

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-514327
(P2025-514327A)

(43)公表日 令和7年5月2日(2025.5.2)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 Z Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 1 0

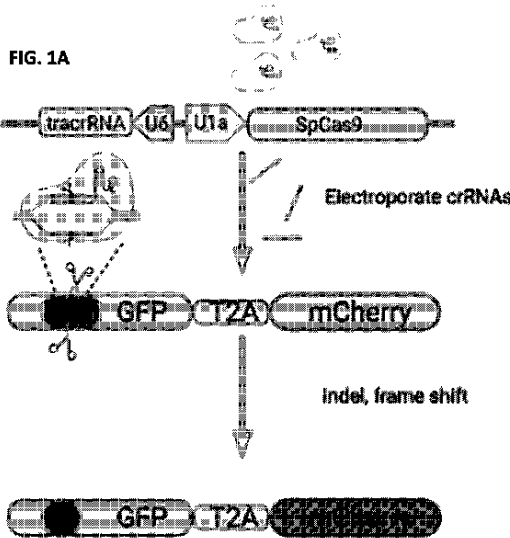
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全63頁)

(21)出願番号	特願2024-563634(P2024-563634)	(71)出願人	505220170
(86)(22)出願日	令和5年4月28日(2023.4.28)		ユニバーシティー オブ マサチューセッツ
(85)翻訳文提出日	令和6年12月23日(2024.12.23)		University of Massa
(86)国際出願番号	PCT/US2023/020418		chusetts
(87)国際公開番号	WO2023/212327		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
(87)国際公開日	令和5年11月2日(2023.11.2)		2 1 0 8、ボストン ワン ビーコン ス
(31)優先権主張番号	63/336,340		トリート、サーティーファースト フロア
(32)優先日	令和4年4月29日(2022.4.29)	(74)代理人	100145403
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 山尾 憲人
	米国(US)	(74)代理人	100106518
(31)優先権主張番号	63/438,842		弁理士 松谷 道子
(32)優先日	令和5年1月13日(2023.1.13)	(74)代理人	100138911
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 櫻井 陽子
	米国(US)	(72)発明者	ジャン, ハン
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		アメリカ合衆国 0 1 6 0 4 マサチューセ
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C R I S P RガイドRNAのための保護オリゴヌクレオチド

(57)【要約】

保護オリゴヌクレオチドが提供される。5' 及び／または 3' 接合部位を有する保護オリゴヌクレオチドが提供される。化学修飾を伴う保護オリゴヌクレオチドが提供される。C R I S P Rヌクレアーゼと共にゲノム編集に保護オリゴヌクレオチドを使用する方法、ならびにその方法を実施するためのキットもまた提供される。保護オリゴヌクレオチドは、(a) c r RNAと相補性のある配列と、(b) 少なくとも1つの化学修飾ヌクレオチドを含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

保護オリゴヌクレオチドであって、

(a) c r R N A と相補的な配列と、

(b) 少なくとも 1 つの化学修飾ヌクレオチドと、を含み、

前記保護オリゴヌクレオチドは、前記 c r R N A に結合することができ、かつ

前記保護オリゴヌクレオチドは、結合すると、前記 c r R N A にヌクレアーゼ耐性を付与する、前記保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの化学修飾ヌクレオチドは、リボース基、リン酸基、核酸塩基、またはこれらの組み合わせの修飾を含む、請求項 1 に記載の保護オリゴヌクレオチド。 10

【請求項 3】

前記リボース基の前記修飾は、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)、2'-NH₂(2'-アミノ)、4'-チオ、二環式ヌクレオチド、ロックド核酸(LNA)、2'-(S)-制約エチル(S-cEt)、制約MOE、及び2'-O、4'-C-アミノメチレン架橋核酸(2',4'-B^NNA^C)からなる群から独立して選択される、請求項 2 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

前記リボース基の少なくとも 80% が、化学修飾される、請求項 2 または 3 に記載の保護オリゴヌクレオチド。 20

【請求項 5】

前記リボース基の少なくとも 90% が、化学修飾される、請求項 2 または 3 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

前記リボース基の 100% が、化学修飾される、請求項 2 または 3 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

前記 c r R N A は、標的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができるガイド配列部分及び反復配列部分を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の保護オリゴヌクレオチド。 30

【請求項 8】

前記保護オリゴヌクレオチドは、前記 c r R N A に結合して、二重鎖を形成し、任意選択で、前記保護オリゴヌクレオチドは、完全に化学修飾されていない前記 c r R N A の領域に結合する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

前記二重鎖は、前記二重鎖の全長にわたって 37℃ を超える融解温度(T_m)を有する、請求項 8 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

前記二重鎖は、前記ガイド配列部分を含む相補性の前記領域にわたって 37℃ 未満の融解温度(T_m)を有する、請求項 8 に記載の保護オリゴヌクレオチド。 40

【請求項 11】

前記 c r R N A の前記ガイド配列部分への t r a c r R N A の結合により、前記保護オリゴヌクレオチドが前記 c r R N A から解離される、請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

前記保護オリゴヌクレオチドに接合される少なくとも 1 つの部位をさらに含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 つの部位は、前記保護オリゴヌクレオチドの 5' 末端及び／または前記保護オリゴヌクレオチドの 3' 末端のうち少なくとも 1 つに接合される、請求項 12 に 50

記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの部位は、前記保護オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増加させる、請求項 12 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

前記少なくとも 1 つの部位は、前記保護オリゴヌクレオチドの特異的組織分布を促進する、請求項 12 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 16】

前記少なくとも 1 つの部位は、脂肪酸、ステロイド、セコステロイド、脂質、ガングリオシド類似体、ヌクレオシド類似体、内在性カンナビノイド、ビタミン、受容体リガンド、ペプチド、アプタマー、及びアルキル鎖からなる群から選択される、請求項 12 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

10

【請求項 17】

前記少なくとも 1 つの部位は、コレステロール、コレステロールトリエチレングリコール (TEGChol)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、ドコサン酸 (DCA)、リトコール酸 (LA)、GalNAc、両親媒性ブロックコポリマー (ABC)、親水性ブロックコポリマー (HBC)、ポロキサマー、Cy5、及び Cy3 からなる群から選択される、請求項 12 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

前記少なくとも 1 つの部位は、リンカーを介して前記保護オリゴヌクレオチドに接合される、請求項 12 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

20

【請求項 19】

前記リンカーは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ポリペプチド、多糖、及びブロックコポリマーからなる群から選択される、請求項 18 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 20】

前記少なくとも 1 つの部位は、修飾脂質である、請求項 18 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 21】

前記修飾脂質は、分枝状脂質である、請求項 20 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

30

【請求項 22】

前記修飾脂質は、式 I の分枝状脂質であり、
式 I : $X-MC(=Y)M-Z-[L-MC(=Y)M-R]_n$ 、
式中、X は、前記脂質を前記ガイド RNA に連結する部位であり、各 Y は、独立して、酸素または硫黄であり、各 M は、独立して、 CH_2 、NH、O、または S であり、Z は、2 つまたは 3 つの (「n」) 鎖が化学修飾ガイド RNA に結合することを可能にする分岐基であり、L は、任意のリンカー部位であり、かつ各 R は、独立して、2 ~ 30 原子長の飽和、モノ不飽和、もしくは多価不飽和の直鎖状もしくは分枝状部位、ステロール、またはその他の疎水基である、請求項 20 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 23】

前記修飾脂質は、頭部修飾脂質である、請求項 20 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

40

【請求項 24】

前記修飾脂質は、式 II の頭部修飾脂質であり、
式 II : $X-MC(=Y)M-Z-[L-MC(=Y)M-R]_n-L-K-J$ 、
式中、X は、前記脂質を前記ガイド RNA に連結する部位であり、各 Y は、独立して、酸素または硫黄であり、各 M は、独立して、 CH_2 、NH、N-アルキル、O、または S であり、Z は、2 つまたは 3 つの (「n」) 鎖が化学修飾ガイド RNA に結合することを可能にする分岐基であり、各 L は、独立して、任意のリンカー部位であり、かつ R は、2 ~ 30 原子長の飽和、モノ不飽和、もしくは多価不飽和の直鎖状もしくは分枝状部位、ステロール、またはその他の疎水基であり、K は、リン酸塩、硫酸塩、またはアミドであり、

50

かつ J は、アミノアルカン、または第四級アミノアルカン基である、請求項 20 に記載の保護オリゴヌクレオチド。

【請求項 25】

二本鎖オリゴヌクレオチドであって、

(a) (i) 標的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができるガイド配列部分、及び (ii) 反復配列部分を含む crRNA と、

(b) 前記 crRNA と相補的な保護オリゴヌクレオチドとを含み、
前記 crRNA は、少なくとも 50% の修飾ヌクレオチドを含み、かつ
前記保護オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、前記二本鎖オリゴヌクレオチド。

10

【請求項 26】

前記保護オリゴヌクレオチドの前記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドまたは前記 crRNA の前記修飾ヌクレオチドは、リボース基、リン酸基、核酸塩基、またはこれらの組み合わせの修飾を含む、請求項 25 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 27】

前記リボース基の前記修飾は、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-O-(2-メトキシエチル) (MOE)、2'-NH₂ (2'-アミノ)、4'-チオ、二環式ヌクレオチド、ロックド核酸 (LNA)、2'-(S)-制約エチル (S-cEt)、制約 MOE、及び 2'-O、4'-C-アミノメチレン架橋核酸 (2', 4'-B^NNA^C) からなる群から独立して選択される、請求項 26 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

20

【請求項 28】

前記リボース基の少なくとも 80% が、化学修飾される、請求項 25 または 26 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 29】

前記リボース基の少なくとも 90% が、化学修飾される、請求項 25 または 26 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 30】

前記リボース基の 100% が、化学修飾される、請求項 25 または 26 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

30

【請求項 31】

前記二本鎖オリゴヌクレオチドの全長にわたって 37℃ を超える融解温度 (T_m) を含む、請求項 25 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 32】

前記 crRNA ガイド配列部分を含む前記二本鎖オリゴヌクレオチドの領域にわたって 37℃ 未満の融解温度 (T_m) を含む、請求項 25 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 33】

前記 crRNA の前記反復配列部分への tracrRNA の結合により、前記保護オリゴヌクレオチドが前記 crRNA から解離される、請求項 25 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

40

【請求項 34】

前記保護オリゴヌクレオチドは、完全に化学修飾されていない前記 crRNA の領域に結合する、請求項 25 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 35】

前記保護オリゴヌクレオチドは、100% 未満の修飾リボース基を含む前記 crRNA の領域に結合する、請求項 25 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 36】

前記保護オリゴヌクレオチド及び／または前記 crRNA に接合される少なくとも 1 つ

50

の部位をさらに含む、請求項 25～35 のいずれか 1 項に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 37】

前記少なくとも 1 つの部位は、前記保護オリゴヌクレオチド及び／または前記 crRNA の 5' 末端及び／または 3' 末端のうち少なくとも 1 つに接合される、請求項 36 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 38】

前記少なくとも 1 つの部位は、前記二本鎖オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増加させる、請求項 36 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 39】

前記少なくとも 1 つの部位は、前記二本鎖オリゴヌクレオチドの特異的組織分布を促進する、請求項 36 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 40】

前記少なくとも 1 つの部位は、脂肪酸、ステロイド、セコステロイド、脂質、ガングリオシド類似体、ヌクレオシド類似体、内在性カンナビノイド、ビタミン、受容体リガンド、ペプチド、アプタマー、及びアルキル鎖からなる群から選択される、請求項 36 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 41】

前記少なくとも 1 つの部位は、コレステロール、コレステロールトリエチレングリコール (TEGChol)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、ドコサン酸 (DCA)、リトコール酸 (LA)、GalNAc、両親媒性ブロックコポリマー (ABC)、親水性ブロックコポリマー (HBC)、ポロキサマー、Cy5、及び Cy3 からなる群から選択される、請求項 36 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 42】

前記少なくとも 1 つの部位は、リンカーを介して前記保護オリゴヌクレオチド及び／または前記 crRNA に接合される、請求項 36 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 43】

前記リンカーは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ポリペプチド、多糖、及びブロックコポリマーからなる群から選択される、請求項 42 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 44】

前記少なくとも 1 つの部位は、修飾脂質である、請求項 42 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 45】

前記修飾脂質は、分枝状脂質である、請求項 44 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 46】

前記修飾脂質は、式 I の分枝状脂質であり、

式 I : $X-MC(=Y)M-Z-[L-MC(=Y)M-R]_n$ 、

式中、X は、前記脂質を前記ガイド RNA に連結する部位であり、各 Y は、独立して、酸素または硫黄であり、各 M は、独立して、 CH_2 、NH、O、または S であり、Z は、2 つまたは 3 つの (「n」) 鎖が化学修飾ガイド RNA に結合することを可能にする分岐基であり、L は、任意のリンカー部位であり、かつ各 R は、独立して、2～30 原子長の飽和、モノ不飽和、もしくは多価不飽和の直鎖状もしくは分枝状部位、ステロール、またはその他の疎水基である、請求項 44 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 47】

前記修飾脂質は、頭部修飾脂質である、請求項 44 に記載の二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 48】

前記修飾脂質は、式 II の頭部修飾脂質であり、

式 II : $X-MC(=Y)M-Z-[L-MC(=Y)M-R]_n-L-K-J$ 、

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

【請求項 5 2】

【請求項 53】

表 2 の c r R N A 1 ～ 1 3 4 のうちいずれかから選択される c r R N A 修飾パターンを含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の保護オリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 54】

前記 crRNA は、tracrRNA に結合して、ガイド RNA を形成する、先行請求項のいずれかに記載の保護オリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 55】

前記ガイド RNA は、S. pyogenes Cas9 (SpCas9)、S. aureus Cas9 (SaCas9)、N. meningitidis Cas9 (NmCas9)、C. jejuni Cas9 (CjCas9)、及び Geobacillus Cas9 (GeoCas9) からなる群から選択される Cas9 ヌクレアーゼに結合する、請求項 52 に記載の保護オリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 56】

前記 Cas9 は、活性が改変されたバリエーション Cas9 である、請求項 53 に記載の保護オリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 57】

前記バリエーション Cas9 は、Cas9 ニッカーゼ (nCAs9)、触媒不活性型 Cas9 (dCas9)、高精度 Cas9 (HypaCas9)、高忠実度 Cas9 (Cas9-HF)、特異性強化型 Cas9 (eCas9)、及び PAM 拡張型 Cas9 (xCas9) からなる群から選択される、請求項 54 に記載の保護オリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 58】

細胞内のゲノムの標的領域を編集する方法であって、
先行請求項のいずれか 1 項に記載の保護オリゴヌクレオチドと、
先行請求項のいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の crRNA と、
1 つ以上の tracrRNA と、
RNA 誘導型ヌクレアーゼまたは RNA 誘導型ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドと、を含むゲノム編集システムを前記細胞に投与することを含む、前記方法。

【請求項 59】

前記標的遺伝子は、生物の細胞内にある、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記標的遺伝子の発現は、ノックアウトまたはノックダウンされる、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 61】

前記 RNA 誘導型ヌクレアーゼまたは RNA 誘導型ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、及び前記 1 つ以上の tracrRNA は、前記 1 つ以上の crRNA または前記保護オリゴヌクレオチドの前に前記細胞に投与される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 62】

前記 crRNA 部分の 3' 末端を前記 tracrRNA 部分の 5' 末端に連結させるリンカーをさらに含み、任意選択で、
前記リンカーは、切断可能である、先行請求項のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 63】

前記リンカーは、切断可能 d(TT)-POC7 リンカーである、請求項 62 に記載のオリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 4 月 29 日に出願の米国特許仮出願第 63/336,340 号及び 2023 年 1 月 13 日に出願の米国特許仮出願第 63/438,842 号の利益を主張する。上記の参照の特許出願の内容全体は、参照によりその全体が本明細書に援用される。

10

20

30

40

50

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、National Institutes of Healthにより授与された助成金番号TR002668の下で政府の支援によりなされたものである。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

本開示は、CRISPRゲノム編集用の修飾ガイドRNAのための保護オリゴヌクレオチドの組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0004】

CRISPR RNA誘導型ゲノム工学は、ヒト遺伝病及び多くの他の生物学の態様の研究に革命的变化をもたらした。多数のCRISPRに基づく生体内または生体外のゲノム編集療法が臨床試験に近づきつつある。この変革の中心は、Cas9 (II型) 及びCas12a/Cpf1 (V型) などのクラスIIのCRISPR-Casシステムで見られる微生物エフェクタータンパク質である (Jinek et al. Science 337, 816-821 (2012); Gasiunas et al. PNAS 109, E2579-E2586 (2012); Zetsche et al. Cell 163, 759-771 (2015))。

【0005】

最も広く使用されているゲノム編集ツールは、Streptococcus pyogenes株SF370由来のII-A型Cas9 (SpCas9) である (Jinek et al., 上記)。Cas9は、細菌及び真核生物の両方において効率的なDNA切断に向けて、CRISPR RNA (crRNA) 及びトランス活性化crRNA (tracrRNA) と共にリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成する (図1)。crRNAは、標的DNAとの塩基対形成を介してCas9 RNPを特定の遺伝子座に誘導して、Rループを形成するガイド配列を含有する。このプロセスには、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) の事前の認識が必要であり、SpCas9の場合、このモチーフはNGGである。Rループ形成により、His-Asn-His (HNH) 及びRuvC様エンドヌクレアーゼドメインが活性化し、それにより、それぞれ、DNAの標的鎖及び非標的鎖が切断され、その結果、二本鎖切断 (DSB) が生じる。

【0006】

哺乳類用途では、Cas9及びそのガイドRNAは、DNA (例えば、ウイルスベクター)、RNA (例えば、脂質ナノ粒子中のCas9 mRNAとガイドRNA) から発現されるか、またはリボ核タンパク質 (RNP) として導入され得る。

【0007】

未修飾の一本鎖分子RNAは、ヌクレアーゼ分解に対して極めて脆弱であり、細胞及び血清などの生体液中で急速に分解される。未修飾かつ製剤化されていないcrRNAsを送達することは、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) 及び低分子干渉RNA (siRNA) などの他の治療用オリゴヌクレオチドを送達するシナリオと類似しており、この場合、生体内での有効性において化学修飾が重要な役割を果たす。しかし、完全な化学修飾により、crRNAの安定性は大幅に強化されたが (図1C)、それにより、編集効率が損なわれた (図1D)。本明細書において、crRNAの低修飾の領域と相補的な、短く完全に化学的に安定したオリゴ (以後「保護オリゴ」と称する) が、活性を損なうことなくcrRNAの安定性を大幅に強化したことを報告する。さらに、保護オリゴが、crRNAsの効力を強化することができ、かつ広範囲の接合に耐性があり、ゆえに送達及び生体内分布を改善し得ることを示す。本発明者らは、保護オリゴにより、安定性、活性、及び細胞取り込みが強化された未修飾crRNAの生体内送達が可能になると見込んでいる。

