

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-507174

(P2023-507174A)

(43)公表日 令和5年2月21日(2023.2.21)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/077(2010.01)	C 1 2 N 5/077	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全47頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-537154(P2022-537154)	(71)出願人	507044516 プレジデント アンド フェローズ オブ ハーバード カレッジ アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, クインシー ストリート 1 7
(86)(22)出願日	令和2年12月16日(2020.12.16)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85)翻訳文提出日	令和4年7月22日(2022.7.22)	(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86)国際出願番号	PCT/US2020/065437	(72)発明者	ウェイジャーズ, エイミー ジェイ. アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, バンクス ス トリート 3 0
(87)国際公開番号	WO2021/127057	F ターム (参考)	4B065 AA93X AB01 AC12 AC20 最終頁に続く
(87)国際公開日	令和3年6月24日(2021.6.24)		
(31)優先権主張番号	62/948,665		
(32)優先日	令和1年12月16日(2019.12.16)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 DMD変異の修正のための方法及び組成物

(57)【要約】

筋ジストロフィー患者のゲノムにある疾患関連変異を除去し、任意に置換することによって、DMDを含む、筋ジストロフィーを処置するための方法及び組成物が本明細書中で開示されている。(エクソン45～55のDMD「ホットスポット」内に含まれるものを含む)既存のヒトDMD変異の大部分を効果的に修正するであろうインビボ治療用物質を送達するために、エクソン45～55をコードするイントロンを含まない合成DNA配列のDMD遺伝子座における相同組換え非依存的組込みを可能にするデュアルgRNA CRISPR/Cas9ベースのシステムが本明細書中で開示されている。

【選択図】図4

Exon deletion + replacement strategy

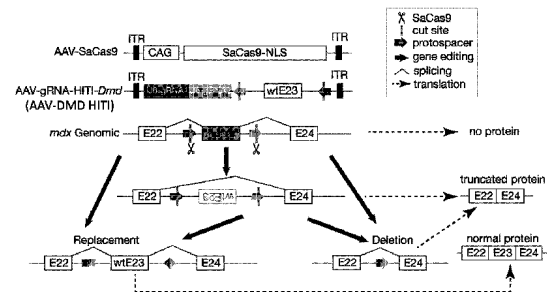


FIG. 4

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムを改変するための方法であって、前記細胞を Cas タンパク質ならびに第 1 及び第 2 のガイドリボ核酸 (gRNA) と接触させ、それによって DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間に位置する前記哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞の前記ゲノムを改変することを含み、前記第 1 の gRNA は、DMD のイントロン 44 に位置する第 1 の標的部位とハイブリダイズし、前記第 2 の gRNA は、DMD のイントロン 55 に位置する第 2 の標的部位とハイブリダイズする、方法。

【請求項 2】

前記ゲノムの前記改変は、DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間のヌクレオチド配列の除去を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記細胞を野生型 DMD のエクソン 45 から 55 の前記ヌクレオチド配列を含む鋳型 DNA と接触させることをさらに含む、請求項 1 ～ 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記鋳型 DNA は、野生型 DMD のエクソン 45 から 55 の前記ヌクレオチド配列と隣接する前記第 1 及び前記第 2 の標的部位の一部を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ゲノムの前記改変は、野生型 DMD のエクソン 45 から 55 を含む鋳型 DNA による DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間の前記ヌクレオチド配列の置換を含む、請求項 3 ～ 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間の前記ヌクレオチド配列の前記置換は、非相同末端結合 (NHEJ) により生じる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間に位置する前記哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞の前記ゲノムは、疾患または状態と関連する変異を含む、請求項 1 ～ 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記疾患または状態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記細胞は、ヒト細胞である、請求項 1 ～ 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞は、筋ジストロフィーを有し、DMD 遺伝子のイントロン 44 からイントロン 55 の間に位置する変異を有する対象の細胞から誘導された人工多能性幹細胞である、請求項 1 ～ 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記対象は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 Cas タンパク質は、Cas9 であり、任意に、前記 Cas9 は、saCas9、spCas9、及び SauriCas9 から選択される、請求項 1 ～ 11 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記細胞は、前記 Cas タンパク質、前記第 1 の gRNA、前記第 2 の gRNA、または前記鋳型 DNA を形質導入する 1 つ以上のウイルスと接触させられる、請求項 1 ～ 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 1 つ以上のウイルスは、AAV ウイルスである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 15】

前記細胞は、前記 Cas タンパク質をコードする核酸を前記細胞に形質導入する第 1 の

50

ウイルスならびに前記第 1 の g R N A、前記第 2 の g R N A、及び鋳型 D N A をコードする核酸を前記細胞に形質導入する第 2 のウイルスと接触させられる、請求項 1 ～ 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

少なくとも前記第 1 のウイルスまたは前記第 2 のウイルスは、A A V ウイルスである、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

改変されたゲノムを有する前記細胞は、野生型 D M D のエクソン 4 5 から 5 5 によってコードされるアミノ酸配列が欠如した切断型の機能的なジストロフィンを発現する、請求項 1 ～ 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

改変されたゲノムを有する前記細胞は、野生型 D M D のエクソン 4 5 から 5 5 によってコードされるアミノ酸配列を含む完全長型ジストロフィンを発現する、請求項 3 ～ 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記細胞は、インビトロ、エクスピボ、またはインビボで接触させられる、請求項 1 ～ 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記細胞は、配列番号 2 6 または 2 7 の核酸を誘導するウイルス、あるいは 1 または 2 つの g R N A 及び鋳型のうちの 1 つ以上を誘導するその一部と接触させられる、請求項 1 ～ 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

処置を必要とする対象において筋ジストロフィーを処置する方法であって、患者の筋肉または筋肉前駆細胞を C a s タンパク質ならびに第 1 及び第 2 のガイドリボ核酸 (g R N A) と接触させ、それによって前記細胞のゲノムを改変することを含み、前記第 1 の g R N A は、D M D のイントロン 4 4 に位置する第 1 の標的部位とハイブリダイズし、前記第 2 の g R N A は、D M D のイントロン 5 5 に位置する第 2 の標的部位とハイブリダイズし、前記対象のゲノムは、D M D 遺伝子のイントロン 4 4 からイントロン 5 5 の間に位置する変異を含む、方法。

【請求項 2 2】

前記ゲノムの前記改変は、D M D のイントロン 4 4 からイントロン 5 5 の間のヌクレオチド配列の除去を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記細胞を野生型 D M D のエクソン 4 5 から 5 5 の前記ヌクレオチド配列を含む鋳型 D N A と接触させることをさらに含む、請求項 2 1 ～ 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記鋳型 D N A は、野生型 D M D のエクソン 4 5 から 5 5 の前記ヌクレオチド配列と隣接する前記第 1 及び前記第 2 の標的部位の一部を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記ゲノムの前記改変は、野生型 D M D のエクソン 4 5 から 5 5 を含む鋳型 D N A による D M D のイントロン 4 4 からイントロン 5 5 の間の前記ヌクレオチド配列の置換を含む、請求項 2 3 ～ 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

D M D のイントロン 4 4 からイントロン 5 5 の間の前記ヌクレオチド配列の前記置換は、非相同末端結合 (N H E J) により生じる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項 2 1 ～ 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 C a s タンパク質は、C a s 9 であり、任意に、前記 C a s 9 は、s a C a s 9、

