作成されたオーバーハングに相補的な５’末端にのみ、またはヒト化ＴＴＲ遺伝子座の３’標的配列で作成されたオーバーハングに相補的な３’末端にのみ、相補的領域を有する。他のそのような外因性ドナー核酸は、５’末端と３’末端の両方に相補的領域を有する。例えば、他のそのような外因性ドナー核酸は、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座でのヌクレアーゼ媒介切断によって生成される５’と３’末端の両方に相補的領域（例えば、それぞれ第１および第２のオーバーハングに相補的）を有する。例えば、外因性ドナー核酸が二本鎖である場合、一本鎖相補的領域は、ドナー核酸の上部鎖の５’末端およびドナー核酸の下部鎖の５’末端から伸長し、両端に５’突出を作成することができる。代替的に、一本鎖相補領域は、ドナー核酸の上部鎖の３’末端から、およびテンプレートの下部鎖の３’末端から伸長し、３’突出を作成することができる。

【０２２１】

相補的領域は、外因性ドナー核酸と標的核酸との間のライゲーションを促進するのに十分な任意の長さであり得る。例示的な相補的領域は、約１～約５ヌクレオチドの長さ、約１～約２５ヌクレオチドの長さ、または約５～約１５０ヌクレオチドの長さである。例えば、相補的領域は、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチドの長さであってよい。あるいは、相補的領域は、約５～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１１０、１１０～１２０、１２０～１３０、１３０～１４０、もしくは１４０～１５０ヌクレオチド、またはそれ以上の長さであり得る。

【０２２２】

このような相補的領域は、２対のニッカーゼによって作成された突出を相補的にすることができる。ＤＮＡの反対側の鎖を切断して第１の二本鎖切断を作成する第１および第２のニッカーゼ、およびＤＮＡの反対側の鎖を切断して第２の二本鎖切断を作成する第３および第４のニッカーゼを使用することにより、両端が千鳥状の２つの二本鎖切断を作成できる。例えば、Ｃａｓタンパク質を使用して、第１、第２、第３、および第４のガイドＲＮＡに対応する第１、第２、第３、および第４のガイドＲＮＡ標的配列にニックを入れる

ことができる。第１および第２のガイドＲＮＡ標的配列は、ＤＮＡの第１および第２の鎖上の第１および第２のニッカーゼによって作成されたニックが二本鎖切断を作成するように、第１の切断部位を作成するように配置することができる（すなわち、第１の切断部位は、第１および第２のガイドＲＮＡ標的配列内のニックを含む）。同様に、第３および第４のガイドＲＮＡ標的配列は、ＤＮＡの第１および第２の鎖上の第３および第４のニッカーゼによって作成されたニックが二本鎖切断を作成するように、第２の切断部位を作成するように配置することができる（すなわち第２の切断部位は、第３および第４のガイドＲＮＡ標的配列内のニックを含む）。好ましくは、第１および第２のガイドＲＮＡ標的配列および／または第３および第４のガイドＲＮＡ標的配列内のニックは、オーバーハングを作成するオフセットニックであり得る。オフセットウィンドウは、例えば、少なくとも約５ｂｐ、１０ｂｐ、２０ｂｐ、３０ｂｐ、４０ｂｐ、５０ｂｐ、６０ｂｐ、７０ｂｐ、８０ｂｐ、９０ｂｐ、１００ｂｐ、またはそれ以上であり得る。これらの各々が、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｒａｎ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｃｅｌｌ １５４：１３８０－１３８９、Ｍａｌｉ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．３１：８３３－８３８、およびＳｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（２０１４）Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １１：３９９－４０４を参照されたい。そのような場合、二本鎖外因性ドナー核酸は、第１および第２のガイドＲＮＡ標的配列内のニックおよび第３および第４のガイドＲＮＡ標的配列内のニックによって作成された突出に相補的な一本鎖相補領域で設計することができる。次いで、そのような外因性ドナー核酸は、非相同末端結合媒介ライゲーションによって挿入することができる。

【０２２３】

相同性指向修復による挿入のためのドナー核酸。いくつかの外因性ドナー核酸は、ホモロジーアームを含む。外因性ドナー核酸が核酸インサートも含む場合、ホモロジーアームは核酸インサートに隣接することができる。参照を容易にするために、ホモロジーアームは、本明細書では５’および３’（すなわち、上流および下流）ホモロジーアームと呼ばれる。この用語は、外因性ドナー核酸内の核酸インサートに対するホモロジーアームの相対位置に関連している。５’および３’相同性アームは、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座内の領域に対応し、これらは、本明細書では、それぞれ「５’標的配列」および「３’標的配列」と呼ばれる。

【０２２４】

ホモロジーアームおよび標的配列は、２つの領域が相同組換え反応の基質として作用するのに十分なレベルの配列同一性を互いに共有する場合、互いに「対応する」または「対応している」。「相同性」という用語は、対応する配列と同一であるか、または配列同一性を共有するＤＮＡ配列を含む。所与の標的配列と外因性ドナー核酸に見られる対応するホモロジーアームとの間の配列同一性は、相同組換えが起こることを可能にする任意の程度の配列同一性であってよい。例えば、外因性ドナー核酸（またはその断片）のホモロジーアームおよび標的配列（またはその断片）によって共有される配列同一性の量は、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性であり得、これにより、配列は相同組換えを起こす。さらに、ホモロジーアームと対応する標的配列との間の対応する相同性領域は、相同組換えを促進するのに十分な任意の長さであり得る。例示的なホモロジーアームは、約２５ヌクレオチド～約２．５ｋｂの長さであるか、約２５ヌクレオチド～約１．５ｋｂの長さであるか、または約２５～約５００ヌクレオチドの長さである。例えば、所与の相同性アーム（または各相同性アーム）および／または対応する標的配列は、約２５～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～２５０、２５０～３００、３００～３５０、３５０～４００、４００～４５０、または４５０～５００ヌクレオチドの長さである対応する相同性領域を含むことができ、その結果、相同性アームが、標的核酸内の対応する標的配列との相同組換えを受けるのに

十分な相同性を有する。代替的に、所与のホモロジーアーム（または各ホモロジーアーム）および／または対応する標的配列は、約０．５ｋｂ～約１ｋｂ、約１ｋｂ～約１．５ｋｂ、約１．５ｋｂ～約２ｋｂ、または約２ｋｂ～約２．５ｋｂの長さである対応する相同性領域を含み得る。例えば、ホモロジーアームは、それぞれ約７５０ヌクレオチドの長さであり得る。ホモロジーアームは対称的（それぞれの長さがほぼ同じサイズ）であってもよく、非対称的（一方が他方よりも長い）であってもよい。

【０２２５】

ヌクレアーゼ剤を外因性ドナー核酸と組み合わせて使用する場合、ヌクレアーゼ切断部位での一本鎖切断（ニック）または二本鎖切断の際に、標的配列と相同性アームとの間の相同組換え事象の発生を促進するように、５’および３’標的配列をヌクレアーゼ切断部位に十分に近接して（例えば、ヌクレアーゼ標的配列に十分に近接して）配置することが好ましい。「ヌクレアーゼ切断部位」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）によってニックまたは二本鎖切断が作成されるＤＮＡ配列を含む。外因性ドナー核酸の５’および３’ホモロジーアームに対応する標的化遺伝子座内の標的配列は、距離がヌクレアーゼ切断部位での一本鎖切断または二本鎖切断の際の５’および３’標的配列とホモロジーアームとの間の相同組換え事象の発生を促進するような距離である場合、ヌクレアーゼ切断部位に「十分に近接して位置する」。したがって、外因性ドナー核酸の５’および／または３’ホモロジーアームに対応する標的配列は、例えば、所与のヌクレアーゼ切断部位の少なくとも１ヌクレオチド内、または所与のヌクレアーゼ切断部位の少なくとも１０ヌクレオチド～約１，０００ヌクレオチド内であり得る。一例として、ヌクレアーゼ切断部位は、標的配列の少なくとも一方または両方に直接隣接し得る。

【０２２６】

外因性ドナー核酸のホモロジーアームおよびヌクレアーゼ切断部位に対応する標的配列の空間的関係は変化し得る。例えば、標的配列は、ヌクレアーゼ切断部位の５’に位置してもよく、標的配列は、ヌクレアーゼ切断部位の３’に位置してもよく、または標的配列は、ヌクレアーゼ切断部位に隣接していてもよい。

【０２２７】

（４）その他のヒトＴＴＲ標的化試薬

他の既知のまたは推定上のヒトＴＴＲ標的化試薬のいずれかの活性もまた、本明細書に開示される非ヒト動物を使用して評価することができる。同様に、他の任意の分子は、本明細書に開示される非ヒト動物を使用して、ヒトＴＴＲ標的化活性についてスクリーニングすることができる。

【０２２８】

他のヒトＴＴＲ標的化試薬にはＲＮＡｉ剤が含まれる。「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の翻訳の分解または阻害を促進することができる小さい二本鎖ＲＮＡまたは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、それぞれ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（つまり、哺乳動物細胞のＲＮＡ干渉経路機構（ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体または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、特定の経路または作用メカニズムに拘束または限定されない。本明細書に開示されるＲＮＡｉ剤は、センス鎖およ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）、およ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またはヌクレオチドの連続または順序）に少なくとも部分的に相補的である。

【０２２９】
他のヒトＴＴＲ標的化試薬には、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）が含まれ得る。一本鎖ＡＳＯと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（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またはタンパク質（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、リボソームまた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したり、ヌクレアーゼなどのタンパク質を動員したりする。目的の作用メカニズムに基づいて、ＡＳＯに対して様々な改変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または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ＲＮａｓｅＨの基質として機能する。

【０２３０】
他のヒトＴＴＲ標的化試薬には、ヒトＴＴＲエピトープに特異的に結合するように設計された抗体または抗原結合タンパク質が含まれる。「抗原結合タンパク質」という用語は、抗原に結合する任意のタンパク質を含む。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（二重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）、またはデイビスボディが含まれる（すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，５８６，７１３号）。

【０２３１】
他のヒトＴＴＲ標的化試薬には小分子試薬が含まれる。このような小分子試薬の一例はタファミディスであり、これは正しく折り畳まれた四量体型のトランスサイレチン（ＴＴＲ）タンパク質の速度論的安定化によって機能する。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＨａｍｍａｒｓｔｒｏｍ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９９：７１３－７１６を参照されたい。

【０２３２】
Ｄ．非ヒト動物または細胞へのヒトＴＴＲ標的化試薬の投与
本明細書に開示される方法は、核酸、タンパク質、核酸－タンパク質複合体、タンパク質複合体、または小分子を含む、様々な分子（例えば、治療用分子または複合体などのヒトＴＴＲ標的化試薬）を、非ヒト動物または細胞に導入することを含み得る。「導入すること」は、細胞の内部または非ヒト動物細胞の内部にアクセスできるような方法で、細胞または非ヒト動物に分子（例えば、核酸またはタンパク質）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することができ、２つ以上の構成要素（例えば、２つの構成要素、またはすべての構成要素）を、任意の組み合わせで同時にまたは逐次的に細胞または非ヒト動物に導入することができる。例えば、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡの導入前に細胞または非ヒト動物に導入することができ、またはガイドＲＮＡの導入後に導入することができる。別の例として、外因性ドナー核酸は、Ｃａｓタンパク質およびガイドＲＮＡの導入前に導入することができ、またはＣａｓタンパク質およびガイドＲＮＡの導入後に導入することができる（例えば、外因性ドナー核酸は、Ｃａｓタンパク質およびガイドＲＮＡの導入の約１、２、３、４、８、１２、２４、３６、４８、または７２時間前または後に投与することができる。）例えば、ＵＳ ２０１５／０２４０２６３およびＵＳ ２０１５／０１１０７６２を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。さらに、２つ以上の構成要

素は、同じ送達方法または異なる送達方法によって細胞または非ヒト動物に導入することができる。同様に、２つ以上の構成要素は、同じ投与経路または異なる投与経路によって非ヒト動物に導入することができる。

【０２３３】

いくつかの方法では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムの構成要素が非ヒト動物または細胞に導入される。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡ（例えば、インビトロ転写されたＲＮＡ）の形態で、またはガイドＲＮＡをコードするＤＮＡの形態で非ヒト動物または細胞に導入することができる。ＤＮＡの形態で導入されると、ガイドＲＮＡをコードするＤＮＡは、非ヒト動物の細胞内で活性のあるプロモーターに作動可能に連結することができる。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できる。そのようなＤＮＡは、１つ以上の発現コンストラクト中にあり得る。例えば、そのような発現コンストラクトは、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および１つ以上のｔｒａｃｒＲＮＡをコードするＤＮＡは、別個の核酸分子の構成要素であり得る）。

【０２３４】

同様に、Ｃａｓタンパク質は任意の形態で提供してもよい。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してもよい。代替的に、Ｃａｓタンパク質は、ＲＮＡ（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ））またはＤＮＡなどの、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸の形態で提供してもよい。任意に、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸は、特定の細胞または生物におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化することができる。例えば、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、げっ歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、または任意の他の目的の宿主細胞においてより頻度高く使用される代替コドンへと改変することができる。Ｃａｓタンパク質をコードする核酸が非ヒト動物に導入されると、Ｃａｓタンパク質は、一時的、条件付き、または構成的に細胞内で発現され得る。

【０２３５】

Ｃａｓタンパク質またはガイドＲＮＡをコードする核酸は、発現コンストラクト中のプロモーターに作動可能に連結され得る。発現構築物は、遺伝子または他の目的の核酸配列（例えば、Ｃａｓ遺伝子）の発現を指示することができ、かつそのような目的の核酸配列を標的細胞に移すことができる任意の核酸構築物を含む。例えば、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存在してもよい。あるいは、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またはプラスミドであってもよい。発現コンストラクトにおいて使用することができる適切プロモーターとしては、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、発生が制限された前駆細胞、誘導多能性幹（ｉＰＳ）細胞、または１細胞期胚のうちの１つ以上において活性なプロモーターが挙げられる。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、または組織特異的プロモーターであり得る。任意選択で、プロモーターは、一方向のＣａｓタンパク質と他の方向のガイドＲＮＡの両方の発現を駆動する双方向プロモーターであってもよい。こ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）、およびＴＡＴＡボックスの３つの外部制御要素を含む完全な従来の一方向Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーター、ならびに（２）ＤＳＥの５’末端に逆方向に融合されたＰＳＥおよびＴＡＴＡボックスを含む第２の基本的なＰｏｌ　ＩＩＩプロモーターで構成してもよい。例えば、Ｈ１プロモーターでは、ＤＳＥはＰＳＥとＴＡＴＡボックスに隣接しており、プロモーターは、Ｕ６プロモーターに由来するＰＳＥおよびＴＡＴＡボックスを追加することによって逆方向の転写が制御されるハイブリッドプロモーターを作成することにより、双方向にすることができる。例

えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＵＳ２０１６／００７４５３５を参照されたい。双方向プロモーターを使用してＣａｓタンパク質とガイドＲＮＡをコードする遺伝子を同時に発現させることにより、コンパクトな発現カセットを生成して送達を容易にすることができる。

【０２３６】

非ヒト動物または細胞に導入された分子（例えば、ＣａｓタンパクまたはガイドＲＮＡまたはＲＮＡｉ剤またはＡＳＯ）は、導入された分子の安定性を増加させる担体（例えば、所与の貯蔵条件下（例えば、－２０℃、４℃、または周囲温度）での、分解産物が閾値未満、例えば出発核酸またはタンパク質の０．５重量％未満のままである期間を延長する、またはインビボでの安定性を増加させる）を含む組成物で提供することができる。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（ｃｏｃｈｌｅａｔｅｓ）、および脂質微小管が挙げられる。

【０２３７】

細胞または非ヒト動物への分子（例えば、核酸またはタンパク質）の導入を可能にするために、様々な方法および組成物が本明細書で提供される。分子を様々な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、およびウイルス媒介法が含まれる。

【０２３８】

トランスフェクションプロトコル、ならびに核酸配列を細胞に導入するためのプロトコルは異なり得る。非限定的なトランスフェクション法には、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．ＵＳＡ ７４（４）：１５９０－４、および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、またはＤＥＡＥ－デキストランも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する化学物質ベースのトランスフェクション法が含まれる。非化学的方法には、電気穿孔法、ソノポレーション、およ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、またはマグネットアシスト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することができる。

【０２３９】

細胞への分子（例えば核酸またはタンパク質）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、また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。さらに、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）システムを使用して行われる。

【０２４０】

細胞（例えば、接合子）への分子（例えば、核酸またはタンパク質）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体および／または父方の前核また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、Ｃａ

ｓタンパク質もしくはＣａｓタンパク質をコードするかまたは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。あるいは、マイクロインジェクションは、核／前核およ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，Ｖｉｎｔｅｒｓｔｅｎ 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、またＭｅｙｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０７：１５０２２－１５０２６、およびＭｅｙｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０９：９３５４－９３５９も参照されたい。

【０２４１】

分子（例えば、核酸またはタンパク質）を細胞または非ヒト動物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、または埋め込み型デバイス媒介配達が含まれ得る。具体的な例として、核酸またはタンパク質は、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、脂質渦巻状物、または脂質微小管などの担体中で、細胞または非ヒト動物に導入することができる。非ヒト動物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）、および脂質ナノ粒子媒介送達が含まれる。

【０２４２】

細胞または非ヒト動物への核酸およびタンパク質の導入は、流体力学的送達（ＨＤＤ）によって達成することができる。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、現在のウイルスおよ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、大きくて膜不透過性の化合物が実質細胞に入るのを妨げる内皮およ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、およびその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役立つ。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｂｏｎａｍａｓｓａ ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．２８（４）：６９４－７０１を参照されたい。

【０２４３】

核酸の導入は、ＡＡＶ媒介送達また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することができる。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、およ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、または分裂細胞と非分裂細胞の両方に感染できる。ウイルスは宿主ゲノムに組み込まれてもよく、または代替的に宿主ゲノムに組み込まれなくてもよい。このようなウイルスは、免疫力が低下するように操作することもできる。ウイルスは、複製可能であってもよく、複製欠損（例えば、ビリオン複製および／またはパッケージングの追加ラウンドに必要な１つ以上の遺伝子に欠陥がある）であってもよい。ウイルスは、一過性の発現、長期的な発現（例えば、少なくとも１週間、２週間、１ヶ月、２ヶ月、または３ヶ月）、または永続的な発現（例えば、Ｃａｓ９および／またはｇＲＮＡの）を引き起こし得る。例示的なウイルス力価（例えば、ＡＡＶ力価）は、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、および10^{16}ベクターゲノ

ム／ｍＬを含む。
【０２４４】
ｓｓＤＮＡ ＡＡＶゲノムは、２つのオープンリーディングフレーム、ＲｅｐとＣａｐで構成され、相補ＤＮＡ鎖の合成を可能にする２つの末端逆位配列が隣接している。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とＣａｐはトランスで供給される。ＲｅｐとＣａｐに加えて、ＡＡＶはアデノウイルス由来の遺伝子を含むヘルパープラスミドを必要とする場合がある。これらの遺伝子（Ｅ４、Ｅ２ａ、および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、およ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粒子を生成することができる。代替的に、Ｒｅｐ、Ｃａｐ、およ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することもできる。同様のパッケージングセルおよび方法は、レトロウイルスなどの他のウイルスにも使用できる。
【０２４５】
ＡＡＶの複数の血清型が確認されている。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。ＣＮＳ組織に対する血清型には、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ８、およびＡＡＶ９が含まれる。心臓組織に対する血清型には、ＡＡＶ１、ＡＡＶ８、およびＡＡＶ９が含まれる。腎臓組織に対する血清型にはＡＡＶ２が含まれる。肺組織に対する血清型には、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、およびＡＡＶ９が含まれる。膵臓組織に対する血清型にはＡＡＶ８が含まれる。光受容細胞に対する血清型には、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５、およびＡＡＶ８が含まれる。網膜色素上皮組織に対する血清型には、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、およびＡＡＶ８が含まれる。骨格筋組織に対する血清型には、ＡＡＶ１、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、およびＡＡＶ９が含まれる。肝臓組織に対する血清型には、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、およびＡＡＶ９、特にＡＡＶ８が含まれる。
【０２４６】
指向性は、キャプシドと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さらに洗練することができる。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、指向性を変えることができる。異なる血清型に由来するハイブリッドキャプシドを使用して、ウイルスの指向性を改変することもできる。例えば、ＡＡＶ－ＤＪには、８つの血清型由来のハイブリッドキャプシドが含まれており、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、脳への取り込みが強化された別の例である。ＡＡＶ血清型は、変異によっても改変できる。ＡＡＶ２の変異改変の例には、Ｙ４４４Ｆ、Ｙ５００Ｆ、Ｙ７３０Ｆ、およびＳ６６２Ｖが含まれる。ＡＡＶ３の変異改変の例には、Ｙ７０５Ｆ、Ｙ７３１Ｆ、およびＴ４９２Ｖが含まれる。ＡＡＶ６の変異改変の例には、Ｓ６６３ＶおよびＴ４９２Ｖが含まれる。他の偽型／改変ＡＡＶ変異体には、ＡＡＶ２／１、ＡＡＶ２／６、ＡＡＶ２／７、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶ２／９、ＡＡＶ２．５、ＡＡＶ８．２、およびＡＡＶ／ＳＡＳＴＧが含まれる。
【０２４７】
導入遺伝子の発現を加速するために、自己相補的ＡＡＶ（ｓｃＡＡＶ）バリアントを使用することができる。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）ベクターも使用できる。
【０２４８】
パッケージング容量を増やすために、より長い導入遺伝子を、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

に分割することができる。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、完全長の導入遺伝子を発現させることができる。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。容量を増やす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に分割できるが、共発現が相同組換えと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。

【０２４９】

核酸と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できる。例えば、ＬＮＰ媒介送達は、Ｃａｓ ｍＲＮＡとガイドＲＮＡの組み合わせ、またはＣａｓタンパク質とガイドＲＮＡの組み合わせを送達するために使用することができる。このような方法による送達は、Ｃａｓの一時的発現をもたらし、生分解性脂質はクリアランスを改善し、忍容性を改善し、免疫原性を低下させる。脂質製剤は、生体分子を分解から保護すると同時に、細胞への取り込みを改善することができる。脂質ナノ粒子は、分子間力によって互いに物理的に結合した複数の脂質分子を含む粒子である。これらには、ミクロスフェア（単層および多層ベシクル、例えばリポソームを含む）、エマルジョン中の分散相、ミセル、または懸濁液中の内相が含まれる。そのような脂質ナノ粒子は、送達のために１つ以上の核酸またはタンパク質をカプセル化するために使用することができる。カチオン性脂質を含む製剤は、核酸などのポリアニオンを送達するのに有用である。含めることができる他の脂質は、中性脂質（すなわち、非荷電または両性イオン脂質）、陰イオン脂質、トランスフェクションを増強するヘルパー脂質、およびナノ粒子がインビボで存在できる時間を増加させるステルス脂質である。適切なカチオン性脂質、中性脂質、アニオン性脂質、ヘルパー脂質、およびステルス脂質の例は、すべての目的のためにそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０１６／０１０８４０Ａ１およびＷＯ２０１７／１７３０５４Ａ１に見出すことができる。例示的な脂質ナノ粒子は、カチオン性脂質および１つ以上の他の成分を含むことができる。一例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質を含むことができる。別の例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質およびＤＳＰＣなどの中性脂質を含むことができる。別の例では、他の成分は、コレステロールなどのヘルパー脂質、ＤＳＰＣなどの任意の中性脂質、およびＳ０１０、Ｓ０２４、Ｓ０２７、Ｓ０３１、またはＳ０３３などのステルス脂質を含むことができる。

【０２５０】

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

【０２５１】

カプセル化およびエンドソーム脱出のための脂質は、カチオン性脂質であり得る。脂質はまた、生分解性イオン化可能脂質などの生分解性脂質であり得る。適切な脂質の一例は、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアートとも呼ばれる、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアートである脂質ＡまたはＬＰ０１である。例えば、それらの各々が、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｆｉｎｎ ｅｔ ａｌ．（２０１８）Ｃ

ｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ ２２：１－９およびＷＯ２０１７／１７３０５４Ａ１を参照されたい。適切な脂質の別の例は、（（５－（（ジメチルアミノ）メチル）－１，３－フェニレン）ビス（オキシ））ビス（オクタン－８，１－ジイル）ビス（デカノアート）とも呼ばれる、（（５－（（ジメチルアミノ）メチル）－１，３－フェニレン）ビス（オキシ））ビス（オクタン－８，１－ジイル）ビス（デカノアート）である脂質Ｂである。適切な脂質の別の例は、２－（（４－（（（３－（ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）ヘキサデカノイル）オキシ）プロパン－１，３－ジイル（９Ｚ，９’Ｚ，１２Ｚ，１２’Ｚ）－ビス（オクタデカ－９，１２－ジエノアート）である脂質Ｃである。適切な脂質の別の例は、３－（（（３－（ジメチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）－１３－（オクタノイルオキシ）トリデシル３－オクチルウンデカノアートである脂質Ｄである。他の適切な脂質としては、ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－イル４－（ジメチルアミノ）ブタノエート（Ｄｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ＭＣ３）としても知られる））が含まれる。

【０２５２】

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

【０２５３】

このような脂質は、それらが含まれる培地のｐＨに応じてイオン化可能であってよい。例えば、わずかに酸性の培地では、脂質はプロトン化され、したがって正電荷を帯びることができる。逆に、例えば、ｐＨが約７．３５である血液などのわずかに塩基性の媒体では、脂質はプロトン化されない可能性があり、したがって電荷を帯びない可能性がある。いくつかの実施形態では、脂質は、少なくとも約９、９．５、または１０のｐＨでプロトン化され得る。そのような脂質が電荷を帯びる能力は、その固有のｐＫａに関連している。例えば、脂質は、独立して、約５．８～約６．２の範囲のｐＫａを有し得る。

【０２５４】

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

）、およびジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）からなる群から選択され得る。

【０２５５】

ヘルパー脂質には、トランスフェクションを促進する脂質が含まれる。ヘルパー脂質がトランスフェクションを強化する機序は、粒子安定性を増強することを含んでもよい。場合によっては、ヘルパー脂質が膜の融合性を高めることができる。ヘルパー脂質は、ステロイド、ステロール、およびアルキルレゾルシノールを含む。適切なヘルパー脂質の例には、コレステロール、５－ヘプタデシルレゾルシノール、およびヘミコハク酸コレステロールが含まれる。一例では、ヘルパー脂質はコレステロールまたはヘミコハク酸コレステロールであり得る。

【０２５６】

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

【０２５７】

ステルス脂質の親水性頭部基は、例えば、ＰＥＧ（しばしばポリ（エチレンオキシド）と呼ばれる）、ポリ（オキサゾリン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（グリセロール）、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリアミノ酸、およびポリＮ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドに基づくポリマーから選択されるポリマー部分を含んでもよい。ＰＥＧという用語は、ポリエチレングリコールまたは他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。特定のＬＮＰ製剤では、ＰＥＧはＰＥＧ２０００とも呼ばれるＰＥＧ－２Ｋであり、平均分子量は約２，０００ダルトンである。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１７／１７３０５４Ａ１を参照されたい。