【発明の概要】

【0008】

本開示は、C R I S P Rゲノム編集のための保護オリゴヌクレオチドを提供する。特定の
の実施形態では、本開示の保護オリゴヌクレオチドは、重度にまたは完全に化学修飾され
る。本開示の保護オリゴヌクレオチドは、c r R N Aの安定性、改善された効力、及び／
または低減されたオフターゲット効果などの、生体内または生体外におけるいくつかの利
点を付与し得る。さらに、特定の実施形態では、本開示の保護オリゴヌクレオチドは、免
疫原性が低減されており、例えば、自然免疫反応を誘発する能力が低減されている。

【0009】

特定の態様において、本開示は、(a) c r R N Aと相補的な配列と、(b) 少なくと
も1つの化学修飾ヌクレオチドを含む保護オリゴヌクレオチドを提供するが、ここで、
該保護オリゴヌクレオチドは、c r R N Aに結合することができ、かつ該保護オリゴヌク
レオチドは、結合すると、c r R N Aにヌクレアーゼ耐性を付与する。

10

【0010】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、それぞれ独立して、リボース基、リン酸基、核
酸塩基、またはこれらの組み合わせの修飾を含む。

【0011】

一実施形態では、リボース基の各修飾は、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-デオ
キシ、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)、2'-NH(2'-アミノ)、
4'-チオ、二環式ヌクレオチド、ロックド核酸(LNA)、2'-(S)-制約エチル(
S-cet)、制約MOE、及び2'-O、4'-C-アミノメチレン架橋核酸(2', 4'
-BNA^{NC})からなる群から独立して選択される。

20

【0012】

一実施形態では、リボース基の少なくとも80%が、化学修飾される。一実施形態では
、リボース基の少なくとも90%が、化学修飾される。一実施形態では、リボース基の1
00%が、化学修飾される。

【0013】

一実施形態では、c r R N Aは、標的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズすること
ができるガイド配列部分及び反復配列部分を含む。

【0014】

一実施形態では、保護オリゴヌクレオチドは、c r R N Aに結合して二重鎖を形成する
。

30

【0015】

一実施形態では、二重鎖は、二重鎖の全長にわたって37℃を超える融解温度(T_m)
を有する。

【0016】

一実施形態では、二重鎖は、ガイド配列部分を含む相補性の領域にわたって37℃未満
の融解温度(T_m)を有する。

【0017】

一実施形態では、c r R N Aのガイド配列部分へのt r a c r R N Aの結合により、保
護オリゴヌクレオチドがc r R N Aから解離される。

【0018】

一実施形態では、保護オリゴヌクレオチドは、保護オリゴヌクレオチドに接合される少
なくとも1つの部位をさらに含む。一実施形態では、少なくとも1つの部位は、保護オリ
ゴヌクレオチドの5'末端及び／または保護オリゴヌクレオチドの3'末端のうち少なくと
も1つに接合される。

40

【0019】

一実施形態では、少なくとも1つの部位は、ガイドRNAの細胞取り込みを増加させる
。一実施形態では、少なくとも1つの部位は、ガイドRNAの特異的組織分布を促進する
。

【0020】

一実施形態では、少なくとも1つの部位は、脂肪酸、ステロイド、セコステロイド、脂

50

質、ガングリオシド類似体、ヌクレオシド類似体、内在性カンナビノイド、ビタミン、受容体リガンド、ペプチド、アプタマー、及びアルキル鎖からなる群から選択される。

【0021】

一実施形態では、少なくとも1つの部位は、コレステロール、ドコサヘキサエン酸（DHA）、ドコサン酸（DCA）、リトコール酸（LA）、GalNAc、両親媒性ブロックコポリマー（ABC）、親水性ブロックコポリマー（HBC）、ポロキサマー、Cy5、及びCy3からなる群から選択される。

【0022】

一実施形態では、少なくとも1つの部位は、リンカーを介してガイドRNAに接合される。一実施形態では、リンカーは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ポリペプチド、多糖、及びブロックコポリマーからなる群から選択される。

10

【0023】

一実施形態では、少なくとも1つの部位は、修飾脂質である。一実施形態では、修飾脂質は、分枝状脂質である。

【0024】

一実施形態では、修飾脂質は、式Iの分枝状脂質である。式I： $X-MC(=Y)M-Z-[L-MC(=Y)M-R]_n$ 。式中、Xは、脂質をガイドRNAに連結する部位であり、各Yは、独立して、酸素または硫黄であり、各Mは、独立して、 CH_2 、NH、O、またはSであり、Zは、2つまたは3つの（「n」）鎖が化学修飾ガイドRNAに結合することを可能にする分岐基であり、Lは、任意のリンカー部位であり、かつ各Rは、独立して、2～30原子長の飽和、モノ不飽和、もしくは多価不飽和の直鎖状もしくは分枝状部位、ステロール、またはその他の疎水基である。一実施形態では、修飾脂質は、頭部修飾脂質である。

20

【0025】

一実施形態では、修飾脂質は、式IIの頭部修飾脂質である。式II： $X-MC(=Y)M-Z-[L-MC(=Y)M-R]_n-L-K-J$ 。式中、Xは、脂質をガイドRNAに連結する部位であり、各Yは、独立して、酸素または硫黄であり、各Mは、独立して、 CH_2 、NH、N-アルキル、O、またはSであり、Zは、2つまたは3つの（「n」）鎖が化学修飾ガイドRNAに結合することを可能にする分岐基であり、各Lは、独立して、任意のリンカー部位であり、かつRは、2～30原子長の飽和、モノ不飽和、もしくは多価不飽和の直鎖状もしくは分枝状部位、ステロール、またはその他の疎水基であり、Kは、リン酸塩、硫酸塩、またはアミドであり、かつJは、アミノアルカン、または第四級アミノアルカン基である。

30

【0026】

一態様において、本開示は、（a）（i）標的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができるガイド配列部分及び（ii）反復配列部分を含むcrRNAと、（b）crRNAと相補的な保護オリゴヌクレオチドを含む二本鎖オリゴヌクレオチドを提供するが、ここで、該crRNAは、少なくとも50%の修飾ヌクレオチドを含み、かつ該保護オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む。

【0027】

一実施形態では、修飾ヌクレオチドは、リボース基、リン酸基、核酸塩基、またはこれらの組み合わせの修飾を含む。

40

【0028】

一実施形態では、リボース基の各修飾は、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-O-(2-メトキシエチル)（MOE）、2'-NH₂（2'-アミノ）、4'-チオ、二環式ヌクレオチド、ロックド核酸（LNA）、2'-(S)-制約エチル（S-cet）、制約MOE、または2'-O、4'-C-アミノメチレン架橋核酸（2', 4'-BN^AC）からなる群から独立して選択される。

【0029】

一実施形態では、リボース基の少なくとも80%が、化学修飾される。一実施形態では

50

、リボース基の少なくとも90%が、化学修飾される。一実施形態では、リボース基の100%が、化学修飾される。

【0030】

一実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、二本鎖オリゴヌクレオチドの全長にわたって37℃を超える融解温度（ T_m ）を含む。

【0031】

一実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、 $crRNA$ ガイド配列部分を含む二本鎖オリゴヌクレオチドの領域にわたって37℃未満の融解温度（ T_m ）を含む。

【0032】

一実施形態では、 $crRNA$ の反復配列部分への $tracrRNA$ の結合により、保護オリゴヌクレオチドが $crRNA$ から解離される。 10

【0033】

一実施形態では、保護オリゴヌクレオチドは、完全に化学修飾されていない $crRNA$ の領域に結合する。

【0034】

一実施形態では、保護オリゴヌクレオチドは、100%未満の修飾リボース基を含む $crRNA$ の領域に結合する。

【0035】

一実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、保護オリゴヌクレオチド及び／または $crRNA$ に接合される少なくとも1つの部位をさらに含む。一実施形態では、少なくとも1つの部位は、保護オリゴヌクレオチド及び／または $crRNA$ の5'末端及び／または3'末端のうち少なくとも1つに接合される。 20

【0036】

一実施形態では、少なくとも1つの部位は、ガイドRNAの細胞取り込みを増加させる。一実施形態では、少なくとも1つの部位は、ガイドRNAの特異的組織分布を促進する。

【0037】

一実施形態では、少なくとも1つの部位は、脂肪酸、ステロイド、セコステロイド、脂質、ガングリオシド類似体、ヌクレオシド類似体、内在性カンナビノイド、ビタミン、受容体リガンド、ペプチド、アプタマー、及びアルキル鎖からなる群から選択される。 30

【0038】

一実施形態では、少なくとも1つの部位は、コレステロール、ドコサヘキサエン酸（DHA）、ドコサン酸（DCA）、リトコール酸（LA）、 $GalNAc$ 、両親媒性ブロックコポリマー（ABC）、親水性ブロックコポリマー（HBC）、ポロキサマー、 $Cy5$ 、及び $Cy3$ からなる群から選択される。

【0039】

一実施形態では、少なくとも1つの部位は、リンカーを介してガイドRNAに接合される。一実施形態では、リンカーは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ポリペプチド、多糖、及びブロックコポリマーからなる群から選択される。

【0040】

一実施形態では、少なくとも1つの部位は、修飾脂質である。一実施形態では、修飾脂質は、分枝状脂質である。 40

【0041】

一実施形態では、修飾脂質は、式Iの分枝状脂質である。式I： $X-MC(=Y)M-Z-[L-MC(=Y)M-R]_n$ 。式中、Xは、脂質をガイドRNAに連結する部位であり、各Yは、独立して、酸素または硫黄であり、各Mは、独立して、 CH_2 、NH、O、またはSであり、Zは、2つまたは3つの（「n」）鎖が化学修飾ガイドRNAに結合することを可能にする分岐基であり、Lは、任意のリンカー部位であり、かつ各Rは、独立して、2～30原子長の飽和、モノ不飽和、もしくは多価不飽和の直鎖状もしくは分枝状部位、ステロール、またはその他の疎水基である。一実施形態では、修飾脂質は、頭部 50

修飾脂質である。

【0042】

一実施形態では、修飾脂質は、式ⅠⅠの頭部修飾脂質である。式ⅠⅠ： $X-MC(=Y)M-Z-[L-MC(=Y)M-R]n-L-K-J$ 。式中、 X は、脂質をガイドRNAに連結する部位であり、各 Y は、独立して、酸素または硫黄であり、各 M は、独立して、 CH_2 、 NH 、 N -アルキル、 O 、または S であり、 Z は、2つまたは3つの（「 n 」）鎖が化学修飾ガイドRNAに結合することを可能にする分岐基であり、各 L は、独立して、任意のリンカー部位であり、かつ R は、2～30原子長の飽和、モノ不飽和、もしくは多価不飽和の直鎖状もしくは分枝状部位、ステロール、またはその他の疎水基であり、 K は、リン酸塩、硫酸塩、またはアミドであり、かつ J は、アミノアルカン、または第四級アミノアルカン基である。

10

【0043】

一実施形態では、ガイドRNAは、*S. pyogenes* Cas9 (SpCas9)、*S. aureus* Cas9 (SaCas9)、*N. meningitidis* Cas9 (NmCas9)、*C. jejuni* Cas9 (CjCas9)、及び*Geobacillus* Cas9 (GeoCas9) からなる群から選択されるCas9ヌクレアーゼに結合する。

【0044】

一実施形態では、Cas9は、活性が改変されたバリエーションCas9である。

【0045】

一実施形態では、バリエーションCas9は、Cas9ニックアーゼ (nC9)、触媒不活性型Cas9 (dCas9)、高精度Cas9 (HypaCas9)、高忠実度Cas9 (Cas9-HF)、特異性強化型Cas9 (eCas9)、及びPAM拡張型Cas9 (xCas9) からなる群から選択される。

20

【0046】

一実施形態では、Cas9のオフターゲット活性は、未修飾ガイドRNAと比較して低減される。

【0047】

一実施形態では、Cas9のオンターゲット活性は、未修飾ガイドRNAと比較して増加される。

30

【0048】

一態様において、本開示は、細胞内の標的遺伝子の発現を変化させる細胞内のゲノムの標的領域を編集する方法であって、上記列挙した実施形態のうちいずれかの保護オリゴヌクレオチドと、上記列挙した実施形態のうちいずれかの1つ以上のcrRNAと、1つ以上のtracrRNAと、RNA誘導型ヌクレアーゼまたはRNA誘導型ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを含むゲノム編集システムを上記細胞に投与すること、を含む方法を提供する。

【0049】

一実施形態では、標的遺伝子は、生物の細胞内にある。

【0050】

一実施形態では、標的遺伝子の発現は、ノックアウトまたはノックダウンされる。

40

【0051】

一実施形態では、RNA誘導型ヌクレアーゼまたはRNA誘導型ヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド、及び1つ以上のtracrRNAは、1つ以上のcrRNAまたは保護オリゴヌクレオチドの前に細胞に投与される。

【0052】

一実施形態では、crRNAは、下記からなる先行実施形態のいずれかの修飾パターンのcrRNA部分を含み：

mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#m

50

C # m U (c r R N A 2 0) 、

式中、 $r N = R N A$ 、 $m N = 2' - O - \text{メチル} R N A$ 、 $f N = 2' - \text{フルオロ} R N A$ 、 $N \# N = \text{ホスホロチオエート結合}$ 、及び $N = \text{任意のヌクレオチド}$ である。

【 0 0 5 3 】

一実施形態では、先行実施形態のうちいずれかの保護オリゴヌクレオチドは、下記の修飾パターンを含み：

m A m A m A m C m N m N m N m N m N (R C 0 1) ；

m A m A m A m A m C m N m N m N m N m N m N (R C 0 2) ；

m A m A m A m C m N m N m N m N m N m N m N (R C 0 3) ；

m A m A m A m A m C m N m N m N m N m N m N m N (R C 0 4) ；

10

m U m A m A m A m A m C m N m N m N m N m N m N m N (R C 0 5) ；

m A m A m A m A m C m N m N m N m N m N m N m N m N (R C 0 6) ；

m U m A m A m A m A m C m N m N m N m N m N m N m N m N (R C 0 7) ；

m C m U m A m A m A m A m C m N m N m N m N m N m N m N m N (R C 0 8) ；

m U m A m A m A m A m C m N m N m N m N m N m N m N m N m N (R C 0 9) ；

m C m U m A m A m A m A m C m N m N m N m N m N m N m N m N m N (R C 1 0) ；

m U # m A # m A m A m A m C m N m N m N m N m N # m N # m N (R C 0 7 - 2 P S) ；及び

m U # m A # m A # m A m A m C m N m N m N m N # m N # m N # m N (R C 0 7 - 3 P S) 、

20

式中、 $r N = R N A$ 、 $m N = 2' - O - \text{メチル} R N A$ 、 $N \# N = \text{ホスホロチオエート結合}$ 、及び $N = \text{任意のヌクレオチド}$ である。

【 0 0 5 4 】

特定の実施形態では、先行実施形態のうち任意の1つの保護オリゴヌクレオチドは、表1のRC01～10のうちいずれかから選択される保護オリゴヌクレオチド修飾パターンである。

【 0 0 5 5 】

特定の実施形態では、先行実施形態のうち任意の1つのc r R N Aは、表2のc r R N A 1～134のうちいずれかから選択されるc r R N A修飾パターンである。

【 0 0 5 6 】

一実施形態では、先行実施形態のうち任意の1つの保護オリゴヌクレオチド及び／またはc r R N Aは、それぞれ、リボース基、リン酸基、核酸塩基、またはこれらの組み合わせの修飾から独立して選択される1つ以上の追加の修飾ヌクレオチドをさらに含む。

30

【 0 0 5 7 】

特定の実施形態では、リボース基の各修飾は、 $2' - O - \text{メチル}$ 、 $2' - \text{フルオロ}$ 、 $2' - \text{デオキシ}$ 、 $2' - O - (2 - \text{メトキシエチル})$ (M O E)、 $4' - \text{チオ}$ 、二環式ヌクレオチド、ロックド核酸 (L N A)、 $2' - (S) - \text{制約エチル}$ (S - c E t)、制約M O E、及び $2' - O$ 、 $4' - C - \text{アミノメチレン架橋核酸}$ ($2'$ 、 $4' - B^N N A$) からなる群から独立して選択される。

【 0 0 5 8 】

特定の実施形態では、リン酸基の各修飾は、ホスホロチオエート、ホスホノ酢酸 (P A C E)、チオホスホノ酢酸 (t h i o P A C E)、アミド、トリアゾール、ホスホネート、またはホスホトリエステル修飾からなる群から独立して選択される。

40

【 0 0 5 9 】

特定の実施形態では、核酸塩基の各修飾は、 $2 - \text{チオウリジン}$ 、 $4 - \text{チオウリジン}$ 、 $N^6 - \text{メチルアデノシン}$ 、シュードウリジン、 2 、 $6 - \text{ジアミノプリン}$ 、イノシン、チミジン、 $5 - \text{メチルシトシン}$ 、 $5 - \text{置換ピリミジン}$ 、イソグアニン、イソシトシン、及びハロゲン化芳香族基からなる群から独立して選択される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 0 】

50

本開示の前述及び他の特徴及び利点は、以下の例証的实施形態の詳細な説明を添付図面と併せて読むことにより、より十分に理解される。本特許または出願書類は、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面（複数可）を含む本特許または特許出願公報の写しは、請求及び必要な手数料の支払いに応じて特許庁により提供される。

【0061】

【図1A】安定した細胞株、ならびに化学修飾 crRNA の活性及び安定性の概略図である。SpyCas9ヌクレアーゼ、tracrRNA、ならびに壊れた GFP 及びフレーム外の mCherry からなる蛍光レポーター遺伝子を発現する安定した HEK293T 細胞株の概略図である。GFP 配列を標的とする crRNA の電気穿孔により、フレームシフト変異が生じ、mCherry コード配列がフレーム内に配置される。