10

20

30

40

50

s p C a s 9、及び S a u r i C a s 9 から選択される、請求項 21～27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記対象は、前記 C a s タンパク質、前記第 1 の g R N A、前記第 2 の g R N A、または前記鑄型 D N A を形質導入する 1 つ以上のウイルスを投与される、請求項 21～28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記 1 つ以上のウイルスは、A A V ウイルスである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記対象は、前記 C a s タンパク質をコードする核酸を前記細胞に形質導入する第 1 のウイルスならびに前記第 1 の g R N A、前記第 2 の g R N A、及び前記鑄型 D N A をコードする核酸を前記細胞に形質導入する第 2 のウイルスを投与される、請求項 21～28 に記載の方法。

【請求項 32】

少なくとも前記第 1 のウイルスまたは前記第 2 のウイルスは、A A V ウイルスである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

改変されたゲノムを有する前記細胞は、野生型 D M D のエクソン 45 から 55 によってコードされるアミノ酸配列が欠如した切断型ジストロフィンを発現する、請求項 21～32 に記載の方法。

【請求項 34】

改変されたゲノムを有する前記細胞は、野生型 D M D のエクソン 45 から 55 によってコードされるアミノ酸配列を含む完全長型ジストロフィンを発現する、請求項 23～32 に記載の方法。

【請求項 35】

前記細胞は、エクスビボ、またはインビボで接触させられる、請求項 21～34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記細胞は、配列番号 26 または 27 の核酸を誘導するウイルス、あるいは 1 または 2 つの g R N A 及び鑄型のうちの 1 つ以上を誘導するその一部と接触させられる、請求項 21～35 に記載の方法。

【請求項 37】

哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムを改変するための方法であって、前記細胞を C a s タンパク質ならびに第 1 及び第 2 のガイドリボ核酸 (g R N A) と接触させ、それによって第 1 の標的部位と第 2 の標的部位との間に位置する前記哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞の前記ゲノムを改変することを含み、前記第 1 の g R N A は、D M D の第 1 のイントロンに位置する前記第 1 の標的部位とハイブリダイズし、前記第 2 の g R N A は、D M D の別のイントロンに位置する前記第 2 の標的部位とハイブリダイズする、方法。

【請求項 38】

D M D エクソン 23 は、前記第 1 の標的部位と前記第 2 の標的部位との間に位置する、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記細胞を前記第 1 の標的部位と前記第 2 の標的部位との間に位置する D M D エクソンのヌクレオチド配列を含む鑄型 D N A と接触させることをさらに含む、請求項 37～38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記鑄型 D N A は、前記第 1 の標的部位と前記第 2 の標的部位との間に位置する D M D エクソンの前記ヌクレオチド配列と隣接する前記第 1 及び前記第 2 の標的部位の一部を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

10

20

30

40

50

前記ゲノムの前記改変は、前記第 1 の標的部位と前記第 2 の標的部位との間に位置する D M D エクソンの前記ヌクレオチド配列を含む鋳型 D N A による前記第 1 の標的部位と前記第 2 の標的部位との間に位置する前記ヌクレオチド配列の置換を含む、請求項 3 9 ~ 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記ヌクレオチド配列の前記置換は、非相同末端結合（N H E J）により生じる、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記第 1 の標的部位と前記第 2 の標的部位との間に位置する前記細胞の前記ゲノムは、疾患または状態と関連する変異を含む、請求項 3 7 ~ 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記疾患または状態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記細胞は、筋ジストロフィーを有し、前記第 1 の標的部位と前記第 2 の標的部位との間に位置する変異を有する対象の細胞から誘導された人工多能性幹細胞である、請求項 3 7 ~ 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記細胞は、前記 C a s タンパク質、前記第 1 の g R N A、前記第 2 の g R N A、または前記鋳型 D N A を形質導入する 1 つ以上のウイルスと接触させられる、請求項 3 7 ~ 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記細胞は、前記 C a s タンパク質をコードする核酸を前記細胞に形質導入する第 1 のウイルスならびに前記第 1 の g R N A、前記第 2 の g R N A、及び前記鋳型 D N A をコードする核酸を前記細胞に形質導入する第 2 のウイルスと接触させられる、請求項 3 7 ~ 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

少なくとも前記第 1 のウイルスまたは前記第 2 のウイルスは、A A V ウイルスである、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

改変されたゲノムを有する前記細胞は、機能的な切断型ジストロフィンを発現することができる、請求項 3 7 ~ 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

改変されたゲノムを有する前記細胞は、完全長型ジストロフィンを発現することができる、請求項 3 7 ~ 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記細胞は、インビトロ、エクスピボ、またはインビボで接触させられる、請求項 3 7 ~ 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

C a s タンパク質をコードする核酸を細胞に形質導入する第 1 のウイルスならびに第 1 の g R N A、第 2 の g R N A、及び鋳型 D N A をコードする核酸を細胞に形質導入する第 2 のウイルスを含む組成物であって、前記第 1 の g R N A は、D M D の第 1 のイントロンに位置する第 1 の標的部位とハイブリダイズし、前記第 2 の g R N A は、D M D の別のイントロンに位置する第 2 の標的部位とハイブリダイズし、前記鋳型 D N A は、前記第 1 の標的部位と前記第 2 の標的部位との間に位置する 1 つ以上の D M D エクソンをコードする、組成物。

【請求項 5 3】

前記鋳型 D N A は、前記 1 つ以上のエクソンと隣接する前記第 1 及び前記第 2 の標的部位をさらに含む、請求項 5 2 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2019年12月16日に出願された米国仮出願第62／948,665号の利益を主張するものであり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、タンパク質ジストロフィンの発現の欠陥から生じる。DMD患者のおよそ60%は、DMD遺伝子のエクソン44から56の間に変異を有する。DMDは、生後1年以内に見られることのある重大な運動障害をもたらす。大半のDMD患者は、10～14歳までに車椅子に頼り、DMDの個人は、一般に10代後半または20代前半に呼吸不全及び／または心不全で死亡する。

10

【発明の概要】

【0003】

（エクソン45～55のDMD「ホットスポット」内に含まれるものを含む）既存のヒトDMD変異の大部分を効果的に修正するであろうインビボ治療用物質を送達するために、エクソン45～55をコードするイントロンを含まない合成DNA配列のDMD遺伝子座における相同組換え非依存的組込みを可能にするデュアルgRNA CRISPR/Cas9ベースのシステムが本明細書中で開示されている。このアプローチによるエクソン45～55の除去及び置換の成功は、完全長型ジストロフィンタンパク質の発現の回復をもたらすが、除去単独では、フレームシフトエクソンを除去し、変異配列を「再構成」して、部分的に機能的なタンパク質を発現させることによって切断型ジストロフィン（これも治療効果がある）をもたらす。したがって、この戦略は、2つの異なる結果をもたらす、これらはともに治療的可能性を有する。

20

【0004】

本開示のいくつかの態様は、哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムを改変するための方法であって、細胞をCasタンパク質ならびに第1及び第2のガイドリボ核酸（gRNA）と接触させ、それによってDMDのイントロン44からイントロン55の間に位置する哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムを改変することを含み、第1のgRNAは、DMDのイントロン44に位置する第1の標的部位とハイブリダイズし、第2のgRNAは、DMDのイントロン55に位置する第2の標的部位とハイブリダイズする、方法を対象とする。