【０２５８】

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

【０２５９】

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

【０２６０】
ＬＮＰは、製剤中の成分脂質の異なるそれぞれのモル比を含むことができる。ＣＣＤ脂質のモル％は、例えば、約３０モル％～約６０モル％、約３５モル％～約５５モル％、約４０モル％～約５０モル％、約４２モル％～約４７モル％、または約４５％であってよい。ヘルパー脂質のモル％は、例えば、約３０モル％～約６０モル％、約３５モル％～約５５モル％、約４０モル％～約５０モル％、約４１モル％～約４６モル％、または約４４モル％であってよい。中性脂質のモル％は、例えば、約１モル％～約２０モル％、約５モル％～約１５モル％、約７モル％～約１２モル％、または約９モル％であってよい。ステルス脂質のモル％は、例えば、約１モル％～約１０モル％、約１モル％～約５モル％、約１モル％～約３モル％、約２モル％、または約１モル％であってよい。
【０２６１】
ＬＮＰは、生分解性脂質（Ｎ）の正に帯電したアミン基と、カプセル化される核酸の負に帯電したリン酸基（Ｐ）との間で異なる比を有することができる。これは、方程式Ｎ／Ｐで数学的に表すことができる。例えば、Ｎ／Ｐ比は、約０．５～約１００、約１～約５０、約１～約２５、約１～約１０、約１～約７、約３～約５、約４～約５、約４、約４．５、または約５であってよい。Ｎ／Ｐ比はまた、約４～約７または約４．５～約６であり得る。特定の例では、Ｎ／Ｐ比は４．５または６にすることができる。
【０２６２】
一部のＬＮＰでは、カーゴはＣａｓ ｍＲＮＡとｇＲＮＡを含むことができる。ＣａｓｍＲＮＡとｇＲＮＡは、異なる比であってよい。例えば、ＬＮＰ製剤は、約２５：１～約１：２５の範囲、約１０：１～約１：１０の範囲、約５：１～約１：５の範囲、または約１：１のＣａｓ ｍＲＮＡとｇＲＮＡの比を含んでもよい。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１～約１：５、または約１０：１のＣａｓ ｍＲＮＡとｇＲＮＡ核酸の比を含んでもよい。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１０、２５：１、１０：１、５：１、３：１、１：１、１：３、１：５、１：１０、または１：２５のＣａｓ ｍＲＮＡとｇＲＮＡ核酸の比を含んでもよい。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１～約１：２の、Ｃａｓ ｍＲＮＡとｇＲＮＡ核酸の比を含んでもよい。具体的な例において、Ｃａｓ ｍＲＮＡとｇＲＮＡとの比は、約１：１または約１：２であってよい。
【０２６３】
一部のＬＮＰでは、カーゴは外因性ドナー核酸とｇＲＮＡを含むことができる。外因性ドナー核酸とｇＲＮＡは異なる比にすることができる。例えば、ＬＮＰ製剤は、約２５：１～約１：２５の範囲、約１０：１～約１：１０の範囲、約５：１～約１：５、または約１：１の外因性ドナー核酸とｇＲＮＡの比を含んでもよい。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１～約１：５、約５：１～約１：１、約１０：１、または約１：１０の外因性ドナー核酸とｇＲＮＡの比を含んでもよい。代替的に、ＬＮＰ製剤は、約１：１０、２５：１、１０：１、５：１、３：１、１：１、１：１：３、１：５、１：１０、または１：２５の外因性ドナー核酸とｇＲＮＡ核酸の比を含んでもよい。
【０２６４】
適切なＬＮＰの具体的な例は、４．５の窒素対リン酸塩（Ｎ／Ｐ）比を持ち、４５：４４：９：２のモル比で生分解性カチオン性脂質、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む。生分解性カチオン性脂質は、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアートとも呼ばれる、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアートであり得る。例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｆｉｎｎ ｅｔ ａｌ．（２０１８）Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ ２２：１－９を参照されたい。Ｃａｓ９ ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で１：１にすることができる。適切なＬＮＰの別の具体的な例には、Ｄｌｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ（ＭＣ３）、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥ

Ｇ－ＤＭＧが５０：３８．５：１０：１．５のモル比で含まれている。
【０２６５】
適切なＬＮＰの別の具体的な例は、６の窒素対リン酸塩（Ｎ／Ｐ）比を持ち、５０：３８：９：３のモル比で生分解性カチオン性脂質、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む。生分解性カチオン性脂質は、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノアートとも呼ばれる、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノアートであり得る。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡは、ガイドＲＮＡに対して重量比で１：２にすることができる。
【０２６６】
免疫原性を低下させるために、送達様式を選択することができる。例えば、Ｃａｓタンパク質およびｇＲＮＡは、異なる様式（例えば、バイモーダル（ｂｉ－ｍｏｄａｌ）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または核酸をコードする、ｇＲＮＡまたは核酸をコードする、または外因性ドナー核酸／修復テンプレート）に異なる薬力学また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、また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、自律複製また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およ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またはタンパク質の送達）。例えばｍＲＮＡまた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ることができる。このような一時的な送達は、オフターゲットの改変の可能性を減らすこともできる。
【０２６７】
インビボでの投与は、例えば、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、局所、鼻腔内、または筋肉内を含む任意の適切な経路によることができる。全身投与様式には、例えば、経口および非経口経路が含まれる。非経口経路の例には、静脈内、動脈内、骨内、筋肉内、皮内、皮下、鼻腔内、および腹腔内経路が含まれる。具体的な例は静脈内注入である。鼻腔内注入および硝子体内注射は、他の特定の例である。局所投与様式には、例えば、髄腔内、脳室内、実質内（例えば、線条体（例えば、尾状核または被殻へ）、大脳皮質、前中心回旋、海馬（例えば、歯状回またはＣＡ３領域）、側頭皮質、扁桃体、前頭皮質、視床、小脳、髄質、視床、視蓋、被殻、またはニグラ実質への局所的な実質内送達）、眼内、眼窩内、結膜下、硝子体内、網膜下、および強膜を介した経路が含まれる。（全身的アプローチと比較して）有意に少量の成分は、全身的に投与された場合（例えば、静脈内）と比較して、局所的に投与された場合（例えば、実質内または硝子体内）に効果を発揮し得る。局所投与様式はまた、治療有効量の成分が全身投与されるときに起こり得る潜在的に毒性の副作用の発生率を低減または排除し得る。
【０２６８】
インビボでの投与は、例えば、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、局所、鼻腔内、または筋肉内を含む任意の適切な経路によることができる。具体的な例は静脈内注入である。ガイドＲＮＡおよび／またはＣａｓタンパク質（またはガイドＲＮＡおよび／またはＣａｓタンパク質をコードする核酸）を含む組成物は、１つ以上の生理学的および薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤または助剤を使用して処方することができる。製剤は、選択した投与経路に依存する可能性がある。「薬学的に許容される」という用語は、担体、希釈剤、賦形剤、または補助剤が製剤の他の成分と適合性であり、そのレシピエントに実質的に有害ではないことを意味する。
【０２６９】

投与の頻度および投与回数は、他の要因の中でもとりわけ、外因性ドナー核酸またはガイドＲＮＡ、またはＣａｓタンパク質（またはガイドＲＮＡもしくはＣａｓタンパク質をコードする核酸）の半減期および投与経路に依存し得る。細胞または非ヒト動物への核酸またはタンパク質の導入は、ある期間にわたって１回または複数回実施することができる。例えば、導入は、ある期間にわたって少なくとも２回、ある期間にわたって少なくとも３回、ある期間にわたって少なくとも４回、ある期間にわたって少なくとも５回、ある期間にわたって少なくとも６回、ある期間にわたって少なくとも７回、ある期間にわたって少なくとも８回、ある期間にわたって少なくとも９回、ある期間にわたって少なくとも１０回、ある期間にわたって少なくとも１１回、ある期間にわたって少なくとも１２回、ある期間にわたって少なくとも１３回、ある期間にわたって少なくとも１４回、ある期間にわたって少なくとも１５回、ある期間にわたって少なくとも１６回、ある期間にわたって少なくとも１７回、ある期間にわたって少なくとも１８回、ある期間にわたって少なくとも１９回、またはある期間にわたって少なくとも２０回、実施することができる。

【０２７０】

Ｅ．インビボまたはエクスビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の送達、活性、または有効性の測定

本明細書に開示される方法は、ヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を検出または測定することをさらに含み得る。例えば、ヒトＴＴＲ標的化試薬がゲノム編集試薬（例えば、ヒトＴＴＲ遺伝子座を標的化するように設計されたＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ）である場合、測定は、改変のためのベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を評価することを含み得る。

【０２７１】

標的化遺伝子改変を有する細胞を同定するために様々な方法を使用することができる。スクリーニングは、親染色体の対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）を評価するための定量的アッセイを含むことができる。例えば、ＵＳ２００４／００１８６２６、ＵＳ２０１４／０１７８８７９、ＵＳ２０１６／０１４５６４６、ＷＯ２０１６／０８１９２３、およびＦｒｅｎｄｅｗｅｙ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．４７６：２９５－３０７を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、定量的アッセイは、リアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）などの定量的ＰＣＲを介して実施することができる。リアルタイムＰＣＲは、標的遺伝子座を認識する第１のプライマーセットおよび非標的参照遺伝子座を認識する第２のプライマーセットを利用することができる。プライマーセットは、増幅された配列を認識する蛍光プローブを含むことができる。好適な定量的なアッセイの他の例としては、蛍光媒介インサイチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）、比較ゲノムハイブリダイゼーション、等温ＤＮＡ増幅、固定化プローブすべてに対する定量的ハイブリダイゼーション、ＩＮＶＡＤＥＲ（登録商標）プローブ、ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）分子ビーコンプローブ、またはＥＣＬＩＰＳＥ（商標）プローブ技術が挙げられる（例えば、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、ＵＳ２００５／０１４４６５５を参照されたい）。

【０２７２】

次世代シーケンシング（ＮＧＳ）もスクリーニングに使用できる。次世代シーケンシングは、「ＮＧＳ」または「超並列シーケンシング」または「ハイスループットシーケンシング」と呼ばれることもある。ＮＧＳは、ＭＯＡアッセイに加えてスクリーニングツールとして使用して、標的となる遺伝子改変の正確な性質と、それが細胞型、組織型、または器官型間で一貫しているかどうかを定義できる。

【０２７３】

非ヒト動物におけるベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座の改変を評価することは、任意の組織または器官からの任意の細胞型にあり得る。例えば、評価は、同じ組織または器官からの複数の細胞型、または組織または器官内の複数の場所からの細胞で行うことができる。これは、標的組織または器官内のどの細胞型が標的化されているか、または組織または器官のどのセクションがヒト化ＴＴＲ標的化試薬によって到達されている

かについての情報を提供することができる。別の例として、評価は複数の種類の組織または複数の器官で行うことができる。特定の組織、器官、または細胞型が標的にされる方法では、これは、その組織または器官がどれほど効果的に標的にされるか、および他の組織または器官にオフターゲット効果があるかどうかについての情報を提供することができる。

【０２７４】

使用できるアッセイの一例は、無傷の固定組織との関連で、単一ヌクレオチドの変化を含む、細胞特異的に編集された転写物を定量化することができる方法である、ＲＮＡＳＣＯＰＥ（商標）およびＢＡＳＥＳＣＯＰＥ（商標）ＲＮＡインサイチュハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）アッセイである。ＢＡＳＥＳＣＯＰＥ（商標）ＲＮＡ　ＩＳＨアッセイは、遺伝子編集の特性評価においてＮＧＳおよびｑＰＣＲを補完することができる。ＮＧＳ／ｑＰＣＲは野生型および編集された配列の定量的平均値を提供できるが、組織内の編集された細胞の不均一性またはパーセンテージに関する情報は提供しない。ＢＡＳＥＳＣＯＰＥ（商標）ＩＳＨアッセイは、組織全体のランドスケープビューと、編集されたｍＲＮＡ転写物を含む標的組織内の実際の細胞数を定量化できる単一細胞分解能での野生型対編集された転写物の定量化とを提供できる。ＢＡＳＥＳＣＯＰＥ（商標）アッセイは、ペアオリゴ（「ＺＺ」）プローブを使用して非特異的なバックグラウンドなしでシグナルを増幅し、単一分子ＲＮＡ検出を実現する。しかしながら、ＢＡＳＥＳＣＯＰＥ（商標）プローブの設計とシグナル増幅システムにより、ＺＺプローブを使用した単一分子ＲＮＡの検出が可能になり、無傷の固定組織における単一ヌクレオチドの編集と変異を差次的に検出できる。

【０２７５】

試薬が、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を不活性化する、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座の発現に影響を与える、ヒト化ＴＴＲ　ｍＲＮＡの翻訳を防止する、またはヒト化ＴＴＲタンパク質を除去するように設計されている場合、測定にはヒト化ＴＴＲ　ｍＲＮＡまたはタンパク質発現の評価を含めることができる。この測定は、肝臓内または肝臓内の特定の細胞型または領域内で行うことができ、または分泌されたヒト化ＴＴＲタンパク質の血清レベルを測定することを含むことができる。

【０２７６】

ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲタンパク質の産生および分泌は、任意の既知の手段によって評価することができる。例えば、発現は、既知のアッセイを使用して、非ヒト動物の肝臓におけるコードされたｍＲＮＡのレベルまたは非ヒト動物の肝臓におけるコードされたタンパク質のレベルを測定することによって評価することができる。ヒト化ＴＴＲタンパク質の分泌は、既知のアッセイを使用して、非ヒト動物におけるコードされたヒト化ＴＴＲタンパク質の血漿レベルまたは血清レベルを測定することによって評価することができる。例えば、測定は、ヒトＴＴＲ標的化試薬が非ヒト動物のＴＴＲレベルを低下させるかどうかを決定することであり得る。

【０２７７】

測定はまた、ヒト化ＴＴＲタンパク質の凝集を評価することを含み得る。例えば、ネイティブＰＡＧＥおよびウエスタンブロットを使用して、凝集したヒト化ＴＴＲタンパク質（例えば、高分子量型のヒト化ＴＴＲタンパク質）の存在、およびヒトＴＴＲ標的化試薬が凝集を防ぎ、凝集を減らし、凝集を妨害し、またはヒト化ＴＴＲタンパク質の凝集形態のクリアランスを増加させるかどうかを評価できる。

【０２７８】

測定はまた、アミロイド沈着またはアミロイド沈着の存在（アミロイドーシス）を評価することを含み得る。例えば、測定は、ヒト－ＴＴＲ標的化試薬がアミロイド沈着を予防、減少、破壊、または除去するかどうかを決定することであり得る。実施例でのように、コンゴーレッドはアミロイドーシスを検出するために広く使用されている染色剤である。組織は、全体的な組織構造と特徴的な赤い染みを明らかにする白色光の下で画像化することができる。コンゴーレッド染色組織を線形偏光を使用して照射すると、アミロイドに結合した色素のみが偏光を屈折させ（例えば、アミロイドに結合したコンゴーレッド色素は

複屈折性になる）、これは薄緑色／白色として表示される。これらの緑がかった白色の沈着物の存在は、アミロイド沈着を示している。このようなアッセイは、ヒトＴＴＲ標的化試薬がアミロイド沈着を予防または低減または破壊または除去するかどうかを評価するために使用できる。評価は、ＴＴＲアミロイド沈着が発生する任意の組織または器官で行うことができる。非限定的な例の１つとして、評価は坐骨神経で行うことができる。