10

【図1B】安定した細胞株、ならびに化学修飾 crRNA の活性及び安定性の概略図である。SpyCas9 アデニン塩基エディタ (SpyCas9-ABE8e)、tracrRNA、及び GFP コード配列内に G から A へのナンセンス変異が存在する蛍光レポーター遺伝子を発現する安定した HEK293T 細胞株の概略図である。crRNA の電気穿孔により、変異を逆転させる A から G への編集によって GFP 蛍光が回復される。

【図1C】安定した細胞株、ならびに化学修飾 crRNA の活性及び安定性の概略図である。5×10⁴細胞あたり50ピコモルの crRNA を図1Aに示した安定した細胞株に電気穿孔することによって測定した異なる化学修飾 crRNA の活性を示す。電気穿孔の48時間後に細胞を回収し、mCherry 陽性細胞のパーセンテージを、FACS で定量化した。使用した crRNA 配列は、GAGACAAAUCAACCUGCCUCGGUUUUAGAGCUAUGCUCU であり、crRNA の化学修飾パターンについては、表2に列挙する。

20

【図1D】安定した細胞株、ならびに化学修飾 crRNA の活性及び安定性の概略図である。5×10⁴細胞あたり50ピコモルの crRNA を SpyCas9-ABE8e 及び tracrRNA を発現する安定したマウス Hepa1-6 細胞株に電気穿孔することによって測定した異なる化学修飾 crRNA の活性を示す。Sanger シーケンシング及び EditR 分析によって測定したデータである。

【図1E】安定した細胞株、ならびに化学修飾 crRNA の活性及び安定性の概略図である。図1Cで示した部分的に修飾された crRNA 及び完全に修飾された crRNA の安定性を示す。crRNA を 10% FBS で 1 μM の濃度まで希釈し、示した時間にわたって 37℃ でインキュベートし、その後、ホルムアミドローディング染料によって変性させ、10% 尿素-変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によって分画し、続いて染色した。

30

【0062】

【図2A】活性を損なうことなく crRNA の安定性を強化する保護オリゴを示す。C20 の代表的設計及び化学修飾（上部）、ならびに保護オリゴ（下部、RC01～RC10）を示す。C20 の化学修飾パターン及び保護オリゴを以下のように色分けした：緑色 = 2'-O-Me、赤色 = 2'-F、黒色 = 2'-OH、下線 = PS。

【図2B】活性を損なうことなく crRNA の安定性を強化する保護オリゴを示す。C20-保護オリゴ複合体の安定性を示す。C20 及び示した保護オリゴを等モル比で混合し、95℃ まで5時間加熱することによってアニールし、4℃ までゆっくりと冷却した（1秒あたり -0.1℃）。アニールした C20-保護オリゴ複合体を、10% FBS で 1 μM まで希釈し、示した時間にわたって 37℃ でインキュベートした。次に、RNA をホルムアミドによって変性させ、10% 変性尿素 PAGE によって分離した。

40

【図2C】活性を損なうことなく crRNA の安定性を強化する保護オリゴを示す。C20-保護オリゴ複合体の活性を示す。C20 及び示した保護オリゴを図2Bに記載のようにアニールした。次に、5×10⁴細胞あたり50ピコモルの crRNA を、図1Aに示した安定した細胞株を使用して電気穿孔した。電気穿孔の48時間後に細胞を回収し、mCherry のパーセンテージを、FACS で定量化した。

【0063】

50

【図3】*crRNA*の効力を強化する保護オリゴを示す。Aは、図1Aに示した安定した細胞株における、非飽和投与量でのC20-保護オリゴ複合体の活性を示す。Bは、図1Bに示した安定した細胞株における、非飽和投与量でのC20-保護オリゴ複合体の活性を示す。 5×10^4 細胞あたりのC20-保護オリゴ複合体のモル量を、x軸に示す。電気穿孔の48時間後に細胞を回収し、mCherryまたはGFP陽性細胞のパーセンテージを、FACSで定量化した。

【0064】

【図4A】*crRNA*活性を妨害することなく細胞取り込みを強化する保護オリゴの接合を示す。 5×10^4 細胞あたり50ピコモルの複合体を電気穿孔することによって図1Bに示した安定した細胞株内で測定した、接合を伴うC20-保護オリゴ複合体の活性を示す。C20の化学修飾パターン（「*crRNA*20」）については表2に列挙し、保護オリゴの化学修飾パターンRC10については表1に列挙する。電気穿孔の48時間後に細胞を回収し、mCherryまたはGFP陽性細胞のパーセンテージを、FACSで定量化した。

10

【図4B】*crRNA*活性を妨害することなく細胞取り込みを強化する保護オリゴの接合を示す。設計及び修飾、脂質接合（コレステロールはChol、ドコサヘキサエン酸はDHA、N-アセチルガラクトサミンはGalnacである）を伴う及び伴わない保護オリゴヌクレオチドの、GFP定量化による編集効率の概略図を示す。

【図4C】*crRNA*活性を妨害することなく細胞取り込みを強化する保護オリゴの接合を示す。線条体内注射後のマウスCNS（一群あたり $n=3$ マウス）におけるC20-保護オリゴ複合体の取り込みを示す。

20

【図4D】*crRNA*活性を妨害することなく細胞取り込みを強化する保護オリゴの接合を示す。Cy3標識*crRNA*（右）、保護オリゴを伴うCy3標識*crRNA*（中央）、及びコレステロール接合型保護オリゴを伴うCy3標識*crRNA*（左）の細胞取り込みを示す。オリゴヌクレオチドを、DMEM+3%FBSで $1.5 \mu\text{M}$ まで希釈し、次に、HEK293T細胞と混合した。細胞を8ウェルガラス底細胞培養チャンバースライド（SKU230118）にプレーティングし、一晚インキュベートした。次に、細胞培養培地をPBSと交換し、1滴のNucBlue（Hoechst 33342）を細胞培養液に添加し、撮像した。Leica蛍光顕微鏡で、40倍率で画像を取得した。

【0065】

30

【図5】保護オリゴを伴う及び伴わないC20の受動的取り込みによる編集効率を示す。GFP陽性細胞をFACSで定量化した。

【0066】

【図6】保護オリゴと*crRNA*との間の最適な二重鎖の安定性が、効率的な編集に必要である可能性があることを示す。図1Bに示した安定した細胞株における、C20-保護オリゴ複合体の活性を示す。C20及び示した保護オリゴを図1Aに記載のようにアニールした。次に、 5×10^4 細胞あたり50ピコモルの*crRNA*を、図1Aに示した安定した細胞株を使用して電気穿孔した。電気穿孔の48時間後に細胞を回収し、mCherryのパーセンテージを、FACSで定量化した。C20の化学修飾パターン及び保護オリゴを以下のように色分けした：緑色=2'-O-Me、赤色=2'-F、黒色=2'-OH、下線=PS、二重線=ロックド核酸（LNA）。

40

【0067】

【図7A】AAVと自己送達*crRNA*との共送達による成体マウスCNSにおける生体内ゲノム編集を示す。注射によるscAAV9を使用した成体マウスにおけるゲノム編集の免疫組織化学的検査（IHC）検出までプロセスを示す。これらの接合の編集効率を、抗EGFP抗体を使用して、IHC染色によって検査し、注射部位周辺の 1mm^2 の範囲内のEGFP陽性細胞のパーセンテージによって定量化した。

【図7B】AAVと自己送達*crRNA*との共送達による成体マウスCNSにおける生体内ゲノム編集を示す。図7Aの結果を示す。化学修飾パターンについては表1に列挙する。

50

【0068】

【図8A】エフェクター及び

【図8B】エフェクター及び

【図8C】エフェクター及びPM/PMを示す。

【図8D】エフェクター及びPM/PMマウスへのAAV送達の概略図を示す。まず、SpyCas9-ABE8e及び

【図8E】エフェクター及び

【図8F】エフェクター及び

【図8G】エフェクター及び

【0069】

【図9】生体内の編集効率に対する投与計画の最適化の効果を示す。Aは、反復crRNA投与計画を試験した実験的プロセスの概略図を示す。ROとは、後眼窩注射である。Bは、マウスPcsk9遺伝子を標的とするC20+RC07-GalNacの1日3回の連続した26mg/kg用量の注射の編集効率と比較した、AAV-SpyCas9-ABE-tracrRNAと単回の80mg/kg用量との共送達の編集効率を示す。マウスの肝臓のゲノムDNAの標的アンプリコンディープシーケンシングによって編集効率を測定した（一群あたりn=3マウス）。単回用量データは、図8Aに示したものと同等であった。データは、平均±SD、****=P<0.0001（二元配置ANOVA）を表している。

【0070】

【図10A】保護オリゴヌクレオチドを伴う及び伴わない、異なる配列を標的とするC20の効果を示す。HEK293T-SpyCas9-ABE-tracrRNA-dGFPレポーターでの、保護オリゴヌクレオチドを伴う及び伴わない、異なる配列を標的とするC20の用量反応曲線を示す。編集効率をFACSで定量化した。データは、平均±SD、ns=P>0.05、****=P<0.0001（二元配置ANOVA）を表している（多重比較でC20を対照として使用した）。

【図10B】保護オリゴヌクレオチドを伴う及び伴わない、異なる配列を標的とするC2

10

20

30

40

50

0の効果を示す。SpyCas9-ABE-tracrRNA-dGFPレポーターでの、14-mer保護オリゴを伴う及び伴わない完全に修飾されたcrRNA C40の、異なる投与量での編集効率を示す。左のパネルは、crRNA及び保護オリゴの化学修飾パターンを示している。データは、平均±SD、ns=P>0.05（二元配置ANOVA）を表している。

【発明を実施するための形態】

【0071】

重度にまたは完全に化学的に保護するオリゴヌクレオチドを含む保護オリゴヌクレオチドが本明細書で提供される。特定の実施形態では、5'及び／または3'接合部位を有する保護オリゴヌクレオチド及びcrRNAが提供される。CRISPRヌクレアーゼと共にゲノム編集に本開示の保護オリゴヌクレオチド及びcrRNAを使用する方法、ならびにその方法を実施するためのキットもまた提供される。

10

【0072】

本明細書で特に定義のない限り、本明細書に記載される、細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子学ならびにタンパク質及び核酸化学及びハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法は、当該技術分野において周知であり、一般的に使用されるものである。本明細書で提供される方法及び技術は、特に記載のない限り、一般に、当該技術分野においてよく知られている従来の方法に従って、また、本明細書全体を通して引用及び考察される一般的かつより具体的な様々な参考文献に記載されるように実施される。酵素反応及び精製技術は、特に明記のない限り、製造業者の仕様書に従って、当該技術分野において一般的に達成されるように、または本明細書に記載されるように実施される。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、ならびに医薬品化学及び製薬化学に関連して使用される命名法、ならびにその研究室手順及び技術は、特に明記のない限り、当該技術分野において周知であり、一般的に使用されるものである。化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤化、及び送達、ならびに患者の治療には、標準技術が使用される。

20

【0073】

本明細書で特に定義のない限り、本明細書で使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。何らかの潜在的な曖昧さがある場合、本明細書に提供する定義が、いかなる辞書または外部の定義よりも優先される。別段文脈によって要求されない限り、単数形用語は複数形を含むものとし、複数形用語は単数形を含むものとする。「または」の使用は、別段の指示がない限り、「及び／または」を意味する。「含む(including)」という用語、ならびに「含む(include)」及び「含まれる(included)」等の他の形態の使用は、限定的ではない。

30

【0074】

本開示がより容易に理解され得るように、特定の用語を最初に定義する。

【0075】

本明細書で使用される場合、「保護オリゴヌクレオチド」という用語は、crRNAとの相補性を含み、かつ保護オリゴヌクレオチドが結合していないcrRNAと比較して、結合すると、crRNAに増大されたヌクレアーゼ耐性を付与するオリゴヌクレオチドを指す。

40

【0076】

本明細書で使用される場合、「ガイドRNA」または「gRNA」という用語は、細胞内の標的配列（例えば、ゲノムまたはエピソーム配列）へのCas9など、RNA誘導型ヌクレアーゼの特異的会合（または「標的化」）を促進する任意の核酸を指す。

【0077】

本明細書で使用される場合、「モジュラー」または「デュアルRNA」ガイドとは、2つ以上の、典型的には2つの、別々のRNA分子、例えば、CRISPR RNA (crRNA) 及びトランス活性化crRNA (tracrRNA) を含むものであり、これらは、通常、例えば、二重鎖を形成することによって互いに関連する。gRNA及びそれら

50

の構成要素部分については、文献全体に記載されている（例えば、参照により援用される Briner et al. Mol. Cell, 56 (2), 333-339 (2014) を参照されたい）。

【0078】

本明細書で使用される場合、「単分子 gRNA」、「キメラ gRNA」、または「シングルガイド RNA (sgRNA)」は、単一の RNA 分子を含む。sgRNA は、一緒に連結された crRNA 及び tracrRNA であり得る。例えば、crRNA の 3' 末端は、tracrRNA の 5' 末端に連結され得る。crRNA 及び tracrRNA は、単一単分子またはキメラ gRNA に、例えば、crRNA (その 3' 末端で) 及び tracrRNA (その 5' 末端で) の相補性領域を架橋する 4 つのヌクレオチド (例えば、GAAA) 「テトラループ」または「リンカー」配列によって結合され得る。

10

【0079】

本明細書で使用される場合、「反復」配列または領域は、tracrRNA のアンチ反復配列と相補的な crRNA の 3' 末端の、またはその近くのヌクレオチド配列である。

【0080】

本明細書で使用される場合、「アンチ反復」配列または領域は、crRNA の反復配列と相補的な tracrRNA の 5' 末端の、またはその近くのヌクレオチド配列である。

【0081】

ゲノム編集のための gRNA/Cas9 複合体を含む、ガイド RNA 構造及び機能に関する追加の詳細については、少なくとも Mali et al. Science, 339 (6121), 823-826 (2013); Jiang et al. Nat. Biotechnol. 31 (3), 233-239 (2013); 及び Jinek et al. Science, 337 (6096), 816-821 (2012) (これらは、参照により本明細書に援用される) で確認することができる。

20

【0082】

本明細書で使用される場合、「ガイド配列」または「標的化配列」とは、単分子であるかまたはモジュラーであるかに関係なく、編集が所望される細胞のゲノム内の DNA 配列内の標的ドメインまたは標的ポリヌクレオチドと完全にまたは部分的に相補的な gRNA のヌクレオチド配列を指す。ガイド配列は、典型的には、10~30 ヌクレオチド長であり、好ましくは、16~24 ヌクレオチド長 (例えば、16、17、18、19、20、21、22、23 または 24 ヌクレオチド長) であり、かつ、Cas9 gRNA の 5' 末端に、またはその近くにある。

30

【0083】

本明細書で使用される場合、「標的ドメイン」または「標的ポリヌクレオチド配列」とは、gRNA のガイド配列と相補的な、細胞のゲノム内の DNA 配列である。

【0084】

標的化ドメインに加えて、gRNA は、典型的には、gRNA/Cas9 複合体の形成または活性に影響を与える複数のドメインを含む。例えば、前述のように、gRNA の第 1 及び第 2 相補性ドメインによって形成された二重鎖構造 (反復: アンチ反復二重鎖とも呼ばれる) は、Cas9 の認識 (REC) ロープと相互作用し、かつ、Cas9/gRNA 複合体の形成を媒介し得る (Nishimasu et al. Cell 156: 935-949 (2014); Nishimasu et al. Cell 162 (2), 1113-1126 (2015)、これらの両方は参照により本明細書に援用される)。第 1 及び/または第 2 相補性ドメインは、終止シグナルとして RNA ポリメラーゼが認識可能な 1 つ以上のポリ A トラクトを含有する場合があることに留意すべきである。したがって、第 1 及び第 2 相補性ドメインの配列は、これらのトラクトを排除して、gRNA の完全な生体外転写を促進するために、例えば、Briner 2014 で説明されているような A-G スワップ、または A-U スワップの使用を介して任意選択で修飾される。第 1 及び第 2 相補性ドメインに対するこれらの及び他の類似の修飾は、本開示の範囲内である。

40

50

【0085】

第1及び第2相補性ドメインに加えて、Cas9 gRNAは、典型的には、生体内でのヌクレアーゼ活性に必要であるが、生体外では必要のない2つ以上の追加の二重鎖領域を含む(Nishimasu 2015, 上記)。第2相補性ドメインの3'部分近くの第1ステムループは、「近位ドメイン」、「ステムループ1」(Nishimasu 2014, 上記; Nishimasu 2015, 上記)、及び「ネクサス」(Briner 2014, 上記)のように様々な名称で呼ばれる。1つ以上の追加のステムループ構造は、一般に、gRNAの3'末端近くに存在し、その数は種によって異なる。すなわち、S. pyogenes gRNAは、典型的には、2つの3'ステムループ(反復:アンチ反復二重鎖を含む合計4つのステムループ構造)を含むが、s. aureus及びその他の種は、1つのみ(合計3つ)を有する。種別の構築された保存ステムループ構造(及びより一般的にはgRNA構造)の説明については、参照により本明細書に援用されるBriner 2014にて提示されている。ガイドRNAに関する追加の詳細は、概して、参照により本明細書に援用されるWO2018026976A1で確認することができる。

10

【0086】

保護オリゴヌクレオチド

本発明者らは、驚くべきことに、保護オリゴヌクレオチドの使用により、crRNAに増大されたヌクレアーゼ耐性が付与されることを見出した。本明細書に記載の保護オリゴヌクレオチドは、crRNAとの相補性を含む。保護オリゴヌクレオチドは、結合すると、crRNAにヌクレアーゼ耐性を付与する。好ましい実施形態では、本明細書に記載の保護オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの未修飾リボース基を含有するcrRNAの領域に結合する。特定の実施形態では、保護オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の未修飾リボース基を含有するcrRNAの領域に結合する。

20

【0087】

特定の実施形態では、保護オリゴヌクレオチドは、約5〜約20ヌクレオチド長(例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド長)である。特定の実施形態では、保護オリゴヌクレオチドは、10、11、12、13、14、15、または16ヌクレオチド長である。保護オリゴヌクレオチドの長さは、保護オリゴヌクレオチドがそれとの相補性を含むcrRNAよりも短い(すなわち、保護オリゴヌクレオチドは、crRNAの領域との相補性を含み、ここで、上記領域は、crRNAの全長ではない)。

30

【0088】

特定の実施形態では、保護オリゴヌクレオチドは、crRNAに結合して、二重鎖を形成し、任意選択で、該保護オリゴヌクレオチドは、完全に化学修飾されていないcrRNAの領域に結合する。