30

【0005】

いくつかの実施形態では、ゲノムの改変は、DMDのイントロン44からイントロン55の間のヌクレオチド配列の除去を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を野生型DMDのエクソン45から55のヌクレオチド配列を含む鑄型DNAと接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、鑄型DNAは、野生型DMDのエクソン45から55のヌクレオチド配列と隣接する第1及び第2の標的部位の一部を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの改変は、野生型DMDのエクソン45から55を含む鑄型DNAによるDMDのイントロン44からイントロン55の間のヌクレオチド配列の置換を含む。いくつかの実施形態では、DMDのイントロン44からイントロン55の間のヌクレオチド配列の置換は、非相同末端結合（NHEJ）により生じる。

40

【0006】

いくつかの実施形態では、DMDのイントロン44からイントロン55の間に位置する哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムは、疾患または状態と関連する変異を含む。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。

【0007】

いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、筋ジストロフィーを有し、DMD遺伝子のイントロン44からイントロン55の間に位置する変異を有する対象の細胞から誘導された人工多能性幹細胞である。いくつかの実施

50

形態では、対象は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する。

【0008】

いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas9である。いくつかの実施形態では、細胞は、Casタンパク質、第1のgRNA、第2のgRNA、または鑄型DNAを形質導入する1つ以上のウイルスと接触させられる。いくつかの実施形態では、1つ以上のウイルスは、AAVウイルスである。いくつかの実施形態では、細胞は、Casタンパク質をコードする核酸を細胞に形質導入する第1のウイルスならびに第1のgRNA、第2のgRNA、及び鑄型DNAをコードする核酸を細胞に形質導入する第2のウイルスと接触させられる。いくつかの実施形態では、少なくとも第1のウイルスまたは第2のウイルスは、AAVウイルスである。

10

【0009】

いくつかの実施形態では、改変されたゲノムを有する細胞は、野生型DMDのエクソン45から55によってコードされるアミノ酸配列が欠如した切断型の機能的なジストロフィンを発現する。いくつかの実施形態では、改変されたゲノムを有する細胞は、野生型DMDのエクソン45から55によってコードされるアミノ酸配列を含む完全長型ジストロフィンを発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、インビトロ、エクスピボ、またはインビボで接触させられる。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号26または27の核酸を誘導するウイルス、あるいは1または2つのgRNA及び鑄型のうちの1つ以上を誘導するその一部と接触させられる。

【0010】

20

本開示のいくつかの態様は、処置を必要とする対象において筋ジストロフィーを処置する方法であって、患者の筋肉または筋肉前駆細胞をCasタンパク質ならびに第1及び第2のガイドリボ核酸(gRNA)と接触させ、それによって細胞のゲノムを改変することを含み、第1のgRNAは、DMDのイントロン44に位置する第1の標的部位とハイブリダイズし、第2のgRNAは、DMDのイントロン55に位置する第2の標的部位とハイブリダイズし、対象のゲノムは、DMD遺伝子のイントロン44からイントロン55の間に位置する変異を含む、方法を対象とする。いくつかの実施形態では、ゲノムの改変は、DMDのイントロン44からイントロン55の間のヌクレオチド配列の除去を含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を野生型DMDのエクソン45から55のヌクレオチド配列を含む鑄型DNAと接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、鑄型DNAは、野生型DMDのエクソン45から55のヌクレオチド配列と隣接する第1及び第2の標的部位の一部を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの改変は、野生型DMDのエクソン45から55を含む鑄型DNAによるDMDのイントロン44からイントロン55の間のヌクレオチド配列の置換を含む。いくつかの実施形態では、DMDのイントロン44からイントロン55の間のヌクレオチド配列の置換は、非相同末端結合(NHEJ)により生じる。いくつかの実施形態では、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。

30

【0012】

いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas9(例えば、saCas9、SauriCas9、KKHCas9、spCas9)である。いくつかの実施形態では、細胞は、Casタンパク質、第1のgRNA、第2のgRNA、または鑄型DNAを形質導入する1つ以上のウイルスと接触させられる。いくつかの実施形態では、1つ以上のウイルスは、AAVウイルスである。いくつかの実施形態では、対象は、Casタンパク質をコードする核酸を細胞に形質導入する第1のウイルスならびに第1のgRNA、第2のgRNA、及び鑄型DNAをコードする核酸を細胞に形質導入する第2のウイルスを投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも第1のウイルスまたは第2のウイルスは、AAVウイルスである。

40

【0013】

いくつかの実施形態では、改変されたゲノムを有する細胞は、野生型DMDのエクソン

50

45から55によってコードされるアミノ酸配列が欠如した切断型ジストロフィンを発現する。いくつかの実施形態では、改変されたゲノムを有する細胞は、野生型DMDのエクソン45から55によってコードされるアミノ酸配列を含む完全長型ジストロフィンを発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、エキスピボ、またはインビボで接触させられる。いくつかの実施形態では、細胞は、配列番号26または27の核酸を誘導するウイルス、あるいは1または2つのgRNA及び鑄型のうちの1つ以上を誘導するその一部と接触させられる。

【0014】

本開示のいくつかの態様は、哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムを改変するための方法であって、細胞をCasタンパク質ならびに第1及び第2のガイドリボ核酸(gRNA)と接触させ、それによって第1の標的部位と第2の標的部位との間に位置する哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムを改変することを含み、第1のgRNAは、DMDの第1のイントロンに位置する第1の標的部位とハイブリダイズし、第2のgRNAは、DMDの別のイントロンに位置する第2の標的部位とハイブリダイズする、方法を対象とする。いくつかの実施形態では、DMDエクソン23は、第1の標的部位と第2の標的部位との間に位置する。

10

【0015】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を第1の標的部位と第2の標的部位との間に位置するDMDエクソンのヌクレオチド配列を含む鑄型DNAと接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、鑄型DNAは、第1の標的部位と第2の標的部位との間に位置するDMDエクソンのヌクレオチド配列と隣接する第1及び第2の標的部位の一部を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの改変は、第1の標的部位と第2の標的部位との間に位置するDMDエクソンのヌクレオチド配列を含む鑄型DNAによる第1の標的部位と第2の標的部位との間に位置するヌクレオチド配列の置換を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列の置換は、非相同末端結合(NHEJ)により生じる。

20

【0016】

いくつかの実施形態では、第1の標的部位と第2の標的部位との間に位置する細胞のゲノムは、疾患または状態に関連する変異を含む。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態では、細胞は、筋ジストロフィーを有し、第1の標的部位と第2の標的部位との間に位置する変異を有する対象の細胞から誘導された人工多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、Casタンパク質、第1のgRNA、第2のgRNA、または鑄型DNAを形質導入する1つ以上のウイルスと接触させられる。いくつかの実施形態では、細胞は、Casタンパク質をコードする核酸を細胞に形質導入する第1のウイルスならびに第1のgRNA、第2のgRNA、及び鑄型DNAをコードする核酸を細胞に形質導入する第2のウイルスと接触させられる。いくつかの実施形態では、第1のウイルスまたは第2のウイルスは、AAVウイルスである。いくつかの実施形態では、改変されたゲノムを有する細胞は、機能的な切断型ジストロフィンを発現することができる。いくつかの実施形態では、改変されたゲノムを有する細胞は、完全長型ジストロフィンを発現することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、インビトロ、エキスピボ、またはインビボで接触させられる。