【０２７９】

測定はまた、非ヒト動物における活動量または活動亢進レベルを評価することを含み得る。例えば、測定は、ヒト－ＴＴＲ標的化試薬が非ヒト動物の活動亢進を予防または低減するかどうかを決定することであり得る。活動亢進は、オープンフィールド試験で総距離、総活動量、および総立ち上がりのうちの１つ以上またはすべてを測定することによって評価できる。オープンフィールド試験は、マウスの移動と活動亢進の全体的な測定値を提供する。オープンフィールド試験からの読み取り値のうちの３つは、総移動距離、総活動量、および立ち上がりの総数である。オープンフィールドは、６０分間のマウスの一般的な運動の健康と活動を測定するために使用される行動テストである。マウスは、６０分間、密閉された正方形の装置内を移動する総距離を追跡される。総活動量は、装置内のマウスがＸ面とＹ面の赤外線ブリームの経路を遮断した回数によって測定される。立ち上がりは、マウスが装置の壁を探索するために後肢に立つ回数の尺度である。立ち上がり値が大きいほど、不安が少なく、活動亢進のマウスを示す。立ち上がりは、Ｚ平面（四脚マウスよりも高い高さに配置されたビーム）での赤外線ビーム遮断によって測定される。

【０２８０】

評価はまた、ジストニアまたはジストニア表現型の存在を評価することを含み得る。例えば、評価は、作業例に記載されているように、非ヒト動物が後肢ジストニアまたは後肢ジストニア表現型（例えば、ジストニア性後肢収縮）を示すかどうかを評価することを含み得る。例えば、測定は、ヒトＴＴＲ標的化試薬がそのような表現型を改善するかまたは防止するかどうかを決定することであり得る。

【０２８１】

これらの表現型のいずれかの評価は、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２ヶ月齢など、非ヒト動物の任意の年齢で行うことができる。特定の例では、非ヒト動物は少なくとも約２ヶ月齢である可能性がある。

【０２８２】

これらの表現型のいずれかの評価は、対照の非ヒト動物と比較して行うことができる。対照の非ヒト動物の一例は、対応する野生型動物（例えば、同じ種のもの）である。例えば、対照の非ヒト動物は、野生型の同腹仔であり得る。対照の非ヒト動物の別の例は、ベータスリップ変異のないヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む対応する非ヒト動物である（例えば、ヒト化ＴＴＲ遺伝子座は、ベータスリップ変異がないことを除いて同一である）。対照の非ヒト動物は、例えば、試験非ヒト動物と同じ年齢および／または試験非ヒト動物と同じ性別であり得る。これらの表現型のいずれかの評価は、ヒトＴＴＲ標的化試薬で処置されていないことを除いて、試験非ヒト動物と同一である対照非ヒト動物と比較して行うこともできる。

【０２８３】

これらの表現型のいずれかの評価は、単一の非ヒト動物で行うことができ、その非ヒト動物の変化を評価することができる。あるいは、評価は、非ヒト動物の集団で行われ、例えば、特定の表現型を有する非ヒト動物のパーセンテージを比較することができる。一例として、評価は、対照集団（ヒトＴＴＲ標的化試薬で処置されていない）と比較した、試験集団（ヒトＴＴＲ標的化試薬で処置した）におけるアミロイド沈着を有するかまたはジストニック表現型を有する非ヒト動物のパーセンテージを評価することを含み得る。

【０２８４】

ＩＶ．ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物を作製する方法

本明細書の他の場所に開示されるように、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物を作製するための様々な方法が提供される。遺伝子改変された生物

を産生するための任意の便利な方法またはプロトコルは、そのような遺伝子改変された非ヒト動物を産生するのに適している。例えば、Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．（２００９）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ４２：１９．１１：１９．１１．１－１９．１１．２２およびＧａｍａ Ｓｏｓａ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｂｒａｉｎ Ｓｔｒｕｃｔ．Ｆｕｎｃｔ．２１４（２－３）：９１－１０９を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような遺伝子改変された非ヒト動物は、例えば、標的化Ｔｔｒ遺伝子座での遺伝子ノックインを介して生成することができる。

【０２８５】

例えば、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物を作製する方法は、（１）ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含むように多能性細胞のゲノムを改変することと、（２）ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む遺伝子改変された多能性細胞を同定または選択することと、（３）遺伝子改変された多能性細胞を非ヒト動物宿主胚に導入することと、（４）代理母に宿主胚を着床させて懐胎させることと、を含むことができる。あるいは、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む非ヒト動物を作製する方法は、（１）ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含むように多能性細胞のゲノムを改変することと、（２）ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む遺伝子改変された多能性細胞を同定または選択することと、（３）遺伝子改変された多能性細胞を非ヒト動物宿主胚に導入することと、（４）代理母の宿主胚を懐胎させることと、を含むことができる。任意選択で、改変された多能性細胞（例えば、非ヒトＥＳ細胞）を含む宿主胚は、Ｆ０非ヒト動物を産生するために代理母に着床させおよび懐胎させる前に胚盤胞段階までインキュベートされ得る。次に、代理母は、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含むＦ０世代の非ヒト動物を産生することができる。

【０２８６】

この方法は、改変された標的ゲノム遺伝子座（すなわち、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座）を有する細胞または動物を同定することをさらに含み得る。標的化遺伝子改変を有する細胞を同定するために様々な方法を使用することができる。

【０２８７】

スクリーニングステップは、例えば、親染色体の対立遺伝子の改変（ＭＯＡ）を評価するための定量的アッセイを含むことができる。例えば、定量的アッセイは、リアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）などの定量的ＰＣＲを介して実施することができる。リアルタイムＰＣＲは、標的遺伝子座を認識する第１のプライマーセットおよび非標的参照遺伝子座を認識する第２のプライマーセットを利用することができる。プライマーセットは、増幅された配列を認識する蛍光プローブを含むことができる。

【０２８８】

好適な定量的なアッセイの他の例としては、蛍光媒介インサイチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）、比較ゲノムハイブリダイゼーション、等温ＤＮＡ増幅、固定化プローブに対する定量的ハイブリダイゼーション、ＩＮＶＡＤＥＲ（登録商標）プローブ、ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）分子ビーコンプローブ、またはＥＣＬＩＰＳＥ（商標）プローブ技術が挙げられる（例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、ＵＳ２００５／０１４４６５５を参照されたい）。

【０２８９】

適切な多能性細胞の例は、胚性幹（ＥＳ）細胞（例えば、マウスＥＳ細胞またはラットＥＳ細胞）である。改変された多能性細胞は、例えば、（ａ）５’および３’標的部位に対応する５’および３’相同性アームに隣接する挿入核酸を含む１つ以上の標的化ベクターを細胞に導入することであって、挿入核酸は、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む、導入することと、（ｂ）ゲノムに内因性Ｔｔｒ遺伝子座に組み込まれた挿入核酸を含む少なくとも１つの細胞を同定することと、による組換えによって生成することができる。あるいは、改変された多能性細胞は、（ａ）細胞に（ｉ）ヌクレアーゼ剤であ

って、内因性Ｔｔｒ遺伝子座内の標的配列でニックまたは二本鎖切断を誘導する、ヌクレアーゼ剤と、（ｉｉ）ヌクレアーゼ標的配列に十分に近接して位置する５’および３’標的部位に対応する５’および３’相同性アームに隣接する挿入核酸を含む１つ以上の標的化ベクターであって、挿入核酸はベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む、標的化ベクターと、を導入することと、（ｃ）内因性Ｔｔｒ遺伝子座に改変（例えば、挿入核酸の組み込み）を含む少なくとも１つの細胞を同定することと、によって生成され得る。ニックまたは二本鎖切断を所望の標的配列に誘導する任意のヌクレアーゼ剤を使用することができる。適切なヌクレアーゼの例には、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、メガヌクレアーゼ、およびクラスター化された規則的に散在する短いパリンドロームリピート（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐｅｒｓｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔｓ）（ＣＲＩＳＰＲ）／ ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）システムまたはそのような成分が含まれるシステム（例：ＣＲＩＳＰＲ ／ Ｃａｓ９）が含まれる。例えば、ＵＳ２０１５／０３０９６７０およびＵＳ２０１５／０１５９１７５を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２９０】

ドナー細胞は、胚盤胞期または前桑実胚期（ｐｒｅ－ｍｏｒｕｌａ ｓｔａｇｅ）（すなわち、４細胞期または８細胞期）などの任意の段階で宿主胚に導入することができる。生殖細胞系列を介して遺伝子改変を伝達することができる子孫が生成される。例えば、米国特許第７，２９４，７５４を参照されたく、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２９１】

あるいは、本明細書の他の場所に記載の非ヒト動物を作製する方法は、（１）多能性細胞を改変するための上記の方法を使用して、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含むように１細胞期胚のゲノムを改変することと、（２）遺伝子改変された胚を選択することと、（３）代理母に遺伝子改変された胚を着床させて懐胎させることと、を含むことができる。あるいは、本明細書の他の場所に記載の非ヒト動物を作製する方法は、（１）多能性細胞を改変するための上記の方法を使用して、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含むように１細胞期胚のゲノムを改変することと、（２）遺伝子改変された胚を選択することと、（３）代理母に遺伝子改変された胚を懐胎させることと、を含むことができる。生殖細胞系列を介して遺伝子改変を伝達することができる子孫が生成される。

【０２９２】

核移植技術はまた、非ヒト哺乳動物を生成するために使用することができる。簡単に言えば、核移植の方法は、（１）卵母細胞を除核するか、または除核された卵母細胞を提供するステップと、（２）除核した卵母細胞と組み合わせるドナー細胞または核を単離または提供するステップと、（３）細胞または核を除核した卵母細胞に挿入して、再構成された細胞を形成するステップと、（４）再構成された細胞を動物の子宮に着床させて胚を形成するステップと、（５）胚の発育させるステップと、を含めることができる。このような方法では、卵母細胞は一般に死亡した動物から回収されるが、生きている動物の卵管および／または卵巣からも単離され得る。卵母細胞は、除核前に様々なよく知られた培地で成熟させることができる。卵母細胞の除核は、多くのよく知られた方法で行うことができる。再構成された細胞を形成するための除核卵母細胞へのドナー細胞または核の挿入は、融合の前に透明帯の下にドナー細胞をマイクロインジェクションすることによって行うことができる。融合は、接触／融合面を横切るＤＣ電気パルスの印加（電気融合）、ポリエチレングリコールなどの融合促進化学物質への細胞の曝露、またはセンダイウイルスなどの不活化ウイルスによって誘発され得る。再構成された細胞は、核のドナーとレシピエントの卵母細胞の融合の前、最中、および／または後に、電気的および／または非電気的手段によって活性化することができる。活性化方法には、電気パルス、化学的に誘発されたショック、精子による浸透、卵母細胞における二価カチオンのレベルの増加、および卵母

細胞における細胞タンパク質のリン酸化の低減（キナーゼ阻害剤による）が含まれる。活性化された再構成された細胞、または胚は、よく知られた培地で培養され、次に動物の子宮に移され得る。例えば、ＵＳ２００８／００９２２４９、ＷＯ１９９９／００５２６６、ＵＳ２００４／０１７７３９０、ＷＯ２００８／０１７２３４、および米国特許第７，６１２，２５０号を参照されたく、これらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２９３】

本明細書で提供される様々な方法は、遺伝子改変された非ヒトＦ０動物の生成を可能にし、遺伝子改変されたＦ０動物の細胞は、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を含む。Ｆ０動物を生成するために使用される方法に応じて、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座を持つＦ０動物内の細胞の数は異なる。例えば、ＶＥＬＯＣＩＭＯＵＳＥ（登録商標）方法を介して、対応する生物からの前桑実胚期の胚（例えば、８細胞期マウス胚）にドナーＥＳ細胞の導入することにより、Ｆ０動物の細胞集団のより大きな割合が、標的化遺伝子改変を含む目的のヌクレオチド配列を有する細胞を含むことを可能にする。例えば、非ヒトＦ０動物の細胞寄与の少なくとも５０％、６０％、６５％、７０％、７５％、８５％、８６％、８７％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％が、標的化改変を有する細胞集団を含むことができる。

【０２９４】

遺伝子改変されたＦ０動物の細胞は、ベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座に対してヘテロ接合性であり得るか、またはベータスリップ変異を含むヒト化ＴＴＲ遺伝子座に対してホモ接合性であり得る。

【０２９５】

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

【０２９６】

配列の簡単な説明

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

【表２－１】

表２．配列の説明

配列番号	タイプ	説明
1	タンパク質	ヒトTTRタンパク質NP_000362.1およびP02766.1
2	DNA	ヒトTTR mRNA NM_000371.3
3	DNA	ヒトTTR遺伝子NG_009490.1
4	DNA	ヒトTTR CDS
5	タンパク質	マウスTTRタンパク質P07309.1およびNP_038725.1
6	DNA	マウスTtr mRNA NM_013697.5
7	DNA	マウスTtr遺伝子NC_000084.6
8	DNA	マウスTTR CDS
9	DNA	ヒトTTRベータスリップタンパク質
10	DNA	ヒトTTRベータスリップCDS
11	DNA	マウスTtr遺伝子座-開始コドンから終止コドン
12	DNA	予想されるベータスリップTTRヒト化型-F0、SDC Puroカセット付き
13	DNA	予想されるベータスリップTTRヒト化-F1、カセット-削除
14	DNA	ヒト化ベータスリップTTRに挿入されたヒトTTR配列
15	DNA	予想されるWT TTRヒト化-F0、SDC Neoカセット付き
16	DNA	予想されるWT TTRヒト化-F1、カセット-削除
17	DNA	ヒト化WT TTRに挿入されたヒトTTR配列
18	DNA	9090retU3-Fプライマー
19	DNA	9090retU2-Fプライマー
20	DNA	9090retU-Fプライマー
21	DNA	9090mTGU-Fプライマー
22	DNA	7576mTU-Fプライマー
23	DNA	9090mTM-Fプライマー
24	DNA	7576mTD-Fプライマー
25	DNA	9090mTGD-Fプライマー
26	DNA	9090retD-Fプライマー
27	DNA	9090retD2-Fプライマー
28	DNA	9090retD3-Fプライマー
29	DNA	7576hTU-Fプライマー
30	DNA	7576hTD-Fプライマー
31	DNA	Puro-Fプライマー
32	DNA	7655hTU-Fプライマー
33	DNA	9212mTU-Fプライマー
34	DNA	9212mTGD-Fプライマー
35	DNA	7655mTU-Fプライマー
36	DNA	7655mTD-Fプライマー
37	DNA	9204mretD-Fプライマー
38	DNA	9204mretU-Fプライマー
39	DNA	4552mTU-Fプライマー
40	DNA	9090retU3-Rプライマー
41	DNA	9090retU2-Rプライマー
42	DNA	9090retU-Rプライマー
43	DNA	9090mTGU-Rプライマー
44	DNA	7576mTU-Rプライマー
45	DNA	9090mTM-Rプライマー
46	DNA	7576mTD-Rプライマー