【0089】

特定の実施形態では、二重鎖は、二重鎖の全長にわたって37°Cを超える融解温度(T_m)を有する。

40

【0090】

特定の実施形態では、二重鎖は、ガイド配列部分を含む相補性の領域にわたって37°C未満の融解温度(T_m)を有する。

【0091】

特定の実施形態では、crRNAのガイド配列部分へのtracrRNAの結合により、保護オリゴヌクレオチドがcrRNAから解離される。

【0092】

例示的な保護オリゴヌクレオチド配列を下記に列挙する。ここで、「N」は、任意のヌクレオチドに相当する。

A A A C N N N N N

50

A A A A C N N N N N
 A A A C N N N N N N
 A A A A C N N N N N N
 U A A A A C N N N N N N
 A A A A C N N N N N N
 U A A A A C N N N N N N
 C U A A A A C N N N N N N
 U A A A A C N N N N N N
 C U A A A A C N N N N N N

【0093】

10

化学修飾ガイドRNA及び保護オリゴヌクレオチド

本開示の保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNA（すなわち、crRNA及びtracrRNA）は、未修飾のまたは最小限に修飾された保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAと比較して、改善された生体内安定性、改善されたゲノム編集有効性、及び／または低減された免疫毒性を有する。

【0094】

本開示の保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、リボース基、リン酸基、核酸塩基、またはこれらの組み合わせの修飾を含む1つ以上の修飾ヌクレオチドを含有する。

【0095】

リボース基に対する化学修飾としては、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-O-(2-メトキシエチル) (MOE)、2'-NH₂ (2'-アミノ)、4'-チオ、2'-O-アリル、2'-O-エチルアミン、2'-O-シアノエチル、2'-O-アセタールエステル、または二環式ヌクレオチド、例えば、ロックド核酸 (LNA)、2'-(S)-制約エチル (S-cEt)、制約MOE、または2'-O、4'-C-アミノメチレン架橋核酸 (2', 4'-BN^{Me}C) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0096】

本明細書で使用される「4'-チオ」という用語は、リボースの糖環酸素が硫黄と置き換えられたリボース基修飾に相当する。

【0097】

リン酸基に対する化学修飾としては、ホスホロチオエート、ホスホノ酢酸 (PACE)、チオホスホノ酢酸 (thioPACE)、アミド、トリアゾール、ホスホネート、またはホストリエステル修飾が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0098】

一実施形態では、化学修飾ガイドRNAのcrRNA部分は、1~20個のホスホロチオエート修飾（すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のホスホロチオエート修飾）を含む。一実施形態では、化学修飾ガイドRNAのcrRNA部分は、1~20個のホスホロチオエート修飾（すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のホスホロチオエート修飾）を含み、かつ、ホスホロチオエート修飾を含まないガイドRNAと比較して、少なくとも約50%の活性（例えば、ホスホロチオエート修飾を含まないガイドRNAと比較して、50%の活性、60%の活性、70%の活性、80%の活性、90%の活性、95%の活性、または100%の活性）を含む。

40

【0099】

核酸塩基に対する化学修飾としては、2-チオウリジン、4-チオウリジン、N⁶-メチルアデノシン、シュドウリジン、2,6-ジアミノプリン、イノシン、チミジン、5-メチルシトシン、5-置換ピリミジン、イソグアニン、イソシトシン、またはハロゲン化芳香族基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0100】

化学修飾ガイドRNAは、モジュラーまたはデュアルRNAガイドではcrRNA部分

50

及び／または t r a c r R N A 部分に 1 つ以上の化学修飾を有し得る。化学修飾ガイド R N A はまた、単分子ガイド R N A ではシングルガイド R N A に 1 つ以上の化学修飾を有し得る。

【 0 1 0 1 】

保護オリゴヌクレオチド及びガイド R N A は、少なくとも約 5 0 % ～少なくとも約 1 0 0 % の化学修飾ヌクレオチド、少なくとも約 6 0 % ～少なくとも約 1 0 0 % の化学修飾ヌクレオチド、少なくとも約 7 0 % ～少なくとも約 1 0 0 % の化学修飾ヌクレオチド、少なくとも約 8 0 % ～少なくとも約 1 0 0 % の化学修飾ヌクレオチド、少なくとも約 9 0 % ～少なくとも約 1 0 0 % の化学修飾ヌクレオチド、及び少なくとも約 9 5 % ～少なくとも約 1 0 0 % の化学修飾ヌクレオチドを含んでよい。

10

【 0 1 0 2 】

保護オリゴヌクレオチド及びガイド R N A は、少なくとも約 5 0 % の化学修飾ヌクレオチド、少なくとも約 6 0 % の化学修飾ヌクレオチド、少なくとも約 7 0 % の化学修飾ヌクレオチド、少なくとも約 8 0 % の化学修飾ヌクレオチド、少なくとも約 9 0 % の化学修飾ヌクレオチド、少なくとも約 9 5 % の化学修飾ヌクレオチド、少なくとも約 9 9 % の化学修飾、または 1 0 0 % (完全) の化学修飾ヌクレオチドを含んでよい。

【 0 1 0 3 】

保護オリゴヌクレオチド及びガイド R N A は、少なくとも約 8 0 % 、 8 1 % 、 8 2 % 、 8 3 % 、 8 4 % 、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、 または 1 0 0 % の化学修飾ヌクレオチドを含んでよい。

20

【 0 1 0 4 】

少なくとも約 8 0 % の化学修飾ヌクレオチド～少なくとも約 9 9 % の化学修飾ヌクレオチドを含む保護オリゴヌクレオチド及びガイド R N A は、本明細書で使用される場合、「重度に」修飾されたと見なされる。

【 0 1 0 5 】

1 0 0 % の化学修飾ヌクレオチドを含む保護オリゴヌクレオチド及びガイド R N A は、本明細書で使用される場合、「完全に」修飾されたと見なされる。

【 0 1 0 6 】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイド R N A は、ヌクレオチドの約 5 0 % ～ヌクレオチドの約 1 0 0 % で、ヌクレオチドの約 6 0 % ～ヌクレオチドの約 1 0 0 % で、ヌクレオチドの約 7 0 % ～ヌクレオチドの約 1 0 0 % で、ヌクレオチドの約 8 0 % ～ヌクレオチドの約 1 0 0 % で、ヌクレオチドの約 9 0 % ～ヌクレオチドの約 1 0 0 % で、及びヌクレオチドの約 9 5 % ～ヌクレオチドの約 1 0 0 % で化学修飾リボース基を含んでよい。

30

【 0 1 0 7 】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイド R N A は、ヌクレオチドの約 5 0 % で、ヌクレオチドの約 6 0 % で、ヌクレオチドの約 7 0 % で、ヌクレオチドの約 8 0 % で、ヌクレオチドの約 9 0 % で、ヌクレオチドの約 9 5 % で、ヌクレオチドの約 9 9 % で、またはヌクレオチドの 1 0 0 % で化学修飾リボース基を含んでよい。

40

【 0 1 0 8 】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイド R N A は、ヌクレオチドの約 8 0 % 、 8 1 % 、 8 2 % 、 8 3 % 、 8 4 % 、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、 または 1 0 0 % で化学修飾リボース基を含んでよい。

【 0 1 0 9 】

化学修飾されたりボース基の少なくとも約 8 0 % ～化学修飾されたりボース基の少なくとも約 9 9 % を有する保護オリゴヌクレオチド及びガイド R N A は、本明細書で使用される場合、「重度に」修飾されたと見なされる。

【 0 1 1 0 】

50

100%の化学修飾されたリボース基を有する保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、本明細書で使用される場合、「完全に」修飾されたと見なされる。

【0111】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、ヌクレオチドの約50%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約60%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約70%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約80%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約90%～ヌクレオチドの約100%で、及びヌクレオチドの約95%～ヌクレオチドの約100%で化学修飾リン酸基を含んでよい。

【0112】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、ヌクレオチドの約50%で、ヌクレオチドの約60%で、ヌクレオチドの約70%で、ヌクレオチドの約80%で、ヌクレオチドの約90%で、ヌクレオチドの約95%で、ヌクレオチドの約99%で、またはヌクレオチドの100%で化学修飾リン酸基を含んでよい。

【0113】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、ヌクレオチドの約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%で化学修飾リン酸基を含んでよい。

【0114】

化学修飾されたリン酸基の少なくとも約80%～化学修飾されたリン酸基の少なくとも約99%を有する保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、本明細書で使用される場合、「重度に」修飾されたと見なされる。

【0115】

100%の化学修飾されたリン酸基を有する保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、本明細書で使用される場合、「完全に」修飾されたと見なされる。

【0116】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、ヌクレオチドの約50%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約60%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約70%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約80%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約90%～ヌクレオチドの約100%で、及びヌクレオチドの約95%～ヌクレオチドの約100%で化学修飾核酸塩基を含んでよい。

【0117】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、ヌクレオチドの約50%で、ヌクレオチドの約60%で、ヌクレオチドの約70%で、ヌクレオチドの約80%で、ヌクレオチドの約90%で、ヌクレオチドの約95%で、ヌクレオチドの約99%で、またはヌクレオチドの100%で化学修飾核酸塩基を含んでよい。

【0118】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、ヌクレオチドの約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%で化学修飾核酸塩基を含んでよい。

【0119】

化学修飾された核酸塩基の少なくとも約80%～化学修飾された核酸塩基の少なくとも約99%を有する保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、本明細書で使用される場合、「重度に」修飾されたと見なされる。

【0120】

100%の化学修飾された核酸塩基を有する保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、本明細書で使用される場合、「完全に」修飾されたと見なされる。

10

20

30

40

50

【0121】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、ヌクレオチドの約50%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約60%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約70%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約80%～ヌクレオチドの約100%で、ヌクレオチドの約90%～ヌクレオチドの約100%で、及びヌクレオチドの約95%～ヌクレオチドの約100%で化学修飾リボース基、化学修飾リン酸基、及び化学修飾核酸塩基の任意の組み合わせを含んでよい。

【0122】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、ヌクレオチドの約50%で、ヌクレオチドの約60%で、ヌクレオチドの約70%で、ヌクレオチドの約80%で、ヌクレオチドの約90%で、ヌクレオチドの約95%で、ヌクレオチドの約99%で、またはヌクレオチドの100%で化学修飾リボース基、化学修飾リン酸基、及び化学修飾核酸塩基の任意の組み合わせを含んでよい。

10

【0123】

特定の例示的な実施形態では、保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、ヌクレオチドの約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%で化学修飾リボース基、化学修飾リン酸基、及び化学修飾核酸塩基の任意の組み合わせを含んでよい。

【0124】

化学修飾されたリボース基、リン酸基、及び核酸塩基の任意の組み合わせの少なくとも約80%～化学修飾された核酸塩基の少なくとも約99%を有する保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、本明細書で使用される場合、「重度に」修飾されたと見なされる。

20

【0125】

化学修飾されたリボース基、リン酸基、及び核酸塩基の任意の組み合わせの100%を有する保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、本明細書で使用される場合、「完全に」修飾されたと見なされる。

【0126】

本開示の重度にかつ完全に化学修飾された保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、当技術分野において、最小限に修飾された保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAに優るいくつかの利点を有する。重度にかつ完全に化学修飾された保護オリゴヌクレオチド及びガイドRNAは、化学的合成を容易にし、さらに生体内安定性を高め、かつゲノム編集に対する臨床応用中の送達及び有効性を促進する末端付加化学的官能基に足場を提供することが予想される。

30

【0127】

ガイドRNAで使用される化学修飾パターンは、RNA誘導型DNAエンドヌクレアーゼ、例えば、Cas9と対になった場合にガイドRNAの活性が維持されるようなものである。

【0128】

一実施形態では、本開示の化学修飾ガイドRNAは、未修飾ガイドRNAと比較して、少なくとも約50%の活性（例えば、未修飾ガイドRNAと比較して、50%の活性、60%の活性、70%の活性、80%の活性、90%の活性、95%の活性、または100%の活性）を含む。

40

【0129】

ガイドRNAの活性は、当該技術分野において公知の任意の手段によって容易に決定することができる。一実施形態では、活性%は、後述の信号機レポーター（TLR）Multi-Cas Variant 1システム（TLR-MCV1）を用いて測定される。TLR-MCV1システムは、活性%の程度である蛍光細胞%を提供する。

【0130】

50

例示的な化学修飾パターンを、下記の表 1 及び表 2 に記載する。

【表 1】

表 1－保護オリゴヌクレオチドの例示的な化学修飾パターン

重要略語：	r N＝RNA、d N＝DNA、m N＝2'－O－メチルRNA、N＝A、U、G、またはC N # N＝ホスホロチオエート結合、1＝LNA修飾
名称	配列
RC01	mAmAmAmCmNmNmNmNmN
RC02	mAmAmAmAmCmNmNmNmNmN
RC03	mAmAmAmCmNmNmNmNmNmN
RC04	mAmAmAmAmCmNmNmNmNmNmN
RC05	mUmAmAmAmAmCmNmNmNmNmNmN
RC06	mAmAmAmAmCmNmNmNmNmNmNmN
RC07	mUmAmAmAmAmCmNmNmNmNmNmNmN
RC08	mCmUmAmAmAmAmCmNmNmNmNmNmNmN
RC09	mUmAmAmAmAmCmNmNmNmNmNmNmNmN
RC10	mCmUmAmAmAmAmCmNmNmNmNmNmNmNmN
RC07-2 PS	mU#mA#mAmAmAmCmNmNmNmNmNmN#mN#mN
RC07-3 PS	mU#mA#mA#mAmAmCmNmNmNmNmNmN#mN#mN#mN
RC07-4 xLNA	lU lAmAmAmAmCmNmNmNmNmNmNmN lN lN
RC07-2 xLNA	lUmAmAmAmAmCmNmNmNmNmNmNmNmN lN
RC07-d (TT)-DHA	mUmAmAmAmAmCmNmNmNmNmNmNmNmNd Td T-DHA
RC07-d (TT)-Teg Chol	mUmAmAmAmAmCmNmNmNmNmNmNmNmNd Td T-Teg Chol

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2 - c r RNA の例示的な化学修飾パターン

重要略語：	r N = RNA、m N = 2' - O - メチル RNA、f N = 2' - フルオロ RNA、a N = 2' - NH ₂ (2' - アミノ RNA)、s N = 4' - チオ RNA、d N = 2' - デオキシ RNA、N = A、U、G、または C N # N = ホスホロチオエート結合
名称	配列
c r RNA 1	m N # m N # m N # m N m N m N m N m N m N r N r N r N r N r N m N m N m N r N m N m G r U r U r U m U m A m G m A m G m C m U m A m U # m G # m C m U
c r RNA 2	r N r N r N r N r N r N m N m N m N m N r N r N r N r N r N r N r N r N r N m N m G r U r U r U r U r A m G m A m G m C m U m A m U # m G # m C m U
c r RNA 3	r N # r N # r N # r N r N r N m N m N m N m N r N r N r N r N r N r N r N r N m N m G r U r U r U r U r A m G m A m G m C m U m A m U # m G # m C m U
c r RNA 4	m N # m N # m N # m N m N m N m N m N m N r N r N r N r N r N r N r N r N m N m G r U r U r U r U r A m G m A m G m C m U m A m U # m G # m C # m U
c r RNA 5	r N # r N # r N # r N r N r N m N m N m N m N r N r N r N r N r N r N m N m N r N m N m G r U r U r U r U r A m G m A m G m C m U m A m U # m G # m C # m U
c r RNA 6	r N # r N # r N # r N r N r N m N m N m N m N r N r N r N r N r N r N r N r N m N m G r U r U r U m U m A m G m A m G m C m U m A m U # m G # m C # m U
c r RNA 7	m N # m N # m N # m N m N m N m N m N m N r N r N r N r N r N r N m N m N r N m N m G r U r U r U r U r A m G m A m G m C m U m A m U # m G # m C # m U
c r RNA 8	m N # m N # m N # m N m N m N m N m N m N r N r N r N r N r N r N r N r N m N m G r U r U r U m U m A m G m A m G m C m U m A m U # m G # m C # m U
c r RNA 9	m N # m N # m N # m N m N m N m N m N m N r N r N r N r N r N # r N # r N r N r N # m N m G r U # r U # r U # m U m A m G m A m G m C m U m A m U # m G # m C # m U

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【表 2 - 3】

c r RNA 2 4	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmN f N f N f N f N r N# f N f N f N r N#mNmG r U# r U# r U# f U f A m G m A m G m C m U m A m U#mG#mC# mU
c r RNA 2 5	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmN f N f N f N f N r N# r N# f N f N f N mNmG r U# r U# r U# f U f A m G m A m G m C m U m A m U#mG#mC# mU
c r RNA 2 6	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmN f N f N f N f N r N# r N# f N f N r N#mNmG f U r U# r U# f U f A m G m A m G m C m U m A m U#mG#mC# mU
c r RNA 2 7	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmN f N f N f N f N r N# r N# f N f N r N#NAmG r U# f U r U# f U f A m G m A m G m C m U m A m U#mG#mC# mU
c r RNA 2 8	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmN f N f N f N f N r N# r N# f N f N r N#mNmG r U# r U# r U f U f A m G m A m G m C m U m A m U#mG#mC# Mu
c r RNA 2 9	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmN f N f N f N f N r N# f N f N f N f N mNmG f U f U f U f U f A m G m A m G m C m U m A m U#mG#mC#mU
c r RNA 3 0	mN#mN#mN# r N r N r N mNmNmNmNmN r N r N r N r N r N r N r N r N mNmG r U r U r U r U r A m G m A m G m C m U m A m U#mG#mC#mU
c r RNA 3 1	mN#mN#mN# r N r N r N mNmNmNmNmNmN r N r N r N r N r N r N r N mNmG r U r U r U r U r A m G m A m G m C m U m A m U#mG#mC#mU
c r RNA 3 2	mN#mN#mN# r N r N r N mNmNmNmNmNmN r N mNmN r N r N r N r N r N mNmG r U r U r U r U r A m G m A m G m C m U m A m U#mG#mC#mU
c r RNA 3 3	mN#mN#mN# r N# r N# r N#mNmNmNmN r N# r N# r N# r N# r N# r N# r N# r N# r N#m NmG r U# r U# r U# r U# r A#mGmA m G m C m U m A m U#mG#mC#mU