30

40

【0017】

本開示のいくつかの態様は、Casタンパク質をコードする核酸を細胞に形質導入する第1のウイルスならびに第1のgRNA、第2のgRNA、及び鑄型DNAをコードする核酸を細胞に形質導入する第2のウイルスを含む組成物であって、第1のgRNAは、DMDの第1のイントロンに位置する第1の標的部位とハイブリダイズし、第2のgRNAは、DMDの別のイントロンに位置する第2の標的部位とハイブリダイズし、鑄型DNAは、第1の標的部位と第2の標的部位との間に位置する1つ以上のDMDエクソンをコードする、組成物に関する。いくつかの実施形態では、鑄型DNAは、1つ以上のエクソンと隣接する第1及び第2の標的部位の一部をさらに含む。

【0018】

50

特許または出願ファイルは、カラーで描かれた少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含むこの特許または特許出願公開のコピーは、請求及び必要な料金の支払いに応じて官庁により提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】2つのAAVを用いた変異型エクソン23の削除の概略を示す。第1のAAVはSaCas9のための配列を提供し、第2はエクソン23に隣接する標的部位を有する2つのgRNAを提供する。示された結果は、変異エクソンの削除であり、機能的な切断型ジストロフィンの産生をもたらす。

【図2】2つのAAVを用いた変異型エクソン23の削除の概略を示す。第1のAAVはSaCas9のための配列を提供し、第2はエクソン23に隣接する標的部位と、2つのgRNAの標的部位によって隣接された野生型エクソン23配列とを有する2つのgRNAを提供する。示された結果は変異エクソンの削除であり、機能的な切断型ジストロフィンの産生をもたらす。

【図3】2つのAAVを用いた変異型エクソン23の削除及び置換の概略を示す。第1のAAVはSaCas9のための配列を提供し、第2のAAVはエクソン23に隣接する標的部位と、2つのgRNAの標的部位によって隣接された野生型エクソン23配列とを有する2つのgRNAを提供する。示された結果は、機能的な切断型ジストロフィン、または第2のAAVからの野生型エクソン23配列とのNHEJによって置換された変異型エクソン23を有する完全なジストロフィンタンパク質のいずれかの産生をもたらす変異型エクソンの削除である。

【図4】2つのAAVを用いた変異型エクソン23の削除及び置換のための概略を示す。上記図3における説明を参照。図4に示す概略は、第2のAAVからの野生型エクソン23配列が間違った方向でゲノムにNHEJにより挿入される場合、gRNA標的部位が再構成され、挿入物が切除され、機能的な切断型ジストロフィンの産生をもたらすことをさらに提供する。

【図5】デュシェンヌ患者の60%における変異の位置であるエクソン45～55に対する、図1～4に詳述したエクソン削除及び置換方法の使用を示す。この方法は、機能的な切断型ジストロフィンまたは置換エクソン45～55を含む全長ジストロフィンの産生をもたらす得る。

【図6】HEK293細胞におけるエクソン45～55での変異「ホットスポット」を標的とするヒトDMDエクソンの削除及び置換方法の結果を示す。

【図7】挿入配列及びイントロン55の接合部における正しい方向への置換エクソン45～55のNHEJから予測されるライゲーション配列を示す概略である。本明細書に示す配列データにより、挿入に成功したことが確認される。図7に示すプライマーペア605及び606を用いたPCRは、正しい方向での置換エクソン45～55の挿入が成功した場合にのみ、PCR増幅産物をもたらす。

【図8】挿入配列及びイントロン44の接合部における正しい方向への置換エクソン45～55のNHEJから予測されるライゲーション配列を示す概略である。本明細書に示す配列データにより、挿入に成功したことが確認される。プライマーペア603及び606を用いたPCRを図8に示す。

【図9】イントロン44及び55のNHEJから予測されるライゲーション配列を示す概略である。本明細書に示す配列データにより、エクソン45～55の削除が確認される。プライマーペア603及び606を用いたPCRを図8に示す。

【図10】削除産物のPCR増幅を示す。

【図11】鋳型とイントロン55との間の接合部のPCR増幅を示す。

【図12】イントロン44とイントロン55との間の接合部のPCR増幅を示す。

【図13】イントロン44と鋳型との間の接合部のディープアンプリコンシーケンスによって検出された上位5つのバリエーションを示す。

【図14】イントロン44からイントロン55までのhDMD(NG_012232.1

10

20

30

40

50

) の配列を示す概略である。

【図 15】エクソン 45～55、及びエクソンに隣接するイントロン 44 とイントロン 55 の部分を含む DNA 鋳型と、gRNA 標的配列を含む HITI B の配列を示す概略である。

【図 16】エクソン 45～55、及びエクソンに隣接するイントロン 44 とイントロン 55 の部分を含む DNA 鋳型と、gRNA 標的配列を含む HITI K の配列を示す概略である。

【図 17A】Runx1 及び Psc k9 切断対照でヌクレオフェクションした細胞から増幅した DNA における Runx1 遺伝子座及び Psc k9 遺伝子座のインデルの ICE 定量化を示す。

【図 17B】示された Cas9 複合体でヌクレオフェクションした細胞から増幅した DNA における mdx 遺伝子座の修飾対立遺伝子のディープアンプリコンシーケンス定量化を示す。

【図 18A】タモキシフェン注射プロトコルの結果を示す。タモキシフェン注射プロトコルの概略。

【図 18B】タモキシフェン注射プロトコルの結果を示す。ビヒクル注射した Pax7-CreERT²+/-、Rosa26-LSL-SpCas9-P2A-EGFP⁺/マウス、または P16-P19 から毎日注射し、最初の注射の 5 日後に収穫した 3 匹の複製 Pax7-CreERT²+/-、Rosa26-LSL-SpCas9-P2A-EGFP⁺/動物から P21 で分離したサテライト細胞の代表的 FACS 解析である。

【図 18C】タモキシフェン注射プロトコルの結果を示す。タモキシフェン処理 Pax7-CreERT²+/-、Rosa26-LSL-SpCas9-P2A-EGFP⁺/マウスからの EGFP- 及び EGFP+ 細胞を選別するためのゲーティング方法である。プロットは、サテライト細胞マーカー (CD45-Scal-Mac1-CXCR4+CD29+) について事前にゲーティングされる。

【図 18D】タモキシフェン注射プロトコルの結果を示す。(C) の EGFP- 及び EGFP+ ゲートから選別されたサテライト細胞の共焦点画像である。

【図 19】ビヒクル注射または 5 dpi (P16~19) Pax7-CreERT²+/-、Rosa26-LSL-SpCas9-P2A-EGFP⁺/マウスから P21 で分離した前脛骨筋の断面の免疫蛍光解析を示す。EGFP は、ビヒクルではなくタモキシフェンを注射したマウスの Pax7+ サテライト細胞で検出され、EGFP は筋繊維で検出されない。

【図 20A】タモキシフェン注射プロトコルの結果を示す。タモキシフェン注射プロトコルの概略。

【図 20B】タモキシフェン注射プロトコルの結果を示す。ビヒクル注射した Pax7-CreERT²+/-、Rosa26-LSL-SpCas9-P2A-EGFP⁺/マウス、または P16-P19 から毎日注射し、最初の注射の 26 日後に収穫した 3 匹の複製 Pax7-CreERT²+/-、Rosa26-LSL-SpCas9-P2A-EGFP⁺/動物から P42 で分離したサテライト細胞の代表的 FACS 解析である。プロットは、サテライト細胞マーカー (CD45-Scal-Mac1-CXCR4+CD29+) について事前にゲーティングされる。