【表２－２】

配列番号	タイプ	説明
47	DNA	9090mTGD-R プライマー
48	DNA	9090retD-R プライマー
49	DNA	9090retD2-R プライマー
50	DNA	9090retD3-R プライマー
51	DNA	7576hTU-R プライマー
52	DNA	7576hTD-R プライマー
53	DNA	Puro-R プライマー
54	DNA	7655hTU-R プライマー
55	DNA	9212mTU-R プライマー
56	DNA	9212mTGD-R プライマー
57	DNA	7655mTU-R プライマー
58	DNA	7655mTD-R プライマー
59	DNA	9204mretD-R プライマー
60	DNA	9204mretU-R プライマー
61	DNA	4552mTU-R プライマー
62	DNA	9090retU3-プローブ
63	DNA	9090retU2-プローブ
64	DNA	9090retU-プローブ
65	DNA	9090mTGU-プローブ
66	DNA	7576mTU-プローブ
67	DNA	9090mTM-プローブ
68	DNA	7576mTD-プローブ
69	DNA	9090mTGD-プローブ
70	DNA	9090retD-プローブ
71	DNA	9090retD2-プローブ
72	DNA	9090retD3-プローブ
73	DNA	7576hTU-プローブ
74	DNA	7576hTD-プローブ
75	DNA	Puro-プローブ
76	DNA	7655hTU-プローブ
77	DNA	9212mTU-プローブ
78	DNA	9212mTGD-プローブ
79	DNA	7655mTU-プローブ
80	DNA	7655mTD-プローブ
81	DNA	9204mretD-プローブ
82	DNA	9204mretU-プローブ
83	DNA	4552mTU-プローブ
84	RNA	crRNA テール
85	RNA	tracrRNA
86	RNA	ジェネリックガイド RNA 足場 v1
87	RNA	ジェネリックガイド RNA 足場 v2
88	RNA	ジェネリックガイド RNA 足場 v3
89	RNA	ジェネリックガイド RNA 足場 v4
90	DNA	ジェネリックガイド RNA 認識配列+PAM v1
91	DNA	ジェネリックガイド RNA 認識配列+PAM v2
92	DNA	ジェネリックガイド RNA 認識配列+PAM v3

【実施例】

【０２９７】

実施例１．ヒト化ＴＴＲベータスリップ遺伝子座を含むマウスの生成

作成されたヒト化Ｔｔｒ対立遺伝子は、マウスのトランスサイレチンコード配列の完全な欠失と、ヒトＴＴＲ遺伝子のオーソロガス部分による置換であった。ヒトＴＴＲ遺伝子のオーソロガス部分は、ＴＴＲ複合体の分子間相互作用に関与するベータシートの位置をシフトし、ＴＴＲを特に凝集しやすくする３つの点変異（Ｇ５３Ｓ、Ｅ５４Ｄ、およびＬ５５Ｓ、まとめてＴＴＲベータスリップと呼ばれる）をコードしていた。ベータスリップ変異によって形成されるＴＴＲ複合体の相互作用の変化は、プロトフィブリルおよびアミ

ロイドの形成をもたらし（例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｅｎｅｑｖｉｓｔ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ ６（５）：１２０７－１２１８を参照されたい）、ＩＭＲ－３２細胞株に対して毒性があると報告されている（例えば、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ａｎｄｅｒｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２０１３）ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ８（２）：ｅ５５７６６を参照されたい）。ただし、これらの変異はインビボでモデル化されたことはない。

【０２９８】

マウスＴｔｒ開始コドンの上流にある３３．７ｋｂの配列とマウスＴｔｒ終止コドンの下流にある３４．５ｋｂの配列を含む５’相同性アームを含む大きな標的ベクターを生成して、マウスＴｔｒ開始コドンからマウスＴｔｒ終止コドンまでの約８．３ｋｂの領域を、ヒトＴＴＲ開始コドンから最後のヒトＴＴＲエキソン（ヒト３’ＵＴＲを含むエキソン４）の終わりまでの約７．１ｋｂのオーソロガスなヒトＴＴＲ配列およびｌｏｘＰ部位に隣接する自己欠失型ピューロマイシン選択カセット（ＳＤＣ Ｐｕｒｏ）で置換した。図３を参照されたい。ＳＤＣ Ｐｕｒｏカセットには、５’から３’までの次の構成要素が含まれている：ｌｏｘＰ部位、マウスプロタミン（Ｐｒｍ１）プロモーター、Ｃｒｅｉ（イントロンを含むように最適化されたＣｒｅコード配列）、ｐｏｌｙＡ、ヒトユビキチンプロモーター、ピューロマイシン－Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ（$puro_r$）コード配列、ｐｏｌｙＡ、ｌｏｘＰ。ヒト化対立遺伝子を生成するために、ＣＲＩＳＰＲ ／ Ｃａｓ９構成要素を大きな標的化ベクターとともにＦ１Ｈ４マウス胚性幹細胞に導入した。マウスＴｔｒ対立遺伝子のヒト化を確認するために、図４および表３に記載したプライマーとプローブを使用した対立遺伝子喪失（Ｌｏｓｓ－ｏｆ－ａｌｌｅｌｅ）アッセイ、対立遺伝子獲得（ｇａｉｎ－ｏｆ－ａｌｌｅｌｅ）アッセイ、保持アッセイ、およびＣＲＩＳＰＲアッセイを実行した。対立遺伝子喪失、対立遺伝子獲得アッセイ、および保持アッセイは、に記載されている例えば、ＵＳ２０１４／０１７８７９、ＵＳ２０１６／０１４５６４６、ＷＯ２０１６／０８１９２３、およびＦｒｅｎｄｅｗｅｙ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．４７６：２９５－３０７を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲアッセイは、ＣＲＩＳＰＲ ｇＲＮＡによって破壊される領域をカバーするように設計されたＴＡＱＭＡＮ（登録商標）アッセイである。ＣＲＩＳＰＲ ｇＲＮＡが切断され、インデル（挿入または欠失）が作成されると、ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）アッセイは増幅に失敗するため、ＣＲＩＳＰＲ切断を報告する。ＳＤＣ Ｐｕｒｏカセットを使用したバージョンとＳＤＣ Ｐｕｒｏカセットを切除した後のバージョンを図３に示す。Ｆ０マウスはその後ＶＥＬＯＣＩＭＯＵＳＥ（登録商標）法を使用して生成された。例えば、ＵＳ７，５７６，２５９、ＵＳ７，６５９，４４２、ＵＳ７，２９４，７５４、ＵＳ２００８／００７８００、およびＰｏｕｅｙｍｉｒｏｕ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２５（１）：９１－９９を参照されたく、それらの各々は、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２９９】

Ｆ０世代のマウス（５０％Ｃ５７ＢＬ／６ＮＴａｃおよび５０％１２９Ｓ６／ＳｖＥｖＴａｃ）は、複数のヒト化ＥＳ細胞クローンから生成された。Ｆ０世代マウスで予想されるヒト化ＴＴＲベータスリップ遺伝子座の配列は、配列番号１２に記載されており、ＳＤＣ Ｐｕｒｏカセット（ＭＡＩＤ８５３０と呼ばれる）が含まれている。次に、Ｆ１およびＦ２世代のマウス（７５％Ｃ５７ＢＬ／６ＮＴａｃおよび２５％１２９Ｓ６／ＳｖＥｖＴａｃ）を繁殖によって生成した。Ｆ１およびＦ２世代マウスで予想されるヒト化ＴＴＲベータスリップ遺伝子座の配列は、配列番号１３に記載されており、ＳＤＣ Ｐｕｒｏカセット（ＭＡＩＤ８５３１と呼ばれる）は含まれていない。以下の実験で特徴づけられたすべてのヒト化ＴＴＲベータスリップマウスは$TTR^{8531/8531}$であった（両方のヒト化ＴＴＲベータスリップ対立遺伝子でカセットが除去された）。

【０３００】

対応するヒト化ＴＴＲ野生型マウスは、ＳＤＣ　Ｎｅｏカセットを使用する以外は同じ方法で作成された。Ｆ０世代マウスにおける予想されるヒト化マウスＴｔｒ野生型遺伝子座の配列は、配列番号１５に記載されており、ＳＤＣ　Ｎｅｏカセット（７５７６と呼ばれる）を含む。次に、Ｆ１およびＦ２世代のマウス（７５％Ｃ５７ＢＬ／６ＮＴａｃおよび２５％１２９Ｓ６／ＳｖＥｖＴａｃ）を繁殖によって生成した。Ｆ１およびＦ２世代マウスにおける予想されるヒト化マウスＴｔｒ野生型遺伝子座の配列は、配列番号１６に記載されており、ＳＤＣ　Ｎｅｏカセット（ＭＡＩＤ７５７７と呼ばれる）を含まない。以下の実験で特徴づけられたすべてのヒト化ＴＴＲ野生型マウスはＴＴＲ$^{７５７７／７５７７}$であった（両方のヒト化ＴＴＲ野生型対立遺伝子でカセットが除去された）。

【０３０１】

マウストランスサイレチン前駆体タンパク質、ヒト野生型トランスサイレチン前駆体タンパク質、およびヒトベータスリップトランスサイレチン前駆体タンパク質配列の比較を図１Ａに示す。マウストランスサイレチン、ヒト野生型トランスサイレチン、およびヒトベータスリップトランスサイレチンコード配列の比較を図１Ｂに示す。野生型マウスＴｔｒ遺伝子座、最終野生型ヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座（ＳＤＣ　Ｎｅｏカセットを削除）、および最終ベータスリップヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座（ＳＤＣ　Ｐｕｒｏカセットを削除）を示す概略図を図２に示す。開始コドンから終止コドンまでの内因性マウスＴｔｒ遺伝子座配列は、配列番号１１に提示される。内因性マウスＴｔｒ遺伝子座のコード配列は配列番号８に提示される。内因性マウスＴｔｒ遺伝子座によってコードされるトランスサイレチン前駆体タンパク質は、配列番号５に提示される。ＳＤＣ　Ｎｅｏカセットがある場合とＳＤＣ　Ｎｅｏカセットがない場合の予想される野生型ヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座の配列は、それぞれ配列番号１５および１６に記載される。野生型ヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座の予想されるコード配列（ＣＤＳ）は、配列番号４に記載される。野生型ヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座によってコードされる予想されるトランスサイレチン前駆体タンパク質は、配列番号１に記載される。ＳＤＣ　Ｐｕｒｏカセットがある場合とない場合の予想されるベータスリップヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座の配列は、それぞれ配列番号１２および１３に記載される。ベータスリップヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座の予想されるコード配列（ＣＤＳ）は、配列番号１０に記載される。ベータスリップヒト化マウスＴｔｒ遺伝子座によってコードされる予想されるトランスサイレチン前駆体タンパク質は、配列番号９に記載される。これらの対立遺伝子は、ヒトＴＴＲ治療薬の真のヒト標的を提供し、それにより、変異したヒトタンパク質が存在する唯一のバージョンのＴＴＲである状況で、生きている動物における治療薬の有効性と作用機序のテスト、および薬物動態学と薬力学の研究を可能にする。

【表３－１】

表３．対立遺伝子喪失アッセイ、対立遺伝子獲得アッセイ、および保持アッセイ用のプライマーおよびプローブ

アッセイ	フォワードプライマー	リバースプライマー	プローブ
9090retU3	CACAGACAATCAGACGTACCAGTA (配列番号 18)	GGGACATCTCGGTTTCCTGACTT (配列番号 40)	TCATGTAATCTGGCTTCAGAGTGGGA (配列番号 62)
9090retU2	CCAGCTTTGCCAGTTTACGA (配列番号 19)	TCCACACTACTGAACTCCACCAA (配列番号 41)	TGGGAGGCAATTCTTAGTTTCAATGGA (配列番号 63)
9090retU	TTGGACGGTTGCCCTCTT (配列番号 20)	CGGAACACTCGCTCTACGAAA (配列番号 42)	TCCCAAAGGTGTCTGTCTGCACA (配列番号 64)
9090mTGU	GATGGCTTCCCTTCGACTCTTC (配列番号 21)	GGGCCAGCTTCAGACACA (配列番号 43)	CTCCTTTGCCTCGCTGGACTGG (配列番号 65)
7576mTU	CACTGACATTTCTCTTGTCTCCTCT (配列番号 22)	CCCAGGGTGCTGGAGAATCCAA (配列番号 44)	CGGACAGCATCCAGGACTT (配列番号 66)
9090mTM	GGGCTCACCACAGATGAGAAG (配列番号 23)	GCCAAGTGTCTTCCAGTACGAT (配列番号 45)	AGAAGGAGTGTACAGAGTAGAACTGGACA (配列番号 67)
7576mTD	CACTGTTCGCCACAGGTCTT (配列番号 24)	GTTCCCTTTCTTGGGTTCAGA (配列番号 46)	TGTTTGTGGGTGTCAGTGTTTCTACTC (配列番号 68)
9090mTGD	GCTCAGCCCATACTCCTACA (配列番号 25)	GATGCTACTGCTTTGGCAAGATC (配列番号 47)	CACCACGGCTGTCGTCAGCAA (配列番号 69)
9090retD	GCCCAGGAGGACCAGGAT (配列番号 26)	CCTGAGCTGCTAACACGGTT (配列番号 48)	CTTGCCAAAGCAGTAGCATCCCA (配列番号 70)
9090retD2	GGCAACTTGCTTGAGGAAGA (配列番号 27)	AGCTACAGACCATGCTTAGTGTA (配列番号 49)	AGGTCAGAAAGCAGAGTGGACCA (配列番号 71)
9090retD3	GCAGCAACCCAGCTTCACTT (配列番号 28)	TGCCAGTTTAGGAGGAATATGTTC (配列番号 50)	CCCAGGCAATTCCTACCTTCCCA (配列番号 72)
7576hTU	ACTGAGCTGGGACTTGAAC (配列番号 29)	CTGAGGAAACAGAGGTACCAGATAT (配列番号 51)	TCTGAGCATTCTACCTCATTGCTTTGGT (配列番号 73)
7576hTD	TGCCTCACTCTGAGAACCA (配列番号 30)	AGTCACACAGTTCTGTCAAATCAG (配列番号 52)	AGGCTGTCCCAGCACCTGAGTCG (配列番号 74)
Puro	CGCAACCTCCCCTTCTACG (配列番号 31)	GTCCTTCGGGCACCTCG (配列番号 53)	CGGCTCGGCTTCACCGTCACC (配列番号 75)
7655hTU	GGCCGTGCATGTGTTCAG (配列番号 32)	TCCTGTGGGAGGGTTCTTTG (配列番号 54)	AAGGCTGCTGATGACACCTGGGA (配列番号 76)
9212mTU	GGTTCCCATTTGCTCTTATTCGT (配列番号 33)	CCCTCTCTCTGAGCCCTCTA (配列番号 55)	AGATTCAGACACACACAACTTACCAGC (配列番号 77)