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

c r RNA 3 4	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mNmNmNmNr N#rN#rN#rN#rN#rN#rN#rN#rN#m NmGrUrUrUrUrAmGmAmGmCmUmAmU #mG#mC#mU
c r RNA 3 5	mN#mN#mN#rNrNrNmNmNmNmNrNrN rNrNrNrNrNrNmNmGrUrUrUmUm AmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
c r RNA 3 6	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mNmNmNmNr N#rN#rN#rN#rN#rN#rN#rN#rN#m NmGrUrUrUmUmAmGmAmGmCmUmAmU #mG#mC#mU
c r RNA 3 7	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU# rU#rU#mUmAmGmAmGmCmUmAmU#mG #mC#mU
c r RNA 3 8	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU# rU#rU#mUmAmGmAmGmCmUmAmU#mG #mC#mU
c r RNA 3 9	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mNmNmNmNf NfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUfU fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
c r RNA 4 0	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf NfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUfU fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
c r RNA 4 1	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNfNfN fNfNdN#dN#fNfNdN#mNmGrU#rU# rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC #mU
c r RNA 4 2	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNfNfN fNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGdU#dU# dU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC #mU

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【表 2 - 6】

c r RNA 5 2	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf NfNfNfNfNfN#fN#fNfNfN#mNmGfU# fU#fU#fU#fA#mGmAmGmCmUmAmU# mG#mC#mU
c r RNA 5 3	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mN#mNmNmN fNfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUf UfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#m U
c r RNA 5 4	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmN#mNmN fNfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUf UfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#m U
c r RNA 5 5	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmN#mN fNfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUf UfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#m U
c r RNA 5 6	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmN# fNfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUf UfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#m U
c r RNA 5 7	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf N#fNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUf UfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#m U
c r RNA 5 8	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf NfN#fNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUf UfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#m U
c r RNA 5 9	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf NfNfN#fNfNfNfNfNfNmNmGfUfUf UfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#m U
c r RNA 6 0	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf NfNfNfN#fNfNfNfNfNmNmGfUfUf UfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#m U

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【表 2 - 8】

c r RNA 7 0	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf NfNfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUfU fUfAmGmAmGmCmUmA#mU#mG#mC#m U
c r RNA 7 1	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mN#mN#mN# mNfNfNfNfNfNfN#fN#fNfNfN#mNmG fU#fU#fU#fU#fA#mGmAmGmCmUmA mU#mG#mC#mU
c r RNA 7 2	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmN# fN#fN#fNfNfN#fN#fNfNfN#mNmG fU#fU#fU#fU#fA#mGmAmGmCmUmA mU#mG#mC#mU
c r RNA 7 3	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf NfNfN#fN#fN#fN#fNfNfN#mNmGf U#fU#fU#fU#fA#mGmAmGmCmUmAm U#mG#mC#mU
c r RNA 7 4	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf NfNfNfNfN#fN#fN#fN#fN#mNmGf U#fU#fU#fU#fA#mGmAmGmCmUmAm U#mG#mC#mU
c r RNA 7 5	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf NfNfNfNfN#fN#fNfNfN#mN#mGfU #fU#fU#fU#fA#mGmAmGmCmUmAmU #mG#mC#mU
c r RNA 7 6	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mN#mN#mN# mNfNfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUf UfUfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC #mU
c r RNA 7 7	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mN#mN#mN# mN#fN#fN#fNfNfNfNfNfNfNmNmG fUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG #mC#mU
c r RNA 7 8	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mN#mN#mN# mN#fN#fN#fN#fN#fN#fN#fNfNfN mNmGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAm U#mG#mC#mU

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【表 2 - 1 0】

c r RNA 8 8	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mN#mN#mN# mN#fNfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfU fUfUfUfUfAmGmAmG#mC#mU#mA#mU# mG#mC#mU
c r RNA 8 9	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mN#mN#mN# mN#fN#fN#fNfNfNfNfNfNfNmNmG fUfUfUfUfAmG#mA#mG#mC#mU#mA #mU#mG#mC#mU
c r RNA 9 0	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mN#mN#mN# mN#fN#fN#fN#fN#fNfNfNfNmNm mGfUfUfUfU#fA#mG#mA#mG#mC#m U#mA#mU#mG#mC#mU
c r RNA 9 1	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mN#mN#mN# mN#fN#fN#fN#fN#fN#fNfNfN mNmGfUfU#fU#fU#fA#mG#mA#mG# mC#mU#mA#mU#mG#mC#mU
c r RNA 9 2	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mN#mN#mN# mN#fN#fN#fN#fN#fN#fN#fN# fN#mNmGfU#fU#fU#fU#fA#mG#mA #mG#mC#mU#mA#mU#mG#mC#mU
c r RNA 9 3	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mN#mN#mN# mN#fN#fN#fN#fN#fN#fN#fN# fN#mN#mG#fU#fU#fU#fU#fA#mG# mA#mG#mC#mU#mA#mU#mG#mC#mU
c r RNA 9 4	mN#mN#mN#mN#mN#mN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU# rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG #mC#mU
c r RNA 9 5	mN#mN#mN#mN#mN#mN#mNmNmNmN fNfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU #rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#m G#mC#mU
c r RNA 9 6	mN#mN#mN#mN#mN#mN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU# rU#rU#fUfAmGmAmGmC#mUmAmU#m G#mC#mU

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 1】

c r RNA 9 7	mN#mN#mN#mN#mN#mN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU# rU#rU#fUfAmGmAmGmCmU#mA#mU#m G#mC#mU
c r RNA 9 8	mN#mN#mN#mN#mN#mN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU #rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmA#mU# mG#mC#mU
c r RNA 9 9	mN#mN#mN#mN#mN#mN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU# rU#rU#fU#fA#mGmAmGmCmUmAmU# mG#mC#mU
c r RNA 1 0 0	mN#mN#mN#mN#mN#mN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU# rU#rU#fU#fA#mGmAmGmC#mU#mA# mU#mG#mC#mU
c r RNA 1 0 1	mN#mN#mN#mN#mN#mN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU# rU#rU#fU#fA#mG#mA#mG#mCmUmA mU#mG#mC#mU
c r RNA 1 0 2	mN#mN#mN#mN#mN#mN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmG#rU #rU#rU#fU#fA#mGmAmGmCmUmAmU #mG#mC#mU
c r RNA 1 0 3	mN#mN#mN#mN#mN#mN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU# rU#rU#fUfAmGmAmGmC#mU#mA#mU #mG#mC#mU
c r RNA 1 0 4	mN#mN#mN#mN#mN#mN#mNmNmNmNf NfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU# rU#rU#fUfA#mG#mA#mG#mC#mU#m A#mU#mG#mC#mU
c r RNA 1 0 5	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mN#mNmNmN fNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUf UfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#m U

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 2】

c r RNA 1 0 6	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mNmNmNmNf NfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUfU fUfAmGmAmGmCmUmA#mU#mG#mC#m U
c r RNA 1 0 7	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mNmNmNmNf NfNfNfNfN#fN#fN#fN#fN#mNmGf U#fU#fU#fU#fA#mGmAmGmCmUmAm U#mG#mC#mU
c r RNA 1 0 8	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mNmNmNmNf NfNfNfNfN#fN#fNfNfN#mNmGfU# fU#fU#fU#fA#mGmAmGmC#mU#mA# mU#mG#mC#mU
c r RNA 1 0 9	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mNmNmNmNf NfNfNfNfN#fN#fNfNfN#mNmGfU# fU#fU#fU#fA#mG#mA#mG#mCmUmA mU#mG#mC#mU
c r RNA 1 1 0	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mNmNmNmNf NfNfNfNfN#fN#fNfNfN#mNmG#fU #fU#fU#fU#fA#mGmAmGmCmUmAmU #mG#mC#mU
c r RNA 1 1 1	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mNmNmNmNf NfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUfU fUfAmGmAmGmC#mU#mAmU#mG#mC# mU
c r RNA 1 1 2	mN#mN#mN#rN#rN#rN#mNmNmNmNf NfNfNfNfNfNfNfNfNmNmGfUfUfU fUfA#mG#mA#mG#mC#mU#mAmU#mG #mC#mU
c r RNA 1 1 3	mN#mN#mN#dN#dN#dN#mNmNmNmNf NfNfNfNdN#dN#fNfNdN#mNmGdU# dU#dU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG #mC#mU
c r RNA 1 1 4	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfN fNfNrN#rN#fNfNaNmNmGaUaUaUf UfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 3】

c r RNA 1 1 5	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfNfNfNrN#rN#fNfNaNmNmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
c r RNA 1 1 6	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGaUrU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
c r RNA 1 1 7	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU#aUrU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
c r RNA 1 1 8	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU#rU#aUfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
c r RNA 1 1 9	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfNfNfNrN#rN#fNfNsN#mNmGsU#sU#sU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
c r RNA 1 2 0	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfNfNfNrN#rN#fNfNsNmNmGsUsUsUfUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
c r RNA 1 2 1	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfNfNfNrN#rN#fNfNsNmNmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
c r RNA 1 2 2	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGsUrU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
c r RNA 1 2 3	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfNfNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGrU#sUrU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【表 2 - 1 5】

c r RNA 1 3 3	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfN fNfNrN#aN#fNfNaN#mNmGrU#rU# rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC #mU
c r RNA 1 3 4	mN#mN#mN#mNmNmNmNmNmNmNmNfNfN fNfNrN#rN#fNfNrN#mNmGaUaUaU fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU

10

【0131】

上記表 2 に列挙されている例示的な c r RNA の最初の 20 個のヌクレオチドの塩基配列が特定の標的に向けられていることは当業者であれば理解されるであろう。この 20 個のヌクレオチド塩基配列は、標的核酸に基づいて変更され得るが、化学修飾は同じままである。5' から 3' への例示的な未修飾 c r RNA 配列は、NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGC U (配列番号 1) であり、式中、「N」は、任意のヌクレオチド（例えば、A、U、G、または C）に対応する。5' から 3' への例示的な未修飾 t r a c r RNA 配列は、AGCAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU (配列番号 2) である。

20

【0132】

さらに、ガイド配列は、10～30ヌクレオチド長であり、好ましくは、16～24ヌクレオチド長（例えば、16、17、18、19、20、21、22、23または24ヌクレオチド長）であり、かつ、Cas9 gRNA の 5' 末端に、またはその近くにあることを当業者であれば理解されるであろう。

【0133】

化学修飾 c r RNA 及び t r a c r RNA を含む化学修飾ガイド RNA については、それぞれが参照により本明細書に援用される US 20210363518 及び US 20210388348 にてさらに詳細に記載されている。

30

【0134】

本明細書に記載の保護オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの未修飾リボース基を含有する c r RNA 修飾パターンの任意の領域に結合し、それにより、c r RNA にヌクレアーゼ耐性を付与するように設計されてよい。

【0135】

高親和性反復／アンチ反復ガイド RNA 修飾

c r RNA 及び t r a c r RNA は、c r RNA の反復領域と t r a c r RNA のアンチ反復領域との間に二重鎖を形成することによって、一緒にハイブリダイズする。特定の実施形態では、モジュラー、またはデュアル RNA、ガイド RNA は、2 つの領域間の親和性を高めて、より強い二重鎖を形成するように、反復領域及びアンチ反復領域に修飾が加えられる。

40

【0136】

高親和性相互作用は、反復領域及びアンチ反復領域により形成される二重鎖中の GC ヌクレオチド含有量を増加させることによって、強化され得る。2'-フルオロ及び 2'-オームethyl修飾などのヌクレオチド修飾もまた、導入され得、これにより、二重鎖の融解温度 (T_m) が上昇する。さらなる修飾は、直交性ヌクレオチド及び天然に存在しないヌクレオチドの使用を含む。本明細書に記載の種々の反復領域／アンチ反復領域修飾は、二重鎖の安定性を強化し、c r RNA 及び t r a c r RNA が最適以下の構造に折り畳まれるのを防ぐのを助け、ゆえに、より高いゲノム編集有効性を促進する。

50

【0137】

接合

本開示の保護オリゴヌクレオチド及び／またはcrRNAは、末端接合部位を用いて修飾され得る。本明細書で使用される場合、「末端接合部位」または「部位」とは、crRNA及び保護オリゴヌクレオチドの5'及び／または3'末端に連結または結合され得る化合物を指す。末端接合部位は、安定性を強化し、細胞膜を透過する能力を強化し、細胞取り込みを増加させ、生体内の循環時間を延長し、細胞特異的指示試薬として作用し、及び／または、細胞取り込みまたは組織特異的取り込みをモニタリングする手段を提供することができる。

【0138】

特定の実施形態では、末端接合部位は、crRNAの5'末端に接合される。特定の実施形態では、末端接合部位は、crRNAの3'末端に接合される。特定の実施形態では、末端接合部位は、保護オリゴヌクレオチドの5'末端に接合される。特定の実施形態では、末端接合部位は、保護オリゴヌクレオチドの3'末端に接合される。

【0139】

特定の例示的な実施形態では、末端接合部位としては、脂肪酸、ステロイド、セコステロイド、脂質、ガングリオシド類似体、ヌクレオシド類似体、内在性カンナビノイド、ビタミン、受容体リガンド、ペプチド、アプタマー、アルキル鎖、蛍光体、抗体、核局在化シグナルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

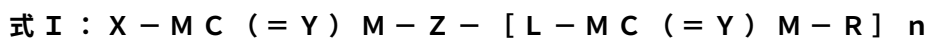
【0140】

特定の例示的な実施形態では、末端接合部位としては、コレステロール、コレステロールトリエチレングリコール(TEGChol)、ドコサヘキサエン酸(DHA)、ドコサン酸(DCA)、リトコール酸(LA)、GalNAc、両親媒性ブロックコポリマー(ABC)、親水性ブロックコポリマー(HBC)、ポロキサマー、Cy5、Cy3などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0141】

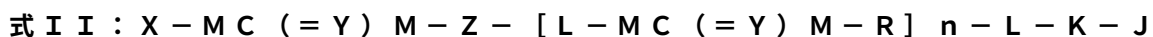
特定の例示的な実施形態では、少なくとも1つの末端接合部位は、分枝状脂質(式Iに示される構造など)または頭部修飾脂質(式IIに示される構造など)を含む、修飾脂質である。

【0142】



式中、Xは、脂質をガイドRNAに連結する部位であり、各Yは、独立して、酸素または硫黄であり、各Mは、独立して、CH₂、NH、O、またはSであり、Zは、2つまたは3つの(「n」)鎖が構造の残部に結合することを可能にする分岐基であり、Lは、任意のリンカー部位であり、かつ各Rは、独立して、2~30原子長の飽和、モノ不飽和、もしくは多価不飽和の直鎖状もしくは分枝状部位、ステロール、またはその他の疎水基である。

【0143】



式中、Xは、脂質をガイドRNAに連結する部位であり、各Yは、独立して、酸素または硫黄であり、各Mは、独立して、CH₂、NH、N-アルキル、O、またはSであり、Zは、2つまたは3つの(「n」)鎖が構造の残部に結合することを可能にする分岐基であり、各Lは、独立して、任意のリンカー部位であり、かつRは、2~30原子長の飽和、モノ不飽和、もしくは多価不飽和の直鎖状もしくは分枝状部位、ステロール、またはその他の疎水基であり、Kは、リン酸塩、硫酸塩、またはアミドであり、かつJは、アミノアルカン、または第四級アミノアルカン基である。

【0144】

部位は、リンカーを介してガイドRNAの末端ヌクレオチドに結合され得る。例示的なリンカーとしては、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ポリペプチド、多糖、ブロックコポリマーなどが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0145】

特定の実施形態では、部位は、RC01～RC10（すなわち、RC01、RC02、RC03、RC04、RC05、RC06、RC07、RC08、RC09、またはRC10）のうち任意の1つの5'末端及び／または3'末端に接合される。

【0146】

化学修飾シングルガイドRNA

本明細書に記載されるように、本開示の化学修飾ガイドRNAは、crRNAの3'末端をtracrRNAの5'末端に連結することによって、シングルガイドRNA（sgRNA）として構築され得る。リンカーは、化学修飾オリゴヌクレオチドグループを含むオリゴヌクレオチドグループであってよい。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドグループは、GAAAテトラループを含む。リンカーは、エチレングリコールオリゴマーを含むがこれらに限定されない非ヌクレオチド化学リンカーであってもよい（例えば、Pils et al. Nucleic Acids Res. 28(9):1859-1863(2000)を参照されたい）。

【0147】

RNA誘導型ヌクレアーゼ

本開示によるRNA誘導型ヌクレアーゼには、限定はされないが、Cas9などの天然に存在するII型CRISPRヌクレアーゼだけではなく、それから誘導または得られる他のヌクレアーゼが含まれる。本開示で使用され得る例示的なCas9ヌクレアーゼとしては、S. pyogenes Cas9（SpCas9）、S. aureus Cas9（SaCas9）、N. meningitidis Cas9（NmCas9）、C. jejuni Cas9（CjCas9）、及びGeobacillus Cas9（GeoCas9）が挙げられるが、これらに限定されない。機能用語では、RNA誘導型ヌクレアーゼは、(a) gRNAと相互作用し（例えば、gRNAと複合体を形成し）、かつ (b) gRNAと一緒に、(i) gRNAの標的化ドメインと相補的な配列と、任意選択で(ii)下記にてより詳細に記載される「プロトスペーサー隣接モチーフ」または「PAM」と呼ばれる追加の配列とを含むDNAの標的領域と会合し、かつ任意選択で該標的領域を切断または修飾するヌクレアーゼとして定義される。下記の実施例で例示するように、RNA誘導型ヌクレアーゼは、同じPAM特異性または切断活性を共有する個々のRNA誘導型ヌクレアーゼの間に変形が存在し得る場合であっても、それらのPAM特異性及び切断活性によって、幅広い用語で定義される場合がある。当業者は、本開示のいくつかの態様が、特定のPAM特異性及び／または切断活性を有する任意の好適なRNA誘導型ヌクレアーゼを使用して実装可能なシステム、方法及び組成物に関連することを理解するであろう。このために、特に明記しない限り、RNA誘導型ヌクレアーゼという用語は、総称として理解されるべきであり、任意の特定のタイプ（例えば、Cas9対Cpf1）、種（例えば、S. pyogenes対S. aureus）、または変形（例えば、完全長対切断型または分割型；天然に存在するPAM特異性対操作されたPAM特異性）に限定されない。