【発明を実施するための形態】

【0020】

発明の詳細な説明

DMD のエクソン 45～55 を改変する方法

本開示のいくつかの態様は、哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムを改変する方法であって、細胞を Cas タンパク質ならびに第 1 及び第 2 のガイドリボ核酸 (gRNA) と接触させ、それによって DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間に位置する哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムを改変することを含み、第 1 の gRNA は、DMD のイントロン 44 に位置する第 1 の標的部位とハイブリダイズし、第 2 の g

10

20

30

40

50

RNAは、DMDのイントロン55に位置する第2の標的部位とハイブリダイズする、方法に関する。

【0021】

本明細書中で使用される場合、「筋肉または筋肉前駆細胞」という語句は、発生のすべての段階におけるあらゆる分類の筋細胞を広く指す。したがって、「筋肉または筋肉前駆細胞」は、例えば、筋芽細胞などの未分化筋細胞、ならびに例えば、最終分化筋管などの分化筋細胞の両方を包含する。「筋肉または筋肉前駆細胞」はまた、横紋筋細胞（例えば、骨格筋細胞）、平滑筋細胞（例えば、腸筋細胞）、及び心筋細胞を含むが、これらに限定されないさまざまな組織学的タイプの筋細胞も包含する。いくつかの実施形態では、「筋肉または筋肉前駆細胞」は、骨格筋細胞または骨格筋前駆細胞である。いくつかの実施形態では、「筋肉または筋肉前駆細胞」は、骨格筋細胞、骨格筋前駆細胞、心筋細胞、または心筋前駆細胞である。

10

【0022】

哺乳動物の細胞は、限定されない。いくつかの実施形態では、細胞は、霊長類、げっ歯類、家畜または狩猟動物の細胞である。霊長類としては、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、及び例えば、アカゲザルなどのマカクが挙げられる。げっ歯類としては、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ及びハムスターが挙げられる。家畜及び狩猟動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ種、例えば、イエネコ、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、及びオオカミが挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒトまたはイヌの細胞である。

20

【0023】

いくつかの実施形態では、細胞は、幹細胞または人工多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、人工多能性幹細胞は、筋ジストロフィーの対象の細胞から誘導された人工多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、人工多能性幹細胞は、筋ジストロフィーを有し、DMD遺伝子のイントロン44からイントロン55の間に位置する変異を有する対象の細胞から誘導される。いくつかの実施形態では、変異は、フレームシフト変異である。

【0024】

Casタンパク質は、限定されない。クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）II型システムは、ゲノム操作のためのRNAガイドエンドヌクレアーゼ技術として使用するために改変された細菌の獲得免疫システムである。細菌のシステムは、crRNA及びtracrRNAと呼ばれる2つの内在性細菌RNAならびにCRISPR関連（Cas）ヌクレアーゼ、例えば、Cas9を含む。tracrRNAは、crRNAと部分的な相補性を有し、それと複合体を形成する。Casタンパク質は、crRNA／tracrRNA複合体によって標的配列に誘導され、これは標的内でcrRNA配列と相補配列との間にRNA／DNAハイブリッドを形成する。ゲノム改変に使用するために、crRNA及びtracrRNA構成要素は、組み合わせられて単一のキメラガイドRNA（sgRNAまたはgRNA）にされることが多く、その場合、crRNAの標的特異性及びtracrRNAの特性が組み合わせられて、Casタンパク質がDNAを切断できるようにCasタンパク質を標的配列に局在させる単一の転写物にされる。gRNAは、多くの場合に所望の標的配列と相補的、またはそれと相同なおよそ20ヌクレオチドのガイド配列に続いて、約80ntのハイブリッドcrRNA／tracrRNAを含む。当業者は、ガイドRNAが標的配列と完全に相補的または相同である必要はないことを理解する。例えば、いくつかの実施形態では、それは1つまたは2つのミスマッチを有する場合がある。gRNAがハイブリダイズするゲノム配列には、通常、片側にプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列が隣接しているが、当業者は、ある特定のCasタンパク質がPAM配列に対して緩やかな要件を有する場合があることを十分に理解する。PAM配列はゲノムDNA中に存在するが、gRNA配列中には存在しない。Casタンパク質は、正確な標的配列及びPAM配列を有する任意のDNA配列を対象とすることになる。PAM配列は、Casタンパク質が由来する細菌の種に応じて変化する。

30

40

50

Casタンパク質の具体例としては、Cas 1、Cas 2、Cas 3、Cas 4、Cas 5、Cas 6、Cas 7、Cas 8、Cas 9及びCas 10が挙げられる。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas 9タンパク質を含む。例えば、*Streptococcus pyogenes* (Sp)、*Neisseria meningitidis*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus thermophiles*、または*Treponema denticola*由来のCas 9が使用されてもよい。これらのCas 9タンパク質のPAM配列は、それぞれNGG、NNNGATT、NNAGAA、NAAAACである。いくつかの実施形態では、Cas 9は、*Staphylococcus aureus* (saCas 9)に由来する。いくつかの実施形態では、Cas 9は、単純なNGG PAMを認識し、ゲノム編集に高い活性を示し、ゲノム編集のためにAAVにパッケージングされる程十分に小型である、*Staphylococcus auricularis* (SauriCas 9)由来の小さなCas 9オルソログである。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、*Campylobacter jejuni* (CjCas 9)、*Neisseria meningitidis* Cas 9 (NmeCas 9)、Cas 12b (Strecke et al., Nat Commun. 2019 Jan 22; 10(1): 212を参照)、またはCas X (Nature. 2019 Feb 4. pii: 10.1038/s41586-019-0908-x. doi: 10.1038/s41586-019-0908-xを参照)である。

10

20

30

40

50

【0025】

Casタンパク質の操作されたバリエーションが多数開発されており、ある特定の実施形態において使用されてもよい。例えば、Cas 9の操作されたバリエーションは、当該技術分野において知られている。さらに、当然のことながら、生物学的に活性なフラグメントまたはバリエーションが使用されてもよい。他の選択肢としては、ハイブリッド部位特異的ヌクレアーゼの使用が挙げられる。例えば、CRISPR RNA誘導型FokIヌクレアーゼ (RFN) では、FokIヌクレアーゼドメインが、触媒的に不活性なCas 9タンパク質 (dCas 9) タンパク質のアミノ末端に融合される。RFNは二量体として機能し、2つのガイドRNAを利用する (Tsai, QS, et al., Nat Biotechnol. 2014; 32(6): 569-576)。一本鎖DNA切断を生成する部位特異的ヌクレアーゼも、ゲノム編集に有用である。「ニッカーゼ」と呼ばれることもある、そのようなヌクレアーゼは、2つのヌクレアーゼドメインを含む部位特異的ヌクレアーゼ (ZFN、TALEN、及びCasタンパク質など) の2つのヌクレアーゼドメインのうちの1つの重要な触媒残基に変異 (例えば、アラニン置換) を誘導することによって生成することができる。そのような変異の例としては、SpCas 9におけるまたは他のCas 9タンパク質の相同な位置におけるD10A、N863A、及びH840Aが挙げられる。ニックは、一部の細胞型では低効率でHDRを刺激し得る。互いに近く、反対の鎖上に存在する一対の配列を標的とする2つのニッカーゼは、各鎖上に一本鎖切断を作成して (「ダブルニックング」)、DSBを効果的に生成し得、これは場合によりドナーDNA鋳型を使用してHDRによって修復され得る (Ran, F. A. et al. Cell 154, 1380-1389 (2013))。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、SpCas 9バリエーションである。いくつかの実施形態では、SpCas 9バリエーションは、R661A/Q695A/Q926A三重バリエーションまたはN497A/R661A/Q695A/Q926A四重バリエーションである。参照によってその全体が本明細書に組み込まれるKleinstiver et al., "High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects," Nature, Vol. 529, pp. 490-495 (及び補足資料) (2016)を参照。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、クラス2タイプV-B CRISPR-Casタンパク質のC2c1である。参照によってその全体が本明細書に組み込まれるYang et al., "PAM-Dependent Target DNA Recogniti