【表３－２】

アッセイ	フォワードプライマー	リバースプライマー	プローブ
9212mTGD	CCCACACTGCAGAAGGAAACTTG (配列番号 34)	GCTGCCTAAGTCTTTGGAGCT (配列番号 56)	AGACCTGCAATTCTCTAAGAGCTCCACA (配列番号 78)
7655mTU	GGTTCCCATTTGCTCTTATTCGT (配列番号 35)	CCCTCTCTCTGAGCCCTCTA (配列番号 57)	AGATTCAGACACACACAACTTACCAGC (配列番号 79)
7655mTD	CCAGCTTAGCATCCTGTGAACA (配列番号 36)	GAGAGGAGAGACAGCTAGTTCTAAC (配列番号 58)	TTGTCTGCAGCTCCTACCTCTGGG (配列番号 80)
9204mretD	GGCAACTTGCTTGAGGAAGA (配列番号 37)	AGCTACAGACCATGCTTAGTGTA (配列番号 59)	AGGTCAGAAAGCAGAGTGGACCA (配列番号 81)
9204mretU	TGTGGAGTTCAGTAGTGTGGAG (配列番号 38)	GCCCTCTTCATACAGGAATCAC (配列番号 60)	TTGACATGTGTGGGTGAGAGATTTTACTG (配列番号 82)
4552mTU	CACTGACATTTCTCTTGTCTCCTCT (配列番号 39)	CGGACAGCATCCAGGACTT (配列番号 61)	CCCAGGGTGCTGGAGAATCCAA (配列番号 83)

【０３０２】

実施例２．ヒト化ＴＴＲベータスリップ遺伝子座を含むマウスの特性評価。

ヒト化ＴＴＲベータスリップマウスコロニーが確立され、Ｆ２コホートは２ヶ月齢で特徴づけられた。ヒトＴＴＲは血清で測定され、０．３μｇ／ｍＬで検出されたが、これは、対照の野生型マウスの血清（約１０００μｇ／ｍＬのマウスＴＴＲ）またはヒトで循環している血清（約２００μｇ／ｍＬ）で通常検出されるレベルよりも大幅に低いレベルである。また、ヒト化ＴＴＲ野生型マウスで見られるレベルよりも低くなっている。図５Ａおよび表４を参照されたい。

【表４】

表４．ヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、および対照Ｆ１Ｈ４マウスの血漿ＴＴＲレベル、血清Ｔ４レベル、および体温

系統	hTTR、μg/mL(SD)	mTTR、μg/mL(SD)	総 T4、ng/mL(SD)	遊離 T4、ng/mL(SD)	体温、℃(SD)
F1H4	N.D.	約 800	158.6(20.85)	423.1(6.93)	36.95(0.55)
WT $hTTR^{7577/7577}$	52.07(10.67)	N.D.	66.88(18)	286.8(51.19)	36.7(0.44)
β-スリップ $hTTR^{8531/8531}$	0.291(0.083)	N.D.	51.19(34.09)	250.9(36.76)	36.79(0.84)
ヒト血清	234.5(データなし)	N.D.	64.71(データなし)	423.1(データなし)	N.D.

【０３０３】

ヒト化ＴＴＲベータスリップマウスの血液をネイティブＰＡＧＥで分析した後、抗ヒト特異的抗体を用いたウエスタンブロットを行ったところ、予想通りＴＴＲが観察された。図６Ａを参照されたい。ヒト成熟ＷＴ　ＴＴＲ（ｐＩ：５．３１、ＭＷ：１３．７６ｋＤａ）とヒト成熟ベータスリップＴＴＲ（ｐＩ：５．３０／ＭＷ：１３．７５ｋＤａ）の分子量はほぼ同じである。ヒト化ＴＴＲベータスリップマウスの血液をネイティブＰＡＧＥで分析した後、抗ヒト特異的抗体を用いたウエスタンブロットを行ったところ、高分子量のＴＴＲ種がヒト化ＴＴＲベータスリップマウスの血清中に観察されたが、対応するヒト化ＴＴＲ野生型マウスでは観察されなかった。図６Ｂを参照されたい。

【０３０４】

循環ＴＴＲのレベルが低いにもかかわらず、行動アッセイでテストした場合、ヒト化Ｔ

ＴＲベータスリップマウスには表現型の違いがあった。図８Ａ～８Ｃを参照されたい。１つのアッセイは、マウスの移動と活動亢進の全体的な測定値を与えるオープンフィールド試験である。オープンフィールド試験からの読み取り値の３つは、総移動距離、総活動量、および立ち上がり総数の測定値であり、これらはヒト化ＴＴＲ　ＷＴマウスまたは同腹仔（Ｆ１Ｈ４）対照と比較した場合、ヒト化ＴＴＲベータスリップマウスでそれぞれ有意に増加した。それぞれ図８Ａ、８Ｂ、および８Ｃを参照されたい。それぞれ表５、６、および７も参照されたい。オープンフィールドは、６０分間のマウスの一般的な運動の健康と活動を測定するために使用される行動テストである。マウスは、コンピューターソフトウェア（Ｋｉｎｄｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＭｏｔｏｒＭｏｎｉｔｏｒソフトウェア、Ｋｉｎｄｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｐｏｗａｙ，ＣＡ）を使用して、密閉された正方形の装置内を６０分間移動した総距離を追跡した。総活動量は、装置内のマウスがＸ面とＹ面の赤外線ブリームの経路を遮断した回数（つまり、「ビーム遮断（ｂｅａｍ　ｂｒｅａｋ）」）によって測定された。立ち上がりは、装置の壁を探索するためにマウスが後肢（すなわち「後部」）で立った回数の尺度であった。立ち上がり値が大きいほど、不安が少なく、より活動的なマウスを示す。立ち上がりは、Ｚ平面（四脚マウスよりも高い高さに配置されたビーム）での赤外線ビーム遮断によって測定された。

【表５】

表５．ヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、およびコントロールＦ１Ｈ４マウスのオープンフィールド試験における総距離

	F1H4, cm(SD)	WT hTTR$^{7577/7577}$ cm(SD)	β-スリップ hTTR$^{8531/8531}$ cm(SD)
総距離	10240(3399)	9863 (4134)	16052(2146)**

**=p<0.01 対 F1H4、および対 WT hTTR$^{7577/7577}$(ANOVA、Tukey)

【表６】

表６．ヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、およびコントロールＦ１Ｈ４マウスの総活動量

	F1H4 n(SD)	WT hTTR$^{7577/7577}$ n(SD)	β-スリップ hTTR$^{8531/8531}$ n(SD)
総活動量 (ビーム遮断)	4217(1306)	3470(1856)	6717(872.2)

【表７】

表７．ヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、およびコントロールＦ１Ｈ４マウスの総立ち上がり

	F1H4 n(SD)	WT hTTR$^{7577/7577}$ n(SD)	β-スリップ hTTR$^{8531/8531}$ n(SD)
立ち上がり	174.2(77.7)	153.3 (121.2)	497.8(125.2)***

***=p<0.001 対 F1H4 および、対 WT hTTR$^{7577/7577}$(ANOVA、Tukey)

【０３０５】

活動亢進の増加は、ＴＴＲヌルマウスで報告されており（例えば、Ｓｏｕｓａ　ｅｔ　ａｌ．（２００４）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．８８（５）：１０５２－１０５８、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ＴＴＲベータスリップが血清中で検出可能であるにもかかわらず、機能喪失変異体として作用する可能性があるこ

とを示唆している。発現されたＴＴＲベータスリップタンパク質が機能しないことの追加の相関関係は、体温の低下に関連した血清総Ｔ４および遊離Ｔ４の減少であり、これは、ＴＴＲベータスリップマウスがＴＴＲの機能喪失のために甲状腺機能低下症である可能性があることを示唆している。それぞれ図５Ｂ、５Ｃ、および５Ｄを参照されたい。

【０３０６】

少なくとも２つの考えられる説明は、ヒト化ＴＴＲベータスリップマウスにおける循環ヒトＴＴＲの低レベルを説明している可能性がある。考えられる理由の１つは、肝細胞からのベータスリップＴＴＲの分泌が不十分または非効率的であるということである。２番目の考えられる説明は、循環しているヒトのベータスリップＴＴＲが末梢器官／組織に急速に沈着する可能性があるということである。

【０３０７】

ヒトベータスリップＴＴＲの組織沈着の可能性は、一部のマウスが坐骨神経によって高度に神経支配されている後肢の筋緊張が弱いという我々の観察によって裏付けられている。図７Ａ～７Ｂを参照してされたい。後肢の筋緊張が変化した（すなわち「ジストニア」）ヒト化ＴＴＲベータスリップマウスのこの観察は、ＴＴＲヌルマウスまたはヒト型のＴＴＲを発現するトランスジェニックマウスについての文献で以前に報告されていない観察である。この表現型は、マウスの首の後ろをつかみ、体の軸に対する後肢の角度を評価することによって評価された。通常、マウスは体軸と後肢の角度の間に広角がある（図７ＡのＦ１Ｈ４およびＴＴＲ　ＷＴヒト化型写真を参照）。対照的に、ベータスリップマウスは後肢が体から伸びなかった（図７ＡのＴＴＲ　β－スリップヒト化型写真を参照）。これの重要性は、坐骨神経が後肢機能を制御するため、坐骨神経機能障害の代用手段となる可能性があることである。坐骨神経は、ヒトＴＴＲ疾患（例、ＦＡＰ）におけるアミロイド沈着の主要な部位の１つである。したがって、ジストニアの表現型は、異常な坐骨神経機能の指標となる可能性がある。

【０３０８】

次に握力を測定した。握力は、握力計に接続されたバーをマウスにつかませて、一定の速度で手動でバーからマウスを引き離すことによって測定された。この装置は、グリップを失って解放する前に、マウスがバーを引っ張る最大の力を測定する。前肢と後肢を別々にテストし、マウス１匹当たり３回の試行からの力の平均単位としてグラフ化した。握力はジストニア表現型と相関せず、ヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、および対照（Ｆ１Ｈ４）マウスで類似していた。図９Ｂおよび表８を参照されたい。同様に、体重は、ヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、および対照（Ｆ１Ｈ４）マウスで類似していた。図９Ａおよび表９を参照されたい。

【表８】

表８．ヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、および対照Ｆ１Ｈ４マウスの握力

	前肢、N(SD)	後肢、N(SD)
F1H4	1.109(0.137)	0.3115(0.092)
WT hTTR$^{7577/7577}$	0.961(0.155)	0.3029(0.096)
β-スリップ hTTR$^{8531/8531}$	1.141(0.185)	0.3107(0.083)

【表９】

表９．ヒト化ＴＴＲベータスリップマウス、ヒト化ＴＴＲ野生型マウス、および対照Ｆ１Ｈ４マウスの体重

	雄、g(SD)	雌、g(SD)
F1H4	27.12(2.31)	20.51(2.12)
WT hTTR$^{7577/7577}$	24.77(3.16)	20.22(1.67)
β-スリップ hTTR$^{8531/8531}$	25.38(1.26)	20.69(0.99)

【０３０９】

アミロイド特異的色素であるコンゴーレッドを用いた死後の組織病理学的分析では、Ｆ１Ｈ４（同腹仔対照）またはヒト化ＴＴＲ野生型マウスの坐骨神経にはなかったが、ヒト化ＴＴＲベータスリップマウスの坐骨神経に複屈折陽性アミロイド沈着物を示した。それぞれ図１０Ａおよび１０Ｂを参照されたい。２ヶ月齢のベータスリップマウスをCO_2を用いて安楽死させ、リン酸緩衝液（２０ｍＬ）で経心的に灌流した後、２０ｍｌの４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）で灌流した。肝臓と坐骨神経を摘出し、４％ＰＦＡで４℃で２日間後固定した後、組織をリン酸緩衝液中の３０％（ｗ／ｖ）スクロースに一晩浸して凍結保存した。翌日、組織をＯＣＴ（「最適な切断温度」）に浸して凍結した。切片を１０ミクロンのクリオスタットで切断し、すりガラスの顕微鏡スライドにマウントした。スライドは、製造元のプロトコル（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号：ＨＴ６０－１ＫＴ）に従ってコンゴーレッド溶液で染色した。コンゴーレッドは、アミロイドーシスを検出するために広く使用されている染色剤である。スライドは白色光の下で画像化され、全体的な組織構造と特徴的な赤い染みが明らかになった。図１０Ａおよび１０Ｂの上部パネルを参照されたい。コンゴーレッド染色組織を線形偏光を使用して照射すると、アミロイドに結合した色素のみが偏光を屈折させ（例えば、アミロイドに結合したコンゴーレッド色素は複屈折性になる）、これは薄緑色／白色として表示された。図１０Ａおよび１０Ｂの下部パネルを参照されたい。これらの緑がかった白色の沈着の存在は、アミロイド沈着を示していた。坐骨神経に複屈折（すなわち、アミロイド沈着の存在）が観察され、これは、マウスのジストニア表現型を説明することができる。図１０Ａの右下のパネル（ＴＴＲ　β－スリップヒト化型）を参照されたい。予想通り、肝臓にアミロイドは観察されなかった。図１０Ｂの右下のパネル（ＴＴＲ　β－スリップヒト化型）を参照されたい。

【０３１０】

これは、アミロイドーシスを非常に急速に発症する最初の報告されたインビボモデルであり、２ヶ月齢のベータスリップマウスでアミロイド沈着が観察された。次に、抗ＴＴＲ抗体で共染色して複屈折沈着物を共標識し、それらがＴＴＲ沈着によって引き起こされることを確認するための実験が行われる。他の器官や組織に沈着物があるかどうかを分析するために、追加の実験が行われる。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