【0148】

種々のRNA誘導型ヌクレアーゼは、PAMとプロトスペーサーとの異なる連続関係を必要とし得る。一般的に、Cas9は、上部鎖または相補鎖に対して視覚化されるようなプロトスペーサーの5'であるPAM配列を認識する。

【0149】

PAM及びプロトスペーサーの特定の連続配向を認識することに加えて、RNA誘導型ヌクレアーゼは、一般に、特定のPAM配列を認識する。S. aureus Cas9は、例えば、NNGRRTのPAM配列を認識し、ここで、N配列は、gRNA標的化ドメインによって認識される領域のすぐ3'側にある。S. pyogenes Cas9は、NGG PAM配列を認識する。操作されたRNA誘導型ヌクレアーゼは、類似のヌクレアーゼ（RNA誘導型ヌクレアーゼがそれに由来する天然に存在するバリエーション、または操作されたRNA誘導型ヌクレアーゼに対して最大のアミノ酸配列相同性を有する天然に

存在するバリエーションなど)のPAM特異性とは異なるPAM特異性を有することができることにも留意すべきである。代替のPAM配列を認識する修飾Cas9については、後述する。

【0150】

RNA誘導型ヌクレアーゼはまた、それらのDNA切断活性を特徴とする。すなわち、天然に存在するRNA誘導型ヌクレアーゼは、典型的には、標的核酸でDSBを形成するが、SSBのみを生成する(上述した、本明細書に参照として援用されるRan 2013も参照されたい)か、全く切断をしない操作されたバリエーションがこれまでに作製されている。

【0151】

RNA誘導型ヌクレアーゼCas9は、活性が改変されたCas9のバリエーションであり得る。例示的なバリエーションCas9ヌクレアーゼとしては、Cas9ニッカーゼ(nCas9)、触媒不活性型Cas9(dCas9)、高精度Cas9(HypaCas9)(Chen et al. Nature, 550 (7676), 407-410 (2017))、高忠実度Cas9(Cas9-HF)(Kleinstiver et al. Nature 529 (7587), 490-495 (2016))、特異性強化型Cas9(eCas9)(Slaymaker et al. Science 351 (6268), 84-88 (2016))、及びPAM拡張型Cas9(xCas9)(Hu et al. Nature doi:10.1038/nature26155 (2018))が挙げられるが、これらに限定されない。

【0152】

RNA誘導型ヌクレアーゼを本開示の化学修飾ガイドRNAと組み合わせて、ゲノム編集システムを形成してもよい。RNA誘導型ヌクレアーゼを化学修飾ガイドRNAと組み合わせて、ゲノム編集が所望される細胞に送達され得るRNP複合体を形成してもよい。RNA誘導型ヌクレアーゼは、化学修飾ガイドRNAが別々に送達される状態で、ゲノム編集が所望される細胞で発現され得る。例えば、RNA誘導型ヌクレアーゼは、ベクターまたは合成mRNAなどのポリヌクレオチドから発現され得る。ベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターまたはレンチウイルス(LV)ベクターを含むがこれらに限定されない、ウイルスベクターであってよい。

【0153】

本明細書に開示された実施形態の範囲から逸脱することなく、適当な均等物を使用して、本明細書に記載された方法の他の好適な修正及び適合を行うことができることは、当業者には容易に明らかであろう。ここまで特定の実施形態を詳細に説明してきたが、実施形態は、以下の実施例を参照することにより、より明確に理解されるであろう。実施例は、例示のみを目的に含まれるものであり、限定を意図するものではない。

【実施例】

【0154】

実施例1-化学修飾crRNA及びtracrRNAのゲノム編集効率

crRNAの特定の化学修飾とSpyCas9/塩基エディタ(BE)活性との相溶性を試験するために、細胞株がSpyCas9または塩基エディタのいずれか、tracrRNA、及び蛍光性レポーター遺伝子を安定して発現するが(図1A、及び図1B)、crRNAを発現しないシナリオを確立した。まず、安定した細胞株への電気穿孔法によって、以前に設計された異なる化学修飾crRNA(参照により本明細書に援用されるWO 2019/183000 A1及びWO 2021/231606 A2に記載されている)の活性をスクリーニングし、蛍光活性化細胞選別(FACS)を使用して蛍光陽性細胞(編集活性について報告する)のパーセンテージを定量化した。末端修飾C0 crRNAと比較して、重度に修飾されたC20は、大幅な活性の強化を示したが、その一方で、完全に修飾されたcrRNAの全ては、活性の低減を示した(図1C)。種々の内在性ゲノム遺伝子座を標的とするcrRNAを使用して、この結論をさらに確認した(図1D)。次に、重度に修飾されたcrRNA及び完全に修飾されたcrRNAの安定性を、そ

10

20

30

40

50

れらをウシ胎児血清（FBS）と共にインキュベートすることによって比較した。完全に修飾されたcrRNAのみが、FBS中で安定であることが判明した（図1E）。C20が3'-ホスホロチオエートを含む6つのリボース残基を有し、ホスホロチオエート修飾により、未修飾リン酸塩連結と比較して安定性が改善されるが、実質的な分解が依然として生じることに注目する。したがって、本発明の最も活性なCRISPRガイド（C20）には、さらなる安定化が必要である。

【0155】

実施例で使用した保護オリゴヌクレオチドを、下記表3に列挙する。下記表4に、実施例で使用したcrRNAを列挙する。

【表3-1】

表3. 例示的な保護オリゴヌクレオチド

重要略語：	rN=RNA、mN=2'-O-メチルRNA、fN=2'-フルオロRNA、aN=2'-NH ₂ （2'-アミノRNA）、sN=4'-チオRNA、dN=2'-デオキシRNA、N=A、U、G、またはC N#N=ホスホロチオエート結合
名称	配列
RC04_M CV1a	mAmAmAmAmCmCmGmAmGmGmCmA
RC05_M CV1a	mUmAmAmAmAmCmCmGmAmGmGmCmA
RC06_M CV1a	mAmAmAmAmCmCmGmAmGmGmCmAmG
RC07_M CV1a	mUmAmAmAmAmCmCmGmAmGmGmCmAmG
RC08_M CV1a	mCmUmAmAmAmAmCmCmGmAmGmGmCmAmG
RC09_M CV1a	mUmAmAmAmAmCmCmGmAmGmGmCmAmGmG
RC10_M CV1a	mCmUmAmAmAmAmCmCmGmAmGmGmCmAmGmG
RC07_M CV1a-TegChol	mUmAmAmAmAmCmCmGmAmGmGmCmAmG-TegChol
RC07_M CV1a-dT-TegChol	mUmAmAmAmAmCmCmGmAmGmGmCmAmGdTdT-TegChol
RC07_M CV1a-4xLNA	lUlAmAmAmAmCmCmGmAmGmGmClAlG
RC07_M CV1a-2xLNA	lUmAmAmAmAmCmCmGmAmGmGmCmA lG

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

Cy5-RC 07__MCV 1a-Te g Chol	Cy5-mUmAmAmAmAmCmCmGmAmGmGm CmAmG-Te gChol
RC07__d GFP	mUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAmUm G
RC08__d GFP	mCmUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAm UmG
RC09__d GFP	mUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAmUm GmA
RC10__d GFP	mCmUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAm UmGmA
RC07-G a1Nac__ dGFP	mUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAmUm G-Ga1Nac
RC08-G a1Nac__ dGFP	mCmUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAm UmG-Ga1Nac
RC09-G a1Nac__ dGFP	mUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAmUm GmA-Ga1Nac
RC10-G a1Nac__ dGFP	mCmUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAm UmGmA-Ga1Nac
RC07-D HA__dGF P	mUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAmUm G-DHA v1
RC08-D HA__dGF P	mCmUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAm UmG-DHA v1
RC09-D HA__dGF P	mUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAmUm GmA-DHA v1
RC10-D HA__dGF P	mCmUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAm UmGmA-DHA v1

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

RC07-d T-DHA__ dGFP	mUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAmUm GdTdT-TDHA v 1
RC08-d T-DHA__ dGFP	mCmUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAm UmGdTdT-TDHA v 1
RC09-d T-DHA__ dGFP	mUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAmUm GmAdTdT-TDHA v 1
RC10-d T-DHA__ dGFP	mCmUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAm UmGmAdTdT-TDHA v 1
RC07-T egChol __dGFP	mUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAmUm G-TegChol
RC08-T egChol __dGFP	mCmUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAm UmG-TegChol
RC07-d T-TegC hol__dG FP	mUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAmUm GdTdT-TegChol
RC08-d T-TegC hol__dG FP	mCmUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAm UmGdTdT-TegChol
RC09-d T-TegC hol__dG FP	mUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAmUm GmAdTdT-TegChol
RC10-d T-TegC hol__dG FP	mCmUmAmAmAmAmCmAmCmCmAmCmAm UmGmAdTdT-TegChol
RC07-2 PS__dGF P	mU#mA#mAmAmAmCmAmCmCmAmCmA# mU#mG

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

RC07-3 PS__dGFP	mU#mA#mA#mAmAmCmAmCmCmAmC#m A#mU#mG
RC07-d T__2PS- TegChol l__dGFP	mU#mA#mAmAmAmCmAmCmCmAmCmA# mU#mGdTdT-TegChol
RC07-2 PS-Teg Chol__d GFP	mU#mA#mAmAmAmCmAmCmCmAmCmA# mU#mG-TegChol

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4. 例示的な c r RNA

重要略語：	r N=RNA、m N=2' -O-メチルRNA、f N=2' -フルオロRNA、a N=2' -NH ₂ (2' -アミノRNA)、s N=4' -チオRNA、d N=2' -デオキシRNA、N=A、U、G、またはC N#N=ホスホロチオエート結合
名称	配列
C 0	mG#mA#mG#rArCrArArArUrCrArCrCrUrGrCrCrUrCrGrGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrAmU#mGm#mC#mU
C 2 0	mG#mA#mG#mAmCmAmAmAmUmCfAfCfCfUrG#rC#fCfUrC#mGmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU
C 2 0 - G a l N a c	mG#mA#mG#mAmCmAmAmAmUmCfAfCfCfUrG#rC#fCfUrC#mGmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU-G a l N a c
C 2 0 - T e g C h o l	mG#mA#mG#mAmCmAmAmAmUmCfAfCfCfUrG#rC#fCfUrC#mGmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU-T e g C h o l
C 2 0 - C y 3 _ M C V 1 a	mG#mA#mG#mAmCmAmAmAmUmCfAfCfCfUrG#rC#fCfUrC#mGmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU-C y 3
C 2 0 - G a l N a c _ d G F P	mG#mU#mC#mGmUmGmCmUmAmCfUfUfCfArU#rG#fUfGrG#mUmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU-G a l N a c
C 2 0 - D H A _ d G F P	mG#mU#mC#mGmUmGmCmUmAmCfUfUfCfArU#rG#fUfGrG#mUmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU-D H A v 1

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

C20-dT-DHA__dGFP	mG#mU#mC#mGmUmGmCmUmAmCfUfUfCfArU#rG#fUfGrG#mUmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mUdTdT-DHAv1
C20-TegChol__dGFP	mG#mU#mC#mGmUmGmCmUmAmCfUfUfCfArU#rG#fUfGrG#mUmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mU-TegChol
C20-dT-TegChol__dGFP	mG#mU#mC#mGmUmGmCmUmAmCfUfUfCfArU#rG#fUfGrG#mUmGrU#rU#rU#fUfAmGmAmGmCmUmAmU#mG#mC#mUdTdT-TegChol

10

【0156】

実施例 2 - 活性を損なうことなく crRNA の安定性を強化し、かつ crRNA の効力を強化する保護オリゴ

20

短い DNA / RNA ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (HDO) の設計 (Nishina et al., Nature Communications, 2015) によって、かつ二本鎖 RNA が、一本鎖分子 RNA よりも、ヌクレアーゼ分解に対してより耐性があるといった確立された観察結果 (Lam et al., Molecular Therapy Nucleic Acids, 2015) によって着想を得、C20 の未修飾領域を保護することができる短く完全に化学的に安定化させたオリゴを設計することによって、crRNA 安定性を強化することを試みた (図 2A)。crRNA 反復領域と tracrRNA アンチ反復領域との対合中に、保護オリゴが tracrRNA 鎖の侵入によって置換され、それによって、Cas9 編集に必要な crRNA / tracrRNA 複合体が依然として形成可能であると予想した。crRNA / tracrRNA 二重鎖の形成により、同時に保護オリゴの解離が誘導される。C20 にアニールする場合、12 nt に等しいか、それより長いオリゴが、FBS 中でヌクレアーゼによる分解から C20 を保護できることが判明した (図 2B)。C20 - 保護オリゴ複合体を安定した細胞株に電気穿孔することによって、保護オリゴが SpyCas9 活性を妨害しないことを確認した (図 2C)。

30

【0157】

crRNA の効力を強化する保護オリゴ

C20 安定性を強化した保護オリゴがその効力も増加させることができるかどうかを試験するために、C20 - 保護オリゴ複合体を非飽和投与量で電気穿孔した。保護オリゴが、C20 の効力を大幅に強化することが判明した (図 3A 及び図 3B)。

40

【0158】

実施例 3 - crRNA 活性を妨害することなく細胞取り込みを強化した保護オリゴへの接合

治療用オリゴヌクレオチドへの N - アセチルガラクトサミン (GalNac) 及びコレステロール (TegChol) などの接合の追加は、効力があり、かつ目標とされた生体内送達を達成するために極めて重要である。接合が crRNA 活性を妨害するかどうかを試験するために、GalNac またはコレステロール接合のいずれかを伴う crRNA 及び保護オリゴの両方を合成し、安定した細胞株への電気穿孔を介してその活性を試験した。C20 へのコレステロールの直接的な接合により、活性が著しく損なわれるが、コレス

50

テロール接合型保護オリゴを伴うC20は、その活性の低下を示さないことが判明した（図4A）。コレステロール接合を伴うC20は、編集効率の著しい低下を示したが、保護オリゴヌクレオチドへのコレステロールの接合の場合は、その活性を妨害しなかった（図4B）。

【0159】

生体内での接合された保護オリゴによるC20の細胞取り込みの強化を直接視覚化するために、コレステロール接合型保護オリゴまたはDHA接合型保護オリゴを伴って、及び伴わずに、線条体内（IS）注射によって、Cy3-標識C20を成体マウス脳に送達した。接合されていない保護オリゴと比べて、コレステロール接合型保護オリゴ及びDHA接合型保護オリゴの両方は、C20の生体内分布及び細胞取り込みを大幅に強化したことが判明した（図4C）。これらのデータは、保護オリゴが様々な種類の接合を可能にし、Cas9活性を妨害することなく、crRNAの細胞取り込みを強化するために、送達ビヒクルとして使用可能であることを裏付けている。さらに、本発明の操作されたcrRNA-保護オリゴ複合体は、トランスフェクション試薬を用いることなく、効率的に培養哺乳動物細胞に取り込み可能であることを実証した（図4D）。

10

【0160】

実施例4-ホスホロチオエート含有量が様々な化学修飾crRNA

C20-保護オリゴ複合体が、受動的に細胞へ取り込まれ（単純に、電気穿孔またはトランスフェクションを用いずに、培地に添加することにより）、エンドソームから逃れ、編集を補助することができるかどうかを試験するために、図1Bに示した安定した細胞株を、不活性化GFPレポーターを標的とする1.5µmのC20-保護オリゴと共にインキュベートした。保護オリゴとcrRNAとの間の最適な二重鎖の安定性は、効率的な編集に必要である可能性がある（図6）。約7%の編集効率が観察された（図5）。コレステロールは、培養細胞へのsiRNA取り込みに極めて重要であるため[Lyle et al., Molecular Therapy Nucleic Acids 2020]、編集効率のさらなる強化は、図4Aに示すようにコレステロール接合型保護オリゴを使用して達成可能である。

20

【0161】

実施例5-AAVと自己送達crRNAとの共送達による成体マウスCNSにおける生体内ゲノム編集

30

C20-保護オリゴ複合体が、生体内でAAVとの共送達によってゲノム編集を補助できるかどうかを試験した。二重遺伝子導入レポーターマウスモデルのCas9/mTmG+/+で試験することを選択した。このマウスモデルは、ホモ接合型Cas9+/+マウス68とホモ接合型mTmG+/+レポーターマウスとを交配させることによって生成した(Muzumdar et al., Genesis, 45:593-605, 2007)。Cas9+/+マウスモデルは、SpyCas9を構成的に発現し、AAVベクターによって送達した唯一の導入遺伝子は、実験的プロセスを簡略化したtracrRNAである。mTmG+/+レポーターは、赤色蛍光を構成的に発現する膜標的tdTomato(mT)カセットの両側のloxP部位と、mTカセットが欠失するまで発現することができない下流膜標的EGFP(mG)とからなる（図7A）。

40

【0162】

まず、tracrRNAを発現するscAAV9を成体Cas9/mTmG+/+マウスの脳にIS注射によって注射した。2週間後、再度IS注射を実施して、2つのloxP部位を標的とする未修飾C20を送達して、mTカセットのブロック欠失を生じさせ、mG発現を可能にした。次に、抗EGFP抗体を使用して、ホルマリン固定マウス脳切片に対して免疫組織化学的検査（IHC）を実施することによってGFP発現を検出した。

【0163】

コレステロール接合及びDHA接合の両方、ならびに、保護オリゴに対する切断可能リンカー及び安定したリンカーの両方を試験することを選択した。また、いずれの接合もない保護オリゴを伴うC20、及び対照として保護オリゴを伴わないC20も含めた。

50

【0164】

抗EGFP抗体を使用したIHC染色によって、保護オリゴを伴わないC20が、脳内でいずれの編集も生じさせないことが判明した。同時に、C20及び接合のない保護オリゴによる注射部位周辺で、少数のEGFP陽性細胞のみが観察された。対照的に、DHA接合またはコレステロール接合のいずれかを伴うC20、ならびに切断可能リンカーまたは安定したリンカーのいずれかを伴うC20は、より効率的な編集をより広範な分布で生成し（図7B）、これは、図4Bで定量化した生体内の分布結果と一致していた。注射部位周辺の1mm²の範囲内のEGFP陽性細胞のパーセンテージを定量化した際に、DHA接合が、コレステロール接合よりも良好に機能し、かつ切断可能リンカーを有することにより、分布及び編集効率がさらに改善されることが判明した（図7C）。