on and Cleavage by C2c1 CRISPR-Cas Endonuclease,” Cell, Vol. 167, pp. 1814–1828 (2016) を参照。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、参照によって本明細書に組み込まれるUS20160319260「Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with Altered PAM Specificity」に記載されているものである。

【0026】

いくつかの実施形態では、第1及び第2のgRNAの標的配列は、配列番号6及び配列番号7である。いくつかの実施形態では、第1及び第2のgRNAの標的配列は、配列番号8及び配列番号9である。いくつかの実施形態では、第1及び第2のgRNAは、本明細書に記載されている任意のgRNA対またはgRNA標的配列の対である。いくつかの実施形態では、第1及び第2のgRNAは、表1に示されるgRNA標的配列の対を有する。

10

【0027】

DMD遺伝子は、限定されない。いくつかの実施形態では、DMD遺伝子は、ヒトDMD遺伝子 (Gene ID: 1756) である。ジストロフィン (DMD) 遺伝子は、既知の最大の遺伝子である。DMDは、X染色体の2.2Mbに及び、大部分は79のエクソンから誘導される14kbの転写物をコードする。骨格筋、平滑筋、及び心筋細胞において発現される完全長型ジストロフィンタンパク質は、3685アミノ酸であり、427kDの分子量を有する。重症のデュシェンヌ表現型は、一般に骨格筋及び心筋からの完全長型ジストロフィンタンパク質の喪失に関連し、これは、衰弱性筋変性及び、最終的に、心不全に至る。多くのさまざまなDMD変異が示されてきたが、それらの多くは、結果として重症のデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたはそれより軽症のベッカー型筋ジストロフィーのいずれかをもたらす。Leiden University Medical Centerは、参照によって本明細書に組み込まれるDMD遺伝子の変異のデータベース (www.dmd.nl) を管理する。

20

【0028】

いくつかの実施形態では、ゲノムの改変は、DMDのイントロン44からイントロン55の間のヌクレオチド配列の除去を含む。いくつかの実施形態では、改変されたゲノムは、配列番号5の配列を含み、図9に「ダッシュ」として示されるヌクレオチドは、存在しないか、または1～10個の挿入アミノ酸を含む。

30

【0029】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を野生型DMDのエクソン45から55のヌクレオチド配列を含む鋳型DNAと接触させるステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、エクソン45～55のヌクレオチド配列は、配列番号28と相同もしくは同一のヌクレオチド配列または配列番号28と少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは99.9%相同なヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、鋳型配列は、配列番号10もしくは11と相同または同一のヌクレオチド配列またはその一部を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、鋳型配列は、配列番号10、11、もしくは28と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%以上相同または同一であるか、またはその一部である。いくつかの実施形態では、鋳型DNAは、野生型DMDのエクソン45から55のヌクレオチド配列と隣接する第1及び第2の標的部位の一部を含む。この態様で使用されるとおり、鋳型DNAは、標的配列内のCasによる切断後の配列を含む。鋳型DNAの標的配列は、細胞のゲノムにおいてエクソン45～55のいずれかの側にある標的部位の位置とはインサートの反対側に位置していなければならない。それにより、鋳型からのゲノムDNAへのエクソン45～55の正しい方向での挿入時に、標的部位が破壊されることになる。しかしながら、エクソン45～55が間違った方向に挿入された場合、標的部位は、再構成されることになり、ガイド配列との

40

50

ハイブリダイゼーション時に Cas タンパク質によって再び切断され得る。例えば、図 4 を参照のこと。

【0030】

いくつかの実施形態では、ゲノムの改変は、野生型 DMD のエクソン 45 から 55 を含む鋳型 DNA による DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間のヌクレオチド配列の置換を含む。いくつかの実施形態では、置換されたヌクレオチド配列は、配列番号 28 または配列番号 28 と少なくとも 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、もしくは 99.9 % 相同なヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間のヌクレオチド配列の置換は、非相同末端結合 (NHEJ) により生じる。非相同末端結合 (NHEJ) は、DNA の二本鎖切断を修復する経路である。修復をガイドする相同配列を必要とする相同組換え修復とは対照的に、相同鋳型を必要とせずに、切断末端が直接ライゲーションされるため、NHEJ は「非相同」とも呼ばれる。

10

【0031】

いくつかの実施形態では、DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間に位置する哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムは、疾患または状態に関連する変異を含む。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態では、筋ジストロフィーは、筋強直性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、及びエメリ・ドレフュス型筋ジストロフィーから選択される。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーである。

20

【0032】

いくつかの実施形態では、細胞は、Cas タンパク質、第 1 の gRNA、第 2 の gRNA、及び／または鋳型 DNA のうちの 1 つ以上を形質導入する 1 つ以上のウイルスと接触させられる。本明細書全体にわたって開示される方法での使用に好適なウイルスとしては、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス (例えば、レンチウイルス)、ワクシニアウイルス及び他のポックスウイルス、ヘルペスウイルス (例えば、単純ヘルペスウイルス) などが挙げられる。ウイルスは、宿主細胞に導入されたときに感染性ウイルスを産生するのに十分なウイルスの遺伝情報を含んでいても、または含んでいなくてもよい。すなわち、ウイルスベクターは、複製可能であっても、または複製欠損であってもよい。

30

【0033】

いくつかの実施形態では、ウイルスは、アデノ随伴ウイルスである。アデノ随伴ウイルス (AAV) は、小さな (20 nm) 複製欠損非エンベロープウイルスである。AAV ゲノムは、約 4.7 キロベース長の一本鎖 DNA (ssDNA) である。ゲノムは、DNA 鎖の両端に逆方向末端反復配列 (ITR)、ならびに 2 つのオープンリーディングフレーム (ORF) : rep 及び cap を含む。AAV ゲノムは、19 番染色体上の特定の部位に最も頻繁に組み込まれる。ゲノム中へのランダムな組み込みは、ごくわずかな頻度で生じる。組み込み能力は、ベクターから rep ORF の少なくとも一部を除去することによって排除される場合があり、結果としてエピソームの状態を保持し、少なくとも非分裂細胞中で持続的な発現を提供するベクターをもたらす。AAV を遺伝子導入ベクターとして使用するために、プロモーターに機能的に連結される、所望のタンパク質または RNA をコードする核酸配列、例えば、ATPIF1 を阻害するポリペプチドまたは RNA をコードする核酸配列を含む核酸が、AAV ゲノムの逆方向末端反復配列 (ITR) 間に挿入される。例えば、遺伝子治療のためのアデノ随伴ウイルス (AAV) 及びベクターとしてのその使用については、Snyder, RO and Moullier, P., Adeno-Associated Virus Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 807. Hum