（項目１）

ゲノムに遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む非ヒト動物であって、Ｔｔｒコード配列と非コード配列の両方を含む前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、ＴＴＲコード配列と非コード配列の両方を含む対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、コードされたトランスサイレチンタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含む、非ヒト動物。

（項目２）

前記コードされたトランスサイレチンタンパク質がヒトトランスサイレチンタンパク質と最適に整列している場合、前記変異が、前記ヒトトランスサイレチンタンパク質の残基Ｌ５８に対応する残基を、前記ヒトトランスサイレチンタンパク質の残基Ｌ５５に対応する残基が通常占める位置に配置する、ベータ鎖Ｄの３残基シフトを引き起こす、項目１に記載の非ヒト動物。

（項目３）

前記コードされたトランスサイレチンタンパク質が前記ヒトトランスサイレチンタンパク質と最適に整列している場合、前記変異が、前記ヒトトランスサイレチンタンパク質のＧ５３Ｓ／Ｅ５４Ｄ／Ｌ５５Ｓに対応する三重変異である、項目２に記載の非ヒト動物。

（項目４）

前記三重変異が、前記対応するヒトＴＴＲ配列にある、項目３に記載の非ヒト動物。

（項目５）

前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、前記内因性Ｔｔｒプロモーターを含み、前記ヒトＴＴＲ配列が、前記内因性Ｔｔｒプロモーターに作動可能に連結されている、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。

（項目６）
前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の少なくとも１つのイントロンおよび少なくとも１つのエキソンが削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられている、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目７）
前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の全Ｔｔｒコード配列が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられている、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目８）
Ｔｔｒ開始コドンからＴｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の前記領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられている、項目７に記載の非ヒト動物。
（項目９）
前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、ヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含む、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目１０）
内因性Ｔｔｒ５’非翻訳領域が削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目１１）
前記Ｔｔｒ開始コドンから前記Ｔｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列およびヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含むヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、かつ
前記内因性Ｔｔｒ５’非翻訳領域が削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられておらず、かつ
前記内因性Ｔｔｒプロモーターが削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目１２）
（ｉ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座の前記ヒトＴＴＲ配列が、配列番号１４に記載の配列と、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一の配列を含むか、または
（ｉｉ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、配列番号９に記載の配列と、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一の配列を含むタンパク質をコードし、
（ｉｉｉ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、配列番号１０に記載の配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一の配列を含むコード配列を含むか、または
（ｉｖ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、配列番号１２もしくは１３に記載の配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、もしくは１００％同一の配列を含む、項目１１に記載の非ヒト動物。
（項目１３）
前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、シグナルペプチドを含むトランスサイレチン前駆体タンパク質をコードし、前記シグナルペプチドをコードする前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない、項目１～６のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目１４）
前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の第１のエキソンが削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない、項目１３に記載の非ヒト動物。
（項目１５）

前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の第１のエキソンおよび第１のイントロンが削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない、項目１４に記載の非ヒト動物。
（項目１６）
第２のＴｔｒエキソンの開始からＴｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の前記領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられている、項目１３～１５のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目１７）
前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、ヒトＴＴＲ３’非翻訳領域を含む、項目１３～１６のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目１８）
前記第２のＴｔｒエキソンから前記Ｔｔｒ終止コドンまでの前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の前記領域が削除され、前記対応するヒトＴＴＲ配列およびヒトＴＴＲ３’非翻訳領域で置き換えられており、かつ
前記内因性Ｔｔｒ５’非翻訳領域が削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられておらず、かつ
前記内因性Ｔｔｒプロモーターが削除されておらず、前記対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられていない、項目１３～１７のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目１９）
前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、選択カセットまたはレポーター遺伝子を含まない、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目２０）
前記非ヒト動物が、前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座についてホモ接合性である、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目２１）
前記非ヒト動物が哺乳動物である、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目２２）
前記非ヒト動物がラットまたはマウスである、項目２１に記載の非ヒト動物。
（項目２３）
前記非ヒト動物がマウスである、項目２２に記載の非ヒト動物。
（項目２４）
前記非ヒト動物が、その生殖系列において前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目２５）
前記非ヒト動物が、対照の野生型非ヒト動物または変異を伴わない遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む非ヒト動物と比較して活動亢進的である、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目２６）
前記活動亢進が、オープンフィールド試験における総距離、総活動量、もしくは総立ち上がり（ｔｏｔａｌ　ｒｅａｒｉｎｇ）のうちの１つ以上またはすべてによって測定される、項目２５に記載の非ヒト動物。
（項目２７）
前記非ヒト動物が、後肢ジストニアを示す、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目２８）
前記非ヒト動物が、アミロイド沈着を含む、先行項目のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
（項目２９）
前記非ヒト動物が、坐骨神経にアミロイド沈着を含む、項目２８に記載の非ヒト動物。
（項目３０）
前記非ヒト動物が、約２ヶ月齢までにアミロイドーシスを発症する、項目２８または２

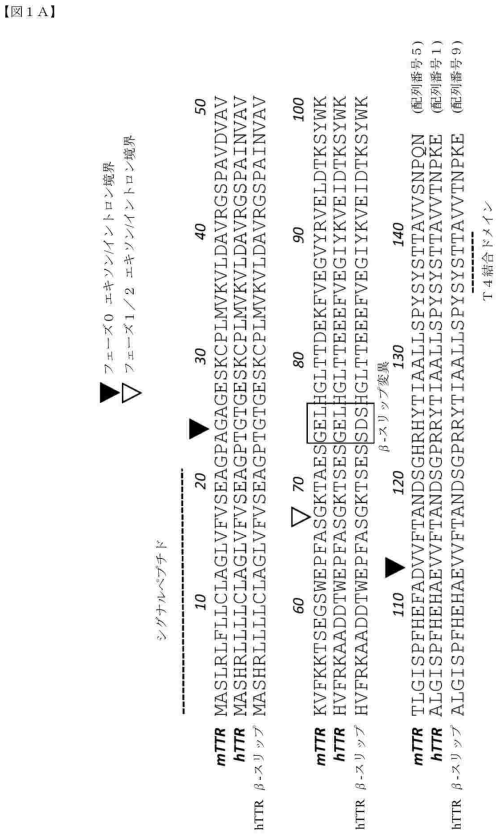
９に記載の非ヒト動物。
（項目３１）
ゲノムに遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む非ヒト動物細胞であって、Ｔｔｒコード配列と非コード配列の両方を含む前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、ＴＴＲコード配列と非コード配列の両方を含む対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、コードされたトランスサイレチンタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含む、非ヒト動物細胞。
（項目３２）
遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む非ヒト動物ゲノムであって、Ｔｔｒコード配列と非コード配列の両方を含む前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、ＴＴＲコード配列と非コード配列の両方を含む対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、コードされたトランスサイレチンタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含む、非ヒト動物ゲノム。
（項目３３）
遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を生成するための標的化ベクターであって、Ｔｔｒコード配列と非コード配列の両方を含む前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座の領域が削除され、ＴＴＲコード配列と非コード配列の両方を含む対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座が、コードされたトランスサイレチンタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含み、前記標的化ベクターが、前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座で５’標的配列を標的とする５’相同性アーム、および前記内因性Ｔｔｒ遺伝子座で３’標的配列を標的とする３’相同性アームに隣接する対応するヒトＴＴＲ配列を含む挿入核酸を含む、標的化ベクター。
（項目３４）
遺伝子改変された非ヒト動物Ｔｔｒ遺伝子であって、Ｔｔｒコード配列と非コード配列の両方を含む内因性Ｔｔｒ遺伝子の領域が削除され、ＴＴＲコード配列と非コード配列の両方を含む対応するヒトＴＴＲ配列で置き換えられており、前記遺伝子改変された非ヒト動物のＴｔｒ遺伝子が、コードされたトランスサイレチンタンパク質のベータ鎖Ｄのシフトを引き起こす変異を含む、遺伝子改変された非ヒト動物Ｔｔｒ遺伝子。
（項目３５）
インビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価する方法であって、
（ａ）項目１～３０のいずれか一項に記載の非ヒト動物に前記ヒトＴＴＲ標的化試薬を投与することと、
（ｂ）前記非ヒト動物における前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価することと、を含む、方法。
（項目３６）
導入が、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）媒介送達、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）媒介送達、または流体力学的送達（ＨＤＤ）を含む、項目３５に記載の方法。
（項目３７）
前記導入が、ＬＮＰ媒介送達を含む、項目３６に記載の方法。
（項目３８）
前記導入が、ＡＡＶ８媒介送達を含む、項目３６に記載の方法。
（項目３９）
ステップ（ｂ）が、前記非ヒト動物から肝臓を単離することと、前記肝臓における前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価することとを含む、項目３５～３８のいずれか一項に記載の方法。
（項目４０）
ステップ（ｂ）が、前記肝臓以外の器官または組織における前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を評価することをさらに含む、項目３９に記載の方法。
（項目４１）
前記評価が、前記遺伝子改変されたＴｔｒ遺伝子座の改変を評価することを含む、項目

３５～４０のいずれか一項に記載の方法。
（項目４２）
前記評価が、前記遺伝子改変されたＴｔｒ遺伝子座によってコードされるＴｔｒメッセンジャーＲＮＡの発現を評価することを含む、項目３５～４１のいずれか一項に記載の方法。
（項目４３）
前記評価が、前記遺伝子改変されたＴｔｒ遺伝子座によってコードされるＴＴＲタンパク質の発現を評価することを含む、項目３５～４２のいずれか一項に記載の方法。
（項目４４）
前記ＴＴＲタンパク質の発現を評価することが、前記非ヒト動物における前記ＴＴＲタンパク質の血清レベルを測定することを含む、項目４３に記載の方法。
（項目４５）
前記活性が、前記非ヒト動物の前記肝臓において評価される、項目４１～４３のいずれか一項に記載の方法。
（項目４６）
前記評価が、活動亢進を評価することを含む、項目３５～４５のいずれか一項に記載の方法。
（項目４７）
前記評価が、後肢ジストニアを評価することを含む、項目３５～４６のいずれか一項に記載の方法。
（項目４８）
前記評価が、アミロイド沈着を評価することを含む、項目３５～４７のいずれか一項に記載の方法。
（項目４９）
前記評価が、坐骨神経におけるアミロイド沈着を評価することを含む、項目４８に記載の方法。
（項目５０）
前記評価が、未処置の対照非ヒト動物との比較で行われる、項目３５～４９のいずれか一項に記載の方法。
（項目５１）
前記ヒトＴＴＲ標的化試薬が、ヒトＴＴＲ遺伝子の領域を標的化するように設計されたヌクレアーゼ剤を含む、項目３５～５０のいずれか一項に記載の方法。
（項目５２）
前記ヌクレアーゼ剤が、Ｃａｓタンパク質および前記ヒトＴＴＲ遺伝子のガイドＲＮＡ標的配列を標的化するように設計されたガイドＲＮＡを含む、項目５１に記載の方法。
（項目５３）
前記Ｃａｓタンパク質が、Ｃａｓ９タンパク質である、項目５２に記載の方法。
（項目５４）
前記ヒトＴＴＲ標的化試薬が、外因性ドナー核酸を含み、前記外因性ドナー核酸が、前記ヒトＴＴＲ遺伝子と組換えるように設計されている、項目３５～５３のいずれか一項に記載の方法。
（項目５５）
前記外因性ドナー核酸が、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）である、項目５４に記載の方法。
（項目５６）
前記ヒトＴＴＲ標的化試薬が、抗原結合タンパク質を含む、項目３５～５５のいずれか一項に記載の方法。
（項目５７）
前記ヒトＴＴＲ標的化試薬が、ＲＮＡｉ剤またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、項目３５～５６のいずれか一項に記載の方法。

（項目５８）
インビボでのヒトＴＴＲ標的化試薬の活性を最適化する方法であって、
（Ｉ）項目３５～５７のいずれか一項に記載の方法を、ゲノムに遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む第１の非ヒト動物において、１回目に実行することと、
（ＩＩ）可変要素（ｖａｒｉａｂｌｅ）を変更し、ステップ（Ｉ）の前記方法を、ゲノムに遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む第２の非ヒト動物において、変更された可変要素を用いて２回目に実行することと、
（ＩＩＩ）ステップ（Ｉ）の前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の前記活性を、ステップ（ＩＩ）の前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の前記活性と比較し、より高い有効性、より高い精度、より高い一貫性、またはより高い特異性をもたらす方法を選択することと、を含む、方法。
（項目５９）
ステップ（ＩＩ）における前記変更された可変要素が、前記ヒトＴＴＲ標的化試薬を前記非ヒト動物に導入する送達方法である、項目５８に記載の方法。
（項目６０）
ステップ（ＩＩ）における前記変更された可変要素が、前記ヒトＴＴＲ標的化試薬を前記非ヒト動物に導入する投与経路である、項目５８に記載の方法。
（項目６１）
ステップ（ＩＩ）における前記変更された可変要素が、前記非ヒト動物に導入された前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の濃度または量である、項目５８に記載の方法。
（項目６２）
ステップ（ＩＩ）における前記変更された可変要素が、前記非ヒト動物に導入された前記ヒトＴＴＲ標的化試薬の形態である、項目５８に記載の方法。
（項目６３）
ステップ（ＩＩ）における前記変更された可変要素が、前記非ヒト動物に導入された前記ヒトＴＴＲ標的化試薬である、項目５８に記載の方法。
（項目６４）
項目１～３０のいずれか一項に記載の非ヒト動物を作製する方法であって、
（Ｉ）（ａ）遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含むように、多能性非ヒト動物細胞のゲノムを改変することと、
（ｂ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む前記遺伝子改変された多能性非ヒト動物細胞を同定または選択することと、
（ｃ）前記遺伝子改変された多能性非ヒト動物細胞を非ヒト動物宿主胚に導入することと、
（ｄ）代理母に前記非ヒト動物宿主胚を懐胎させることと、を含むか、または
（ＩＩ）（ａ）遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含むように、非ヒト動物の１細胞期胚のゲノムを改変することと、
（ｂ）前記遺伝子改変された内因性Ｔｔｒ遺伝子座を含む前記遺伝子改変された非ヒト動物の１細胞期胚を選択することと、
（ｃ）代理母に前記遺伝子改変された非ヒト動物の１細胞期胚を懐胎させることと、を含む、方法。