10

【0165】

実施例6－ホスホロチオエート含有量が様々な化学修飾crRNA

成体野生型B6マウスを使用して、三価のGalNac接合を有する14ヌクレオチドまたは16ヌクレオチドの保護オリゴを伴う、マウスPcsk9遺伝子を標的とするC20を試験した。非標的化対照C20、及び対照としてPBSも含めた。まず、後眼窩（RO）注射によって、SpyCas9－ABE8e及びtracrRNA（図8A）、またはSpyCas9ヌクレアーゼ及びtracrRNA（図8B）のいずれかを発現するAAVを成体マウスに注射し、5週間インキュベートし、エフェクタータンパク質を発現させ、蓄積させた。次に、80mg/kgの単回RO注射を介してGalNac接合型保護オリゴを伴って、及び伴わずにC20を注射した。マウスの肝臓組織からゲノムDNAを抽出して、標的アンプリコンディープシーケンシングを実施することによって編集効率を評価した。両方の長さの保護オリゴを伴うC20によって標的ゲノム遺伝子座で低いが有意な編集が見られたが、非標的化対照C20注射マウスでは、編集が観察されなかった（図8A及び図8B）。

20

【0166】

次に、HT1のマウスモデルで試験することにより、本発明の共送達アプローチが治療関連の編集を生成することができるかどうかを試験した。本研究で使用したHT1マウスモデルは、Fah^{PM/PM}マウスであり、これは、フマリルアセト酢酸ヒドラーゼをコードFah遺伝子のエキソン8の最後のヌクレオチドにGからAへの点変異を有するものである。この点変異は、エキソン8のスキッピングを生じさせて、FAH欠損を引き起こす（図8C）。FAHはチロシン異化経路の1つの工程を触媒するため、FAH欠損により、有毒なフマリルアセト酢酸及びスクシニルアセト酢酸の蓄積が生じ、複数の臓器の損傷が起こる。Fah^{PM/PM}マウスを、チロシン分解経路内の上流の酵素の阻害剤である2-（2-ニトロ-4-トリフルオロメチルベンゾイル）-1,3-シクロヘキサジオン（NTBC）で処置して、毒素の蓄積を防ぐことができる。そのような処置がなければ、マウスは、急速に体重が減少し死に至るであろう。以前に、複数の研究が、Fah^{PM/PM}マウスの点変異は、mRNA及びsgRNAを運搬する脂質ナノ粒子またはプラスミド流体力学的尾静脈注射のいずれかによって送達されるSpyCas9－ABEによって修正され得ることを示している。

30

【0167】

まず、RO注射によって、SpyCas9－ABE8e及びtracrRNAを発現するAAVを注射した。5週間後、Fah^{PM/PM}マウスに、14ヌクレオチドまたは16ヌクレオチドの三価のGalNac接合型保護オリゴを伴う、点変異を標的とする事前に確認されたスペーサー配列を有するC20のRO注射を、単回の80mg/kg用量で、実施した。マウスの体重を維持し、ゲノム編集が起こる時間を確保するために、始終、マウスにNTBCを与え続けた。次に、各群から3匹のマウスを殺し、肝臓ゲノムDNAを抽出し、標的アンプリコンディープシーケンシングによって編集効率を測定し、それに加えて、抗FAH抗体を使用してIHC染色を介してFAH陽性肝細胞を検出した。各群の残りのマウスについては、NTBCの非投与と投与のサイクル（7～10日間は投与なし、その後の2日間は投与する）を3ヶ月繰り返し、FAH陽性肝細胞を拡張させ、マ

40

50

ウスの体重をモニターし、本発明の共送達アプローチによるゲノム編集がこのマウスモデルの表現型を修正できるかどうかを試験した（図8D）。

【0168】

NTBCの中止前に、共送達処置群で低い有意なオンターゲット編集が観察された（図8E）。NTBCの中止後、PBS注射マウスは、急速に体重が減少し、体重が80%未満に減少し、瀕死後人道的に殺した。SpyCas9-ABE8e及びtracrRNA発現AAV、ならびに保護オリゴを伴うC20で処置したマウスは、時間とともに徐々に体重が増加した（図8F）。次に、3ヶ月のNTBCサイクルの後、マウスを殺し、抗FAH抗体を使用して、IHC染色を肝臓切片に実施した。AAV共送達で処置した肝臓組織で、FAH陽性肝細胞の増殖が観察された（図8G）。これらのデータは、エフェクタータンパク質及びtracrRNA発現AAVと共に、C20及びGalNac接合型保護オリゴを全身送達することにより、肝臓における生体内ゲノム編集が達成され、治療利益が提供可能であることを裏付けている。

10

【0169】

実施例6－投与計画の最適化による編集効率の改善

肝臓で達成した編集効率は、有意ではあるが、低かった。次に、投与計画を最適化することにより、効率の改善を試みた。肝細胞の表面に発現し、かつGalNac接合型オリゴの取り込みを担うアジア糖タンパク質受容体（ASGPR）は、約10～15分のリサイクル時間を有する。以前の研究からのデータもまた、ASGPR飽和が原因で、ポラス静脈内注射後、肝細胞は限られた量のGalNac接合型分子しか取り込むことができないことを示している。77回の本発明の初期の研究では、利用可能なASGPR能力をはるかに超えた、GalNac接合型保護オリゴを伴う80mg/kgの単回用量のC20を注射した。単回の高用量の代わりに、以前の用量の3分の1（26mg/kg）でオリゴを1日3回の連続したRO注射に分割することにより、より多くのオリゴを肝細胞に送達することができ、ゆえに、編集効率が上昇する可能性がある結論づけた（図9A）。

20

【0170】

この着想を試験するために、まず、SpyCas9-ABE8e及びtracrRNAを発現するAAVをB6マウスにRO注射した。次に、5週間後、14ntのGalNac接合型保護オリゴと複合体化された、Pcsk9遺伝子を標的とするC20の1日3回の連続したRO注射を、26mg/kgで実施した。次に、マウスの肝臓のゲノムDNAを回収し、標的アンプリコンディープシーケンシングを実施して編集効率を測定した。80mg/kgオリゴの単回投与と比較して、1日3回の連続した26mg/kgの投与により、編集効率を大幅に改善したことが判明した（図9B）。加えて、再投与による肝臓における毒性のいずれの徴候も観察されず、オリゴ処置マウスは、PBS注射マウスと同様に健康状態が良好であった。これらのデータは、crRNAの反復投与が可能であり、かつ忍容性が良好であり得、かつ投与計画の最適化により、編集効率がさらに改善される可能性があることを示している。

30

【0171】

実施例7－投与計画の最適化による生体内編集効率の改善

40

次に、保護オリゴ活性のメカニズムをさらに調査した。異なる長さの保護オリゴヌクレオチドすなわちC20の異なる領域にアニールする保護オリゴヌクレオチドを伴うC20の活性を比較した（図10）。10ヌクレオチド（PO1）のような短い保護オリゴがC20効力を強化するが、14ヌクレオチドの保護オリゴ（PO7）よりもその程度は低く、これはおそらく、より低い融解温度により、C20保護の程度が制限されることが判明した。逆に、より長いP.O（ヌクレオチド配列が5'-GCACAAACNNNNNNNNNNNN-3'の、PO16で最大22ヌクレオチド）は、C20の効力を低下させ、これはおそらく、初期のtracrRNAアニーリングを阻害する強い結合親和性、及び保護オリゴ置換、またはその両方に起因することが判明した。さらに、保護オリゴが結合する位置も重要である（図10A）。初期のtracrRNAアニーリングに足が

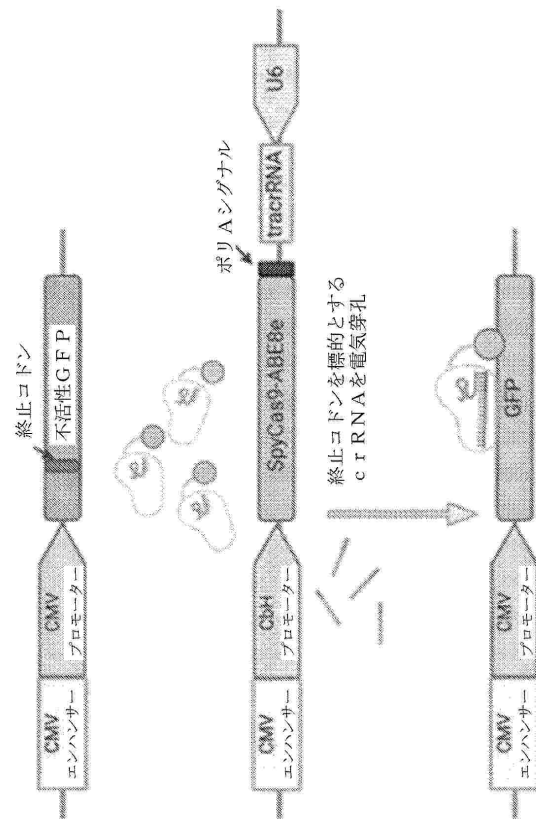
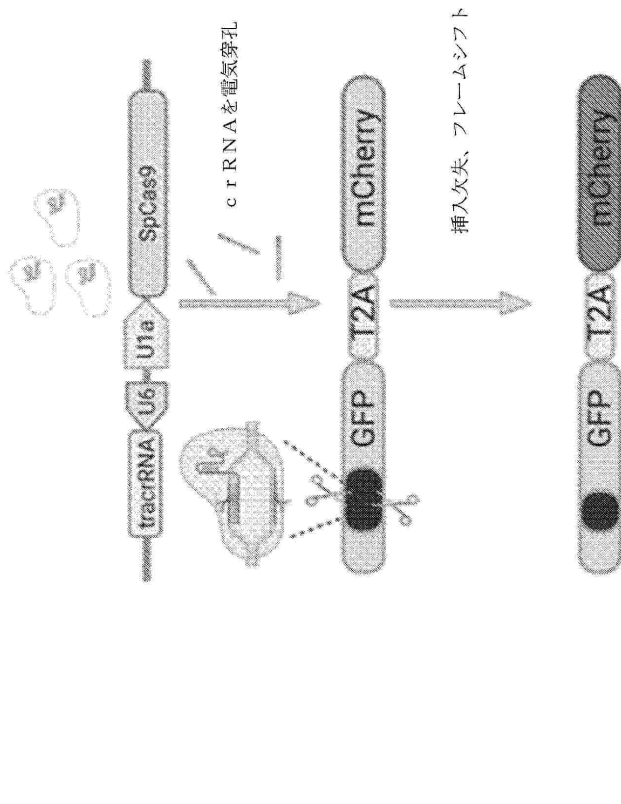
50

かりを残さない16ntの保護オリゴ（配列が5'-ACCAUAGCUCUAAAAC-3'のB10）もまた、活性を低下させ、C20が活性になる前に、保護オリゴがtracrRNAによって置換される必要があるといった本発明者らの仮説と一致している（図10A）。最後に、保護オリゴが完全に修飾されかつ安定化されたcrRNA（C40）の効力を阻害も強化もしなかったことが判明し、これは、保護オリゴによって付与される効力の強化により、結果としてC20の安定化がもたらされたことを意味する（図10B）。