40

50

ana Press, 2011でも述べられている。

【0034】

いくつかの実施形態では、AAVは、AAV血清型6、8、9、10またはAnc80である(WO2015054653に開示され、参照によって本明細書に組み込まれる)。いくつかの実施形態では、AAV血清型は、AAV血清型2である。任意のAAV血清型、または改変AAV血清型が適宜使用されてよく、かつ限定されない。

【0035】

別の好適なAAVは、例えば、rhLOであってよい[例えば、WO2003/042397を参照のこと]。さらに他のAAV供給源としては、例えば、AAV9[例えば、US7,906,111、US2011-0236353-A1を参照のこと]、及び/またはhu37[例えば、US7,906,111、US2011-0236353-A1を参照のこと]、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8[例えば、米国特許第7790449号、米国特許第7282199号を参照のこと]などが挙げられてよい。これらの及び他の好適なAAVの配列に加えて、AAVベクターを生成する方法については、例えば、WO2003/042397、WO2005/033321、WO2006/110689、米国特許第7790449号、米国特許第7282199号、及びUS7588772B2を参照のこと。さらに他のAAVが、場合により、選択されたAAVカプシドの組織選択性を考慮に入れて選択されてよい。組換えAAVベクター(AAVウイルス粒子)は、AAVカプシド内にパッケージングされた、5' AAV ITR、本明細書に記載される発現カセット及び3' AAV ITRを含有する核酸分子を含んでよい。本明細書に記載されるように、発現カセットは、各発現カセット内にオープンリーディングフレーム(複数可)のための調節エレメントを含有してよく、核酸分子は、場合により追加の調節エレメントを含有してよい。

【0036】

AAVベクターは、全長AAV 5' 逆方向末端反復配列(ITR)及び全長3' ITRを含有してよい。A ITRと称される5' ITRの短縮型が記載されていて、それはD-配列及び末端分解部位(trs)が欠失している。「sc」という略語は、自己相補的であることを指す。「自己相補的AAV」は、組換えAAV核酸配列が保有しているコード領域が、分子内二本鎖DNA鑄型を形成するように設計されている構築物を指す。感染時、第2鎖の細胞媒介合成を待つのではなく、scAAVの2つの相補的な半分が会合して、すぐに複製及び転写を行う準備ができている1本の二本鎖DNA(dsDNA)単位を形成することになる。例えば、D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254を参照のこと。自己相補的AAVは、例えば、米国特許第6,596,535号、同第7,125,717号、及び同第7,456,683号に記載され、その各々の全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0037】

偽型AAVが産生される場合、ITRは、カプシドのAAV供給源とは異なる供給源から選択される。例えば、AAV2 ITRは、選択された細胞受容体、標的組織またはウイルス標的に対して特定の効率を有するAAVキャプシドと共に使用するために選択され得る。一実施形態では、AAV2に由来するITR配列、またはその欠失型(A ITR)が、便宜上、かつ規制当局の承認を早めるために使用される。しかしながら、他のAAV供給源に由来するITRが選択されてもよい。ITRの供給源がAAV2に由来し、AAVカプシドが別のAAV供給源に由来する場合、得られたベクターは偽型と称される場合がある。しかしながら、AAV ITRの他の供給源が利用されてもよい。

【0038】

10

20

30

40

50

一本鎖 A A V ウイルスベクターが使用されてよい。対象への送達に適した A A V ウイルスベクターを生成及び単離するための方法が当該技術分野において知られている。例えば、米国特許第 7 7 9 0 4 4 9 号；米国特許第 7 2 8 2 1 9 9 号；WO 2 0 0 3 / 0 4 2 3 9 7；WO 2 0 0 5 / 0 3 3 3 2 1、WO 2 0 0 6 / 1 1 0 6 8 9；及び米国特許第 7 5 8 8 7 7 2 B 2 号を参照のこと。1つのシステムでは、産生細胞株が、I T R に隣接する導入遺伝子をコードする構築物ならびに r e p 及び c a p をコードする構築物（複数可）で一過性トランスフェクトされる。第 2 システムでは、r e p 及び c a p を安定して供給するパッケージング細胞株が、I T R に隣接する導入遺伝子をコードする構築物で（一過性または安定に）トランスフェクトされる。こうしたシステムのそれぞれにおいて、A A V ビリオンは、ヘルパーアデノウイルスまたはヘルペスウイルスの感染に応じて産生され、混入ウイルスから r A A V を分離する必要がある。最近では、A A V を回復させるためにヘルパーウイルスの感染を必要としないシステムが開発され、必要とされるヘルパー機能（すなわち、アデノウイルス E 1、E 2 a、V A、及び E 4 またはヘルペスウイルス U L 5、U L 8、U L 5 2、及び U L 2 9、ならびにヘルペスウイルスポリメラーゼ）もトランスでシステムによって供給される。これらの新しいシステムでは、ヘルパー機能は、必要とされるヘルパー機能をコードする構築物による細胞の一過性トランスフェクションによって供給されてもよく、または細胞は、ヘルパー機能をコードする遺伝子を安定して含むよう操作することができ、その発現は、転写または転写後レベルで制御することができる。さらに別のシステムでは、I T R に隣接する導入遺伝子及び r e p / c a p 遺伝子は、バキュロウイルスベクターの感染によって昆虫細胞に導入される。これらの産生システムに対する概説に関しては、一般に、例えば、それぞれの内容全体が参照によって本明細書に組み込まれる Zhang et al, 2009, "Adenovirus-adenovirus-associated virus hybrid for large-scale recombinant adenovirus production," Human Gene Therapy 20:922-929 を参照のこと。これら及びその他の A A V 産生システムを作製及び使用方法は、以下の米国特許にも記載されており、その内容全体が参照によって本明細書に組み込まれる：5, 139, 941；5, 741, 683；6, 057, 152；6, 204, 059；6, 268, 213；6, 491, 907；6, 660, 514；6, 951, 753；7, 094, 604；7, 172, 893；7, 201, 898；7, 229, 823；及び 7, 439, 065。

10

20

30

【0039】

別の実施形態では、導入ウイルス、例えば、ヘルペスウイルスまたはレンチウイルスを含む他のウイルスベクターが使用されてもよいが、その他のウイルスが選択されてもよい。好適には、これらの他のベクターのうち 1 つが生成される場合、それは複製欠損ウイルスベクターとして産生される。「複製欠損ウイルス」または「ウイルスベクター」とは、目的の遺伝子を含む発現カセットがウイルスキャプシドまたはエンベロープにパッケージングされた合成または人工のウイルス粒子を指し、ウイルスキャプシドまたはエンベロープ内にパッケージングもされる任意のウイルスゲノム配列は、複製欠損であり；すなわち、それらは、子孫ビリオンを生成し得ないが、標的細胞を感染させる能力を保持し得る。一実施形態において、ウイルスベクターのゲノムは、複製に必要な酵素をコードする遺伝子を含まない（このゲノムは、人工ゲノムの増幅及びパッケージングに必要なシグナルに隣接する目的の導入遺伝子のみを含む「ガットレス」であるように操作されてもよい）が、これらの遺伝子は生成中に供給されてもよい。

40

【0040】

1 つ以上のウイルスは、哺乳動物細胞において発現（例えば、C a s タンパク質、鋳型 D N A、及び／または 1 つ以上の g R N A の発現）を誘導することができる、例えば、サイトメガロウイルス（C M V）、レトロウイルス、サルウイルス（例えば、S V 4 0）、パピローマウイルス、ヘルペスウイルスもしくは哺乳動物細胞に感染するその他のウイルス由来の適したウイルスプロモーターなどのプロモーター、または例えば、遺伝子由来の

50

、例えば、EF1アルファ、ユビキチン（例えば、ユビキチンBまたはC）、グロビン、アクチン、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）などの哺乳動物プロモーター、あるいはCAGプロモーター（CMV早期エンハンサーエレメント及びニフトリベータアクチンプロモーターの組み合わせ）などの複合プロモーターを含んでもよい。いくつかの実施形態では、ヒトプロモーターが使用されてよい。いくつかの実施形態では、プロモーターは、CMVプロモーター、U6プロモーター、H1プロモーター、構成的プロモーター、及びユビキタスプロモーターから選択される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、特定の細胞型における発現を誘導する。例えば、筋前駆細胞特異的プロモーター。

【0041】

本明細書に開示される各方法のいくつかの実施形態では、好適な組織特異的プロモーターは、ワールドワイドウェブの `tiprod.bioinf.med.uni-goettingen.de` / で利用可能な「TiProD: Tissue specific promoter Database」に記載されている組織特異的プロモーターから当業者であれば得られ得る。

【0042】

いくつかの実施形態では、細胞は、Casタンパク質をコードする核酸を細胞に形質導入する第1のウイルスならびに第1のgRNA、第2のgRNA、及び鋳型DNAをコードする核酸を細胞に形質導入する第2のウイルスと接触させられる。いくつかの実施形態では、少なくとも第1のウイルスまたは第2のウイルスは、AAVウイルスである。いくつかの実施形態では、細胞は、Casタンパク質をコードする核酸を細胞に形質導入する第1のウイルス及び配列番号26（HITIB）の核酸を形質導入する第2のウイルスと接触させられる。いくつかの実施形態では、細胞は、Casタンパク質をコードする核酸を細胞に形質導入する第1のウイルス及び配列番号27（HITIK）の核酸を形質導入する第2のウイルスと接触させられる。

【0043】

いくつかの実施形態では、改変されたゲノムで処理された細胞は、DMD遺伝子のエクソン45から55によってコードされるアミノ酸配列が欠如した機能的な切断型ジストロフィンを発現する。いくつかの実施形態では、改変されたゲノムで処理された細胞は、野生型DMDのエクソン45から55によってコードされるアミノ酸配列を含む完全長型ジストロフィンを発現する。いくつかの実施形態では、改変されたゲノムで処理された細胞は、配列番号28または配列番号28と少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは99.9%相同なヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む完全長型ジストロフィンを発現する。

【0044】

いくつかの実施形態では、細胞は、インビトロで接触させられる。いくつかの実施形態では、細胞は、対象から得られ、エクスピボで接触させられる。いくつかの実施形態では、処理された細胞は、対象に投与される。いくつかの実施形態では、細胞は、インビボで接触させられる。いくつかの実施形態では、対象は、本明細書に記載されている1つ以上のウイルスを投与され、結果として細胞が本明細書に記載されているCas9、gRNA及び鋳型DNAと接触させられる。

【0045】

イントロン44からイントロン55の間に位置する変異を有する筋ジストロフィー患者を処置する方法

本開示のいくつかの態様は、処置を必要とする対象において筋ジストロフィーを処置する方法であって、患者の筋肉または筋肉前駆細胞をCasタンパク質ならびに第1及び第2のガイドRNA（gRNA）と接触させ、それによって細胞のゲノムを改変することを含み、第1のgRNAは、DMDのイントロン44に位置する第1の標的部位とハイブリダイズし、第2のgRNAは、DMDのイントロン55に位置する第2の標的部位とハイブリダイズし、対象のゲノムは、DMD遺伝子のイントロン44からイントロン55の

10

20

30

40

50

間に位置する変異を含む、方法を対象とする。

【0046】

いくつかの実施形態では、対象の筋肉または筋肉前駆細胞の少なくとも1%、2%、3%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%以上が、本明細書中で開示されている方法によって改変されたそのゲノムを有する。

【0047】

本明細書で使用される場合、疾患、障害または病状（例えば、筋ジストロフィー）に関連して使用される場合の「処置する」、「処置」、「処置すること」、または「改善」は、状態の治療的処置を指し、目的は、症状または状態の進行または重症度を逆転、軽減、改善、阻害、鈍化または停止することである。「処置すること」という用語は、状態の少なくとも1つの有害作用または症状を減少または軽減させることを含む。1つ以上の症状または臨床マーカーが低減された場合、処置は、一般に「有効」である。あるいは、状態の進行が低減または停止された場合、処置は「有効」である。すなわち、「処置」は、症状またはマーカーの改善だけでなく、処置が行われない場合に予想される症状の進行または悪化の停止または少なくとも遅延も含む。有益なまたは所望の臨床結果としては、処置が行われない場合に予想されるものと比較した場合に、1つ以上の症状（複数可）の軽減、欠損程度の縮小、安定した（すなわち、悪化しない）状態が挙げられるが、これらに限定されない。

【0048】

障害または疾患に対する所与の処置の有効性は、熟練した臨床医によって決定され得る。ただし、処置は、本明細書に記載される薬剤または組成物による処置後に、障害の徴候または症状のうちのいずれか1つまたはすべてが有益な様式で改変され、その他の臨床的に認められる症状が、例えば、少なくとも10%改善または回復した場合に、用語が本明細書中で使用されるとおり「有効な処置」と見なされる。また、有効性は、個体が入院施設で評価されたとおりに悪化しないことまたは医療介入を必要としない（すなわち、疾患の進行が停止している）ことによっても測定され得る。これらの指標を測定する方法は当業者に既知であり、及び／または本明細書に記載されている。

【0049】

筋ジストロフィーは限定されず、本明細書に記載されている任意の筋ジストロフィーであり得る。いくつかの実施形態では、筋ジストロフィーは、ベッカー型筋ジストロフィーまたはデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。患者の筋肉または筋肉前駆細胞は限定されず、本明細書に記載されている任意の筋肉または筋肉前駆細胞であり得る。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト細胞またはイヌ細胞である。いくつかの実施形態では、「筋肉または筋肉前駆細胞」は、骨格筋細胞または骨格筋前駆細胞である。

【0050】

Casタンパク質は限定されず、本明細書に記載されている任意のCasタンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、Cas9（例えば、saCas9）である。gRNAは限定されず、任意の適切なgRNAであり得る。いくつかの実施形態では、gRNAの標的配列は、配列番号6～9に示される標的配列から選択される。いくつかの実施形態では、gRNA対は、配列番号6～7または配列番号8～9に示される標的配列に結合する。いくつかの実施形態では、gRNA対は、表1に示される標的配列に結合する。

【0051】

いくつかの実施形態では、ゲノムの改変は、DMDのイントロン44からイントロン55の間のヌクレオチド配列の除去を含む。

【0052】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を野生型DMDのエクソン45から55のヌクレオチド配列を含む鋳型DNAと接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、エクソン45から55のヌクレオチド配列は、配列番号28を含むか、