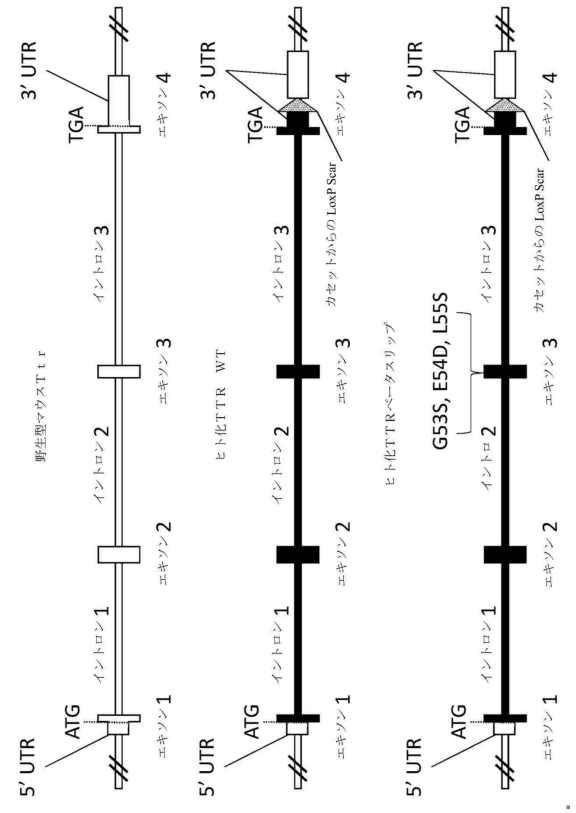
【図面】

【図１Ａ】



【図１Ｂ】

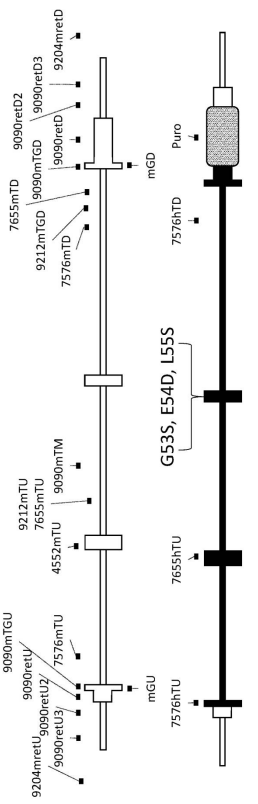
【図２】



【図３】

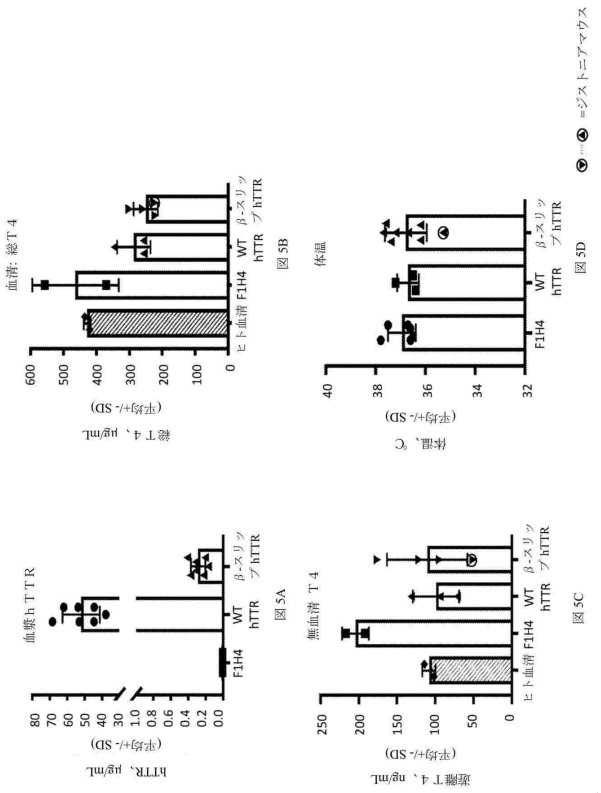
【図４】

【図４】



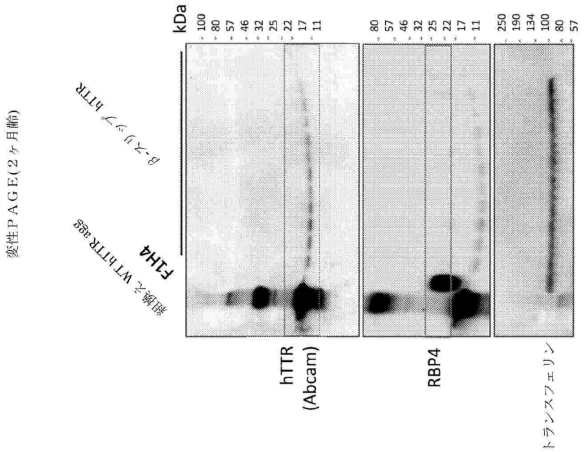
【図５Ａ－Ｄ】

【図５Ａ、５Ｂ、５Ｃおよび５Ｄ】



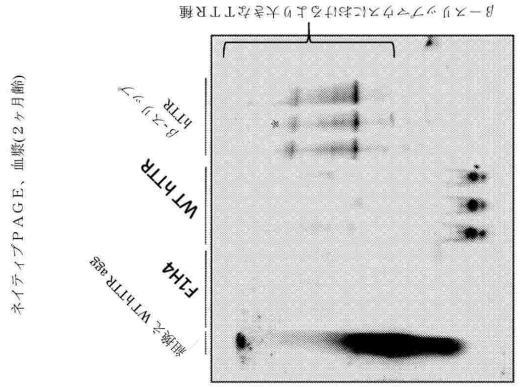
【図６Ａ】

【図６Ａ】



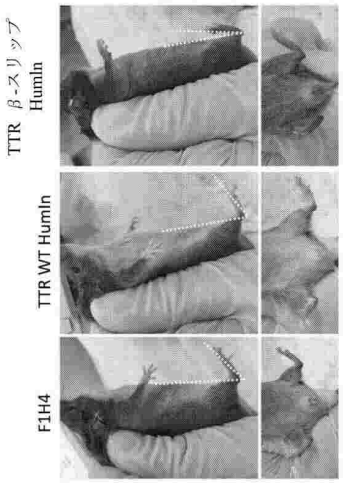
【図６Ｂ】

【図６Ｂ】



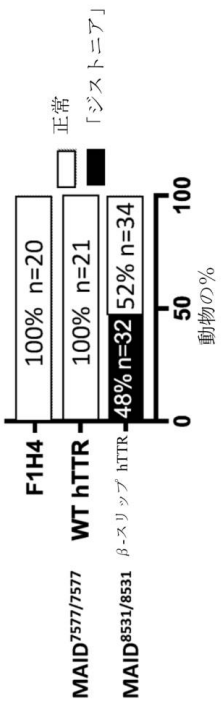
【図７Ａ】

【図７Ａ】



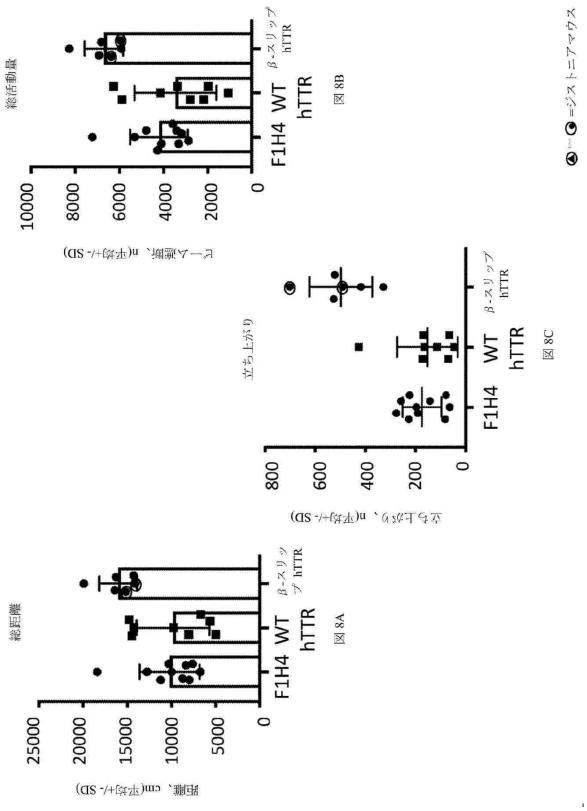
【図７Ｂ】

【図７Ｂ】



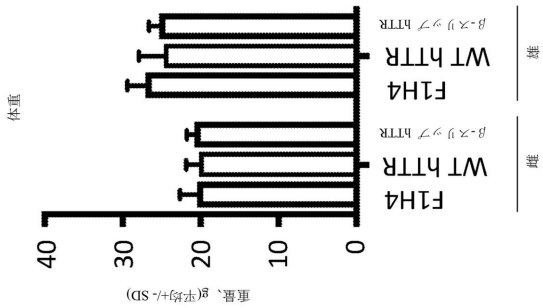
【図８Ａ－Ｃ】

【図８Ａ、８Ｂおよび図８Ｃ】



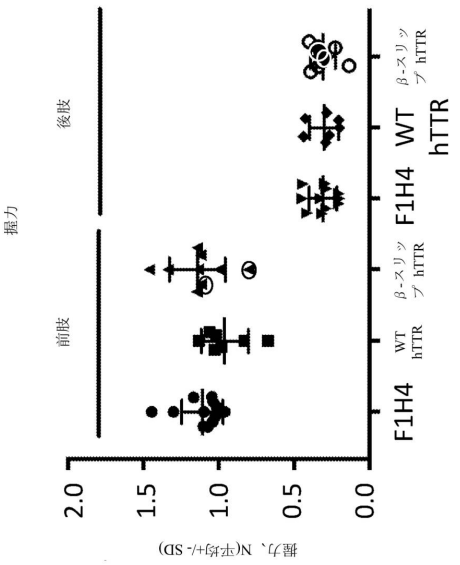
【図９Ａ】

【図９Ａ】



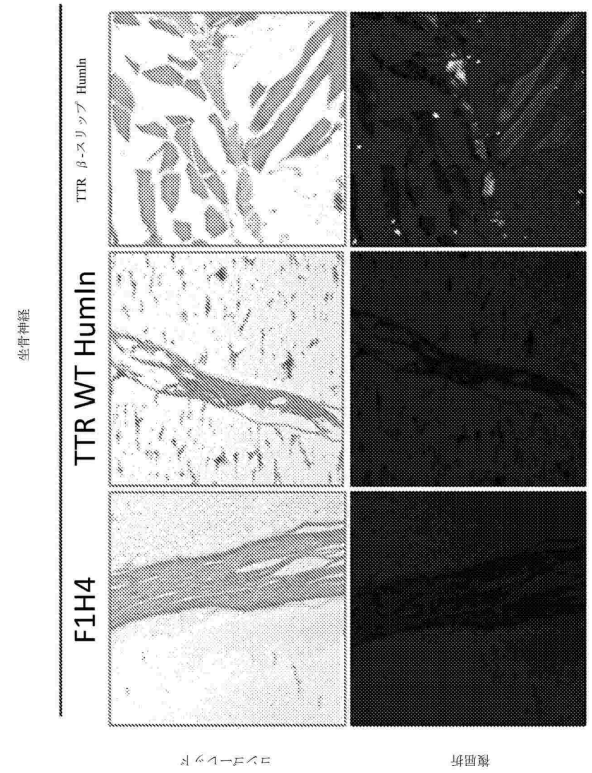
【図９Ｂ】

【図９Ｂ】



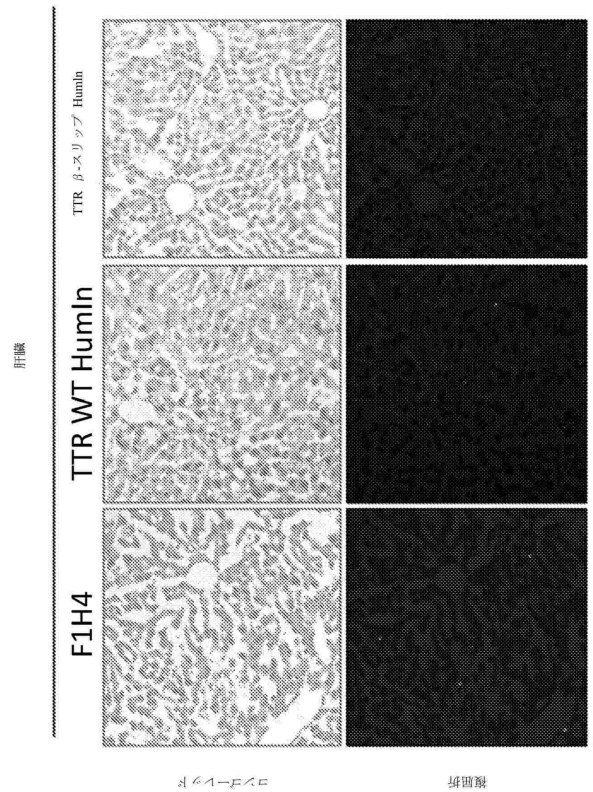
【図１０Ａ】

【図１０Ａ】



【図１０Ｂ】

【図１０Ｂ】



【配列表】
0007610339000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C12N	*15/12*	*(2006.01)*
C07K	*14/47*	*(2006.01)*
C12N	*15/864*	*(2006.01)*
C12N	*15/88*	*(2006.01)*
C12N	*15/09*	*(2006.01)*
C12N	*15/113*	*(2010.01)*
C07K	*16/18*	*(2006.01)*

FI

G01N	33/53	D
C12N	15/12	
C07K	14/47	
C12N	15/864	100Z
C12N	15/88	Z
C12N	15/09	110
C12N	15/113	Z
C07K	16/18	

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 クロスビー， キース
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 ドラモンド サミュエルソン， メーガン
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 フレンデウェイ， デイビッド
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
(72)発明者 マーフィー， アンドリュー ジェイ．
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
審査官 松井 一泰

(56)参考文献 特表２０１８－５０９８８９（ＪＰ，Ａ）
Therese ENEQVIST et al.，“ The β-Slip: A Novel Concept in Transthyretin Amyloidosis ”，Molecular Cell，2000年11月，Vol. 6，No. 5，pp.1207-1218，DOI: 10.1016/s1097-2765(00)00117-9

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－ １５／９０
Ｃ１２Ｎ １／００－ ７／０８
ＰｕｂＭｅｄ