【図面】

【図1A】

【図1B】



10

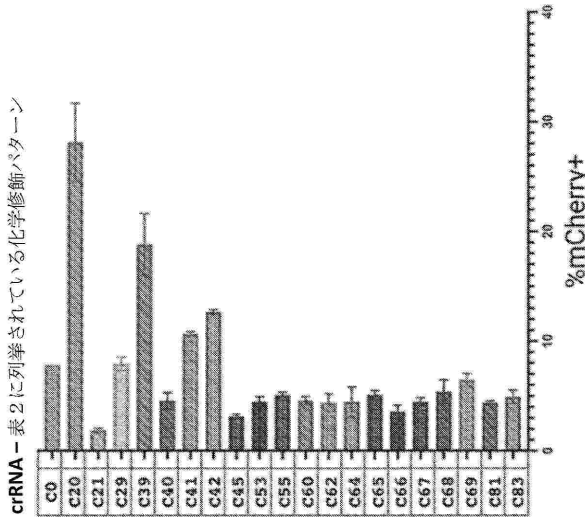
20

30

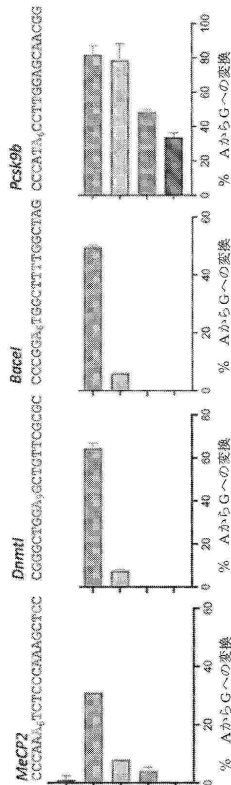
40

50

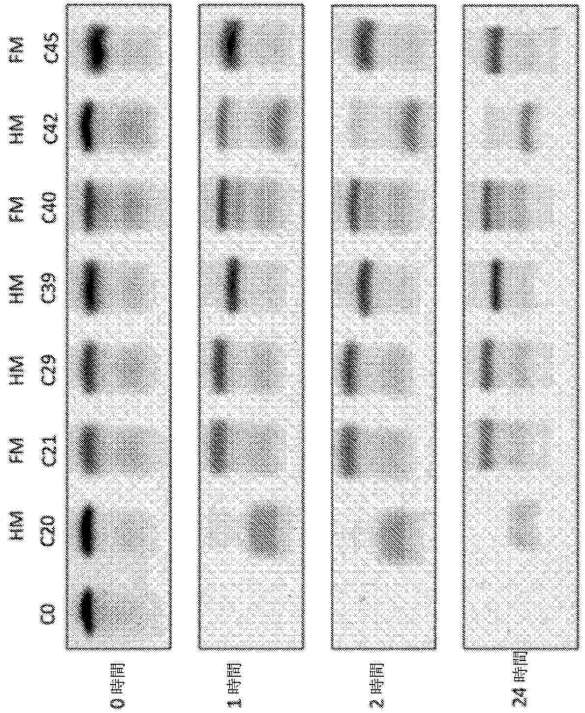
【図 1 C】



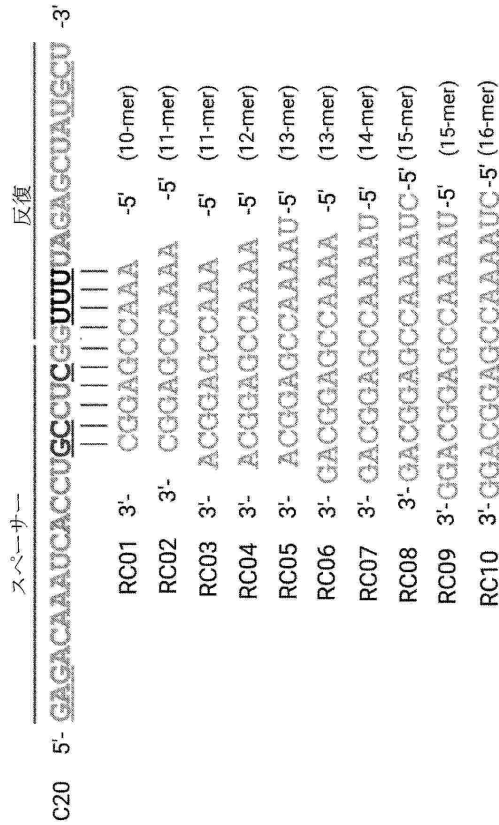
【図 1 D】



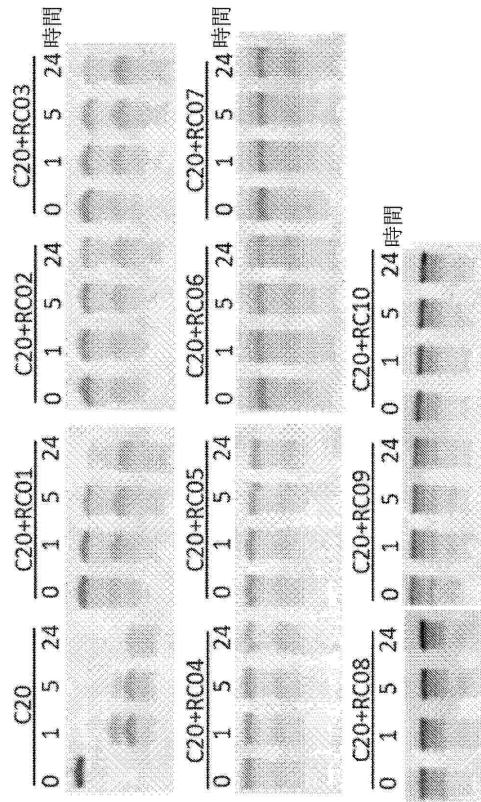
【図 1 E】



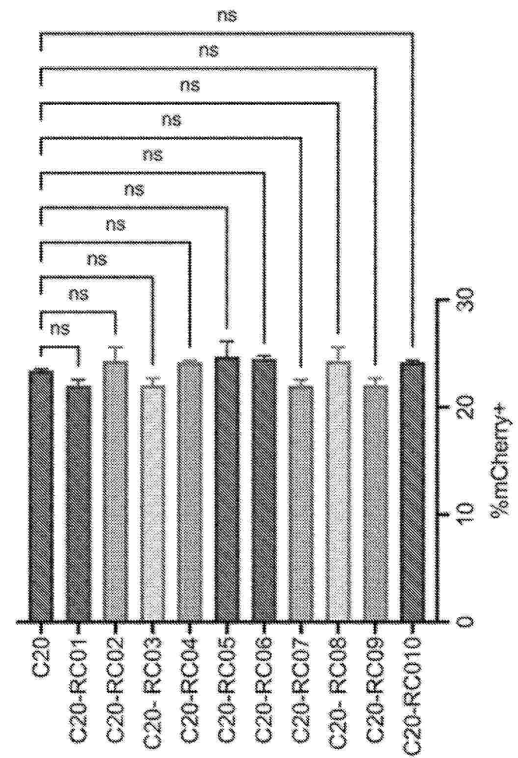
【図 2 A】



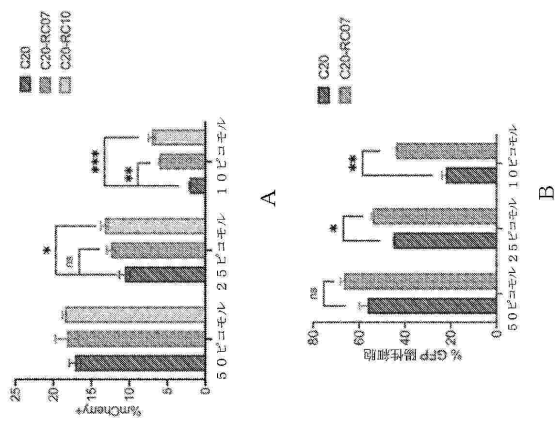
【図 2 B】



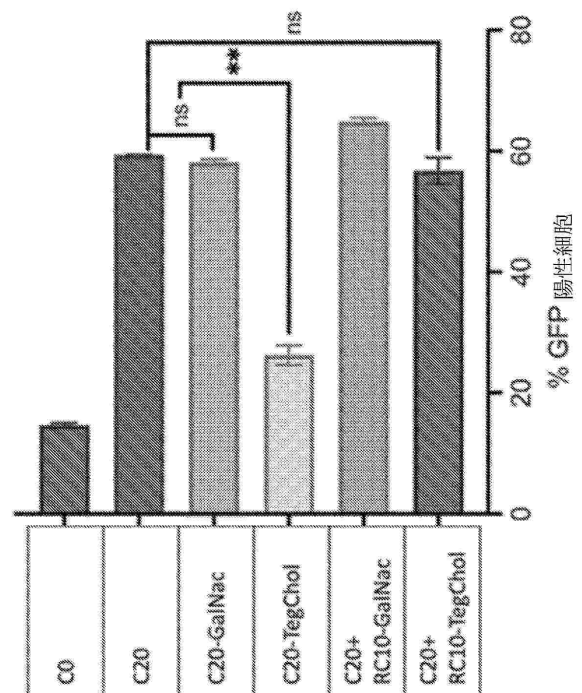
【図 2 C】



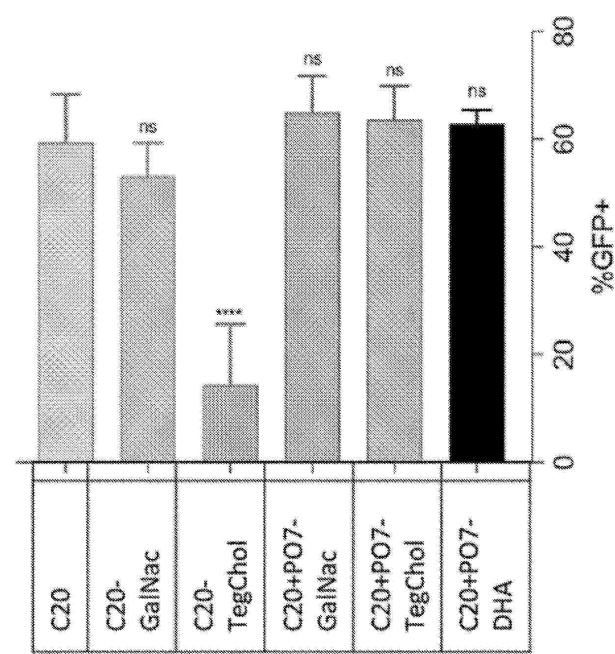
【圖 3】



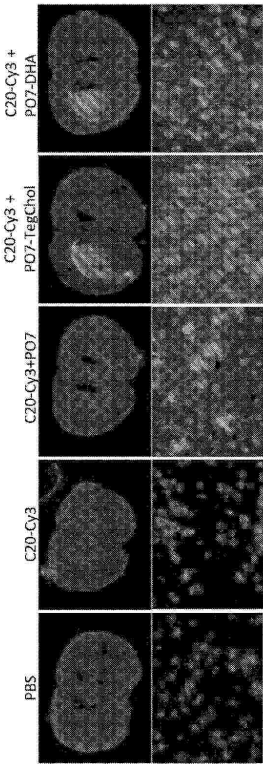
【図 4 A】



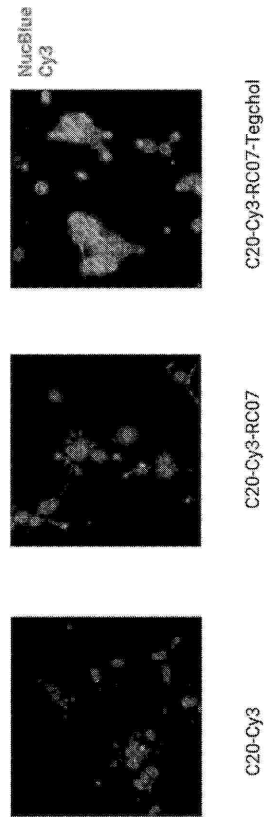
【 図 4 B 】



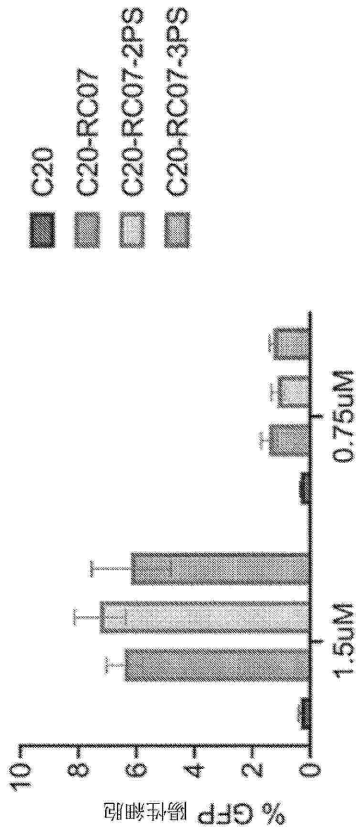
【 図 4 C 】



【 図 4 D 】



【 図 5 】



10

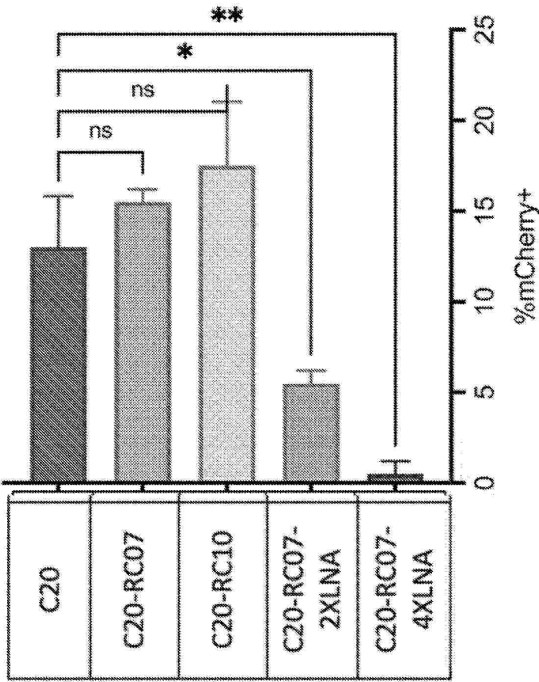
20

30

40

50

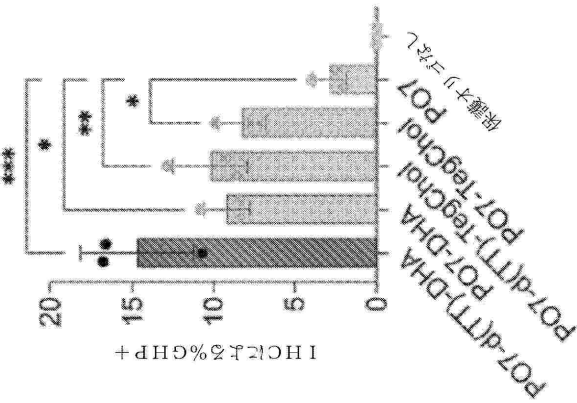
【 図 6 】



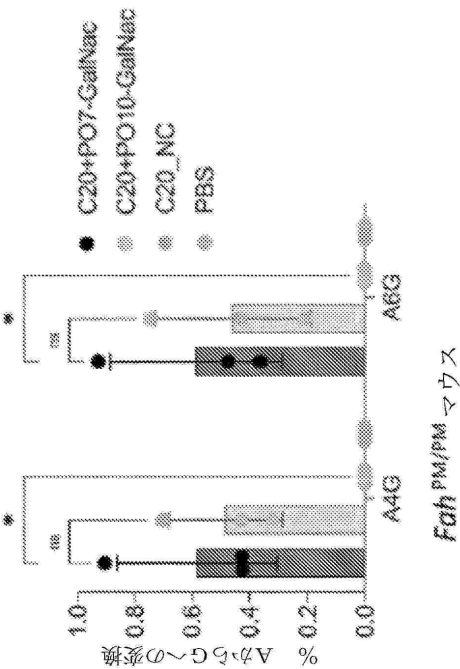
【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



【 図 8 A 】



10

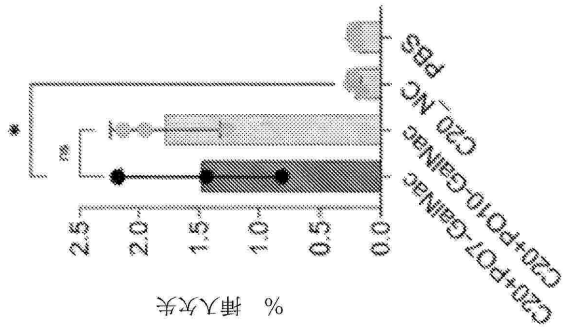
20

30

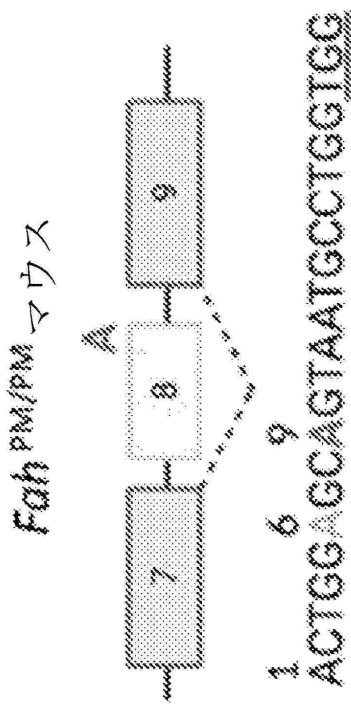
40

50

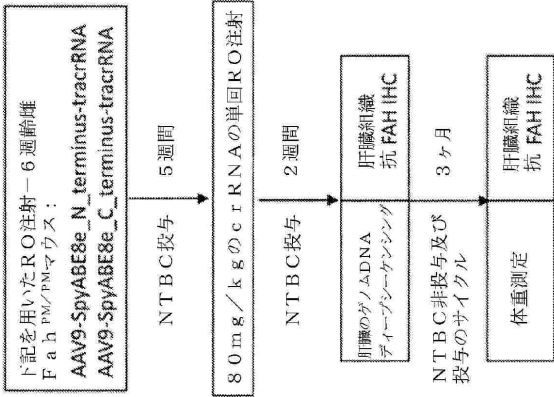
【図 8 B】



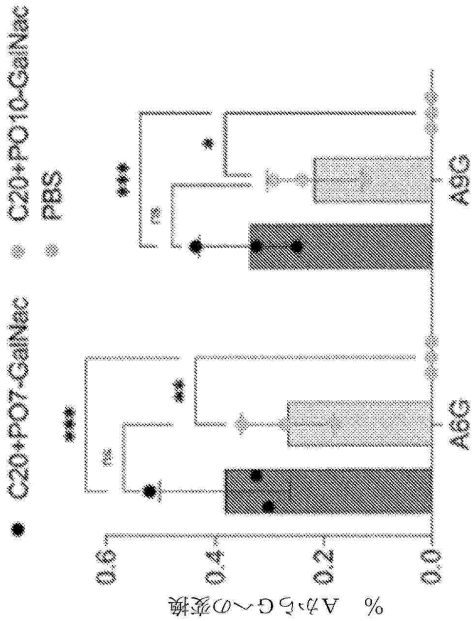
【図 8 C】



【図 8 D】



【図 8 E】



10

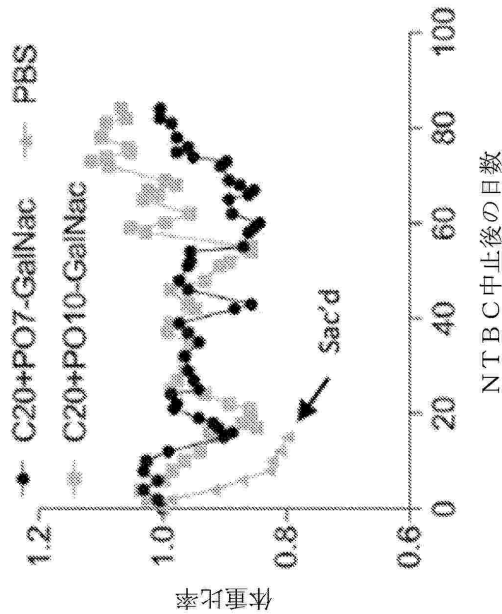
20

30

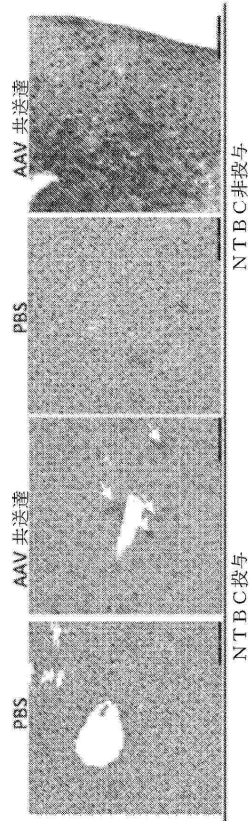
40

50

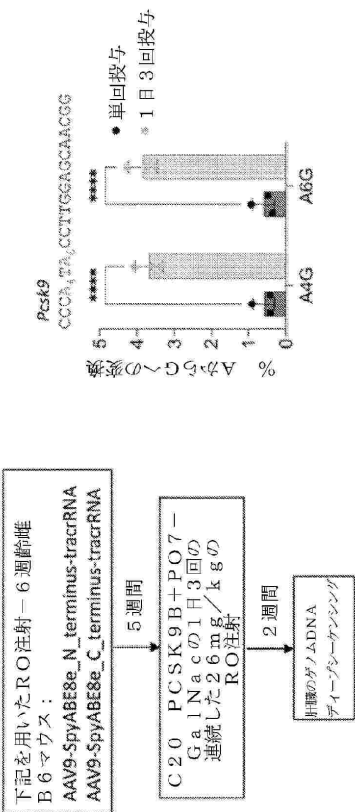
【図 8 F】



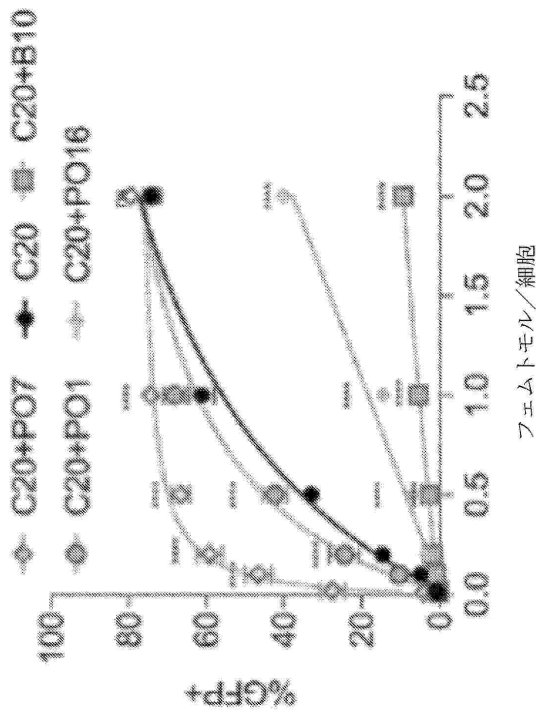
【図 8 G】



【図 9】



【図 10 A】



B

A

10

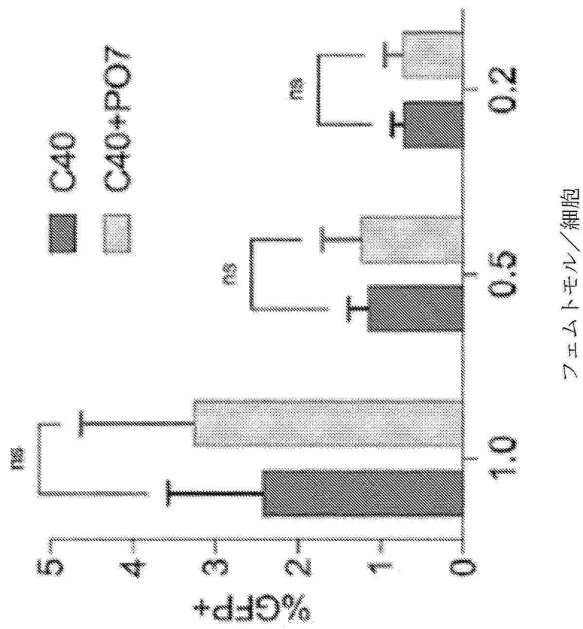
20

30

40

50

【図 10 B】



【配列表】

2025514327000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/20418

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 15/113; C12N 9/22; C12N 15/10 (2023.01)

ADD.

CPC - INV. C12N 15/113; C12N 9/22; C12N 15/102

ADD. C12N 2310/20; C12N 2310/321; C12N 2310/322; C12N 2310/3521; C12Q 2525/117

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/0289659 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 06 October 2016; Paragraphs [0003], [0095], [0378], [0383]	1-6, 25-30
A	WO 2019/204228 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 24 October 2019; Paragraphs [0181]-[0182], [0204]	1, 26
A	US 10,758,558 B2 (TRANSLATE BIO MA INC.) 01 September 2020; Column 7, lines 4-40	1-3, 25-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 July 2023 (31.07.2023)

Date of mailing of the international search report

AUG 29 2023

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JS23/20418

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/20418

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 7-24, 31-83
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

20

30

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

フロントページの続き

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,P
H,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,
UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ッツ州ウースター、インペリアル・ロード 10

(72)発明者 ソンタイマー, エリック ジョセフ

アメリカ合衆国 02466 マサチューセッツ州オーバーンデイル、イズリントン・ロード 236

(72)発明者 ワッツ, ジョナサン ケネス

アメリカ合衆国 01609 マサチューセッツ州ウースター、ブルック・ヒル・ドライブ 5

(72)発明者 コボロバ, アナスタシア

アメリカ合衆国 01581 マサチューセッツ州ウエストボロー、ロックローン・ロード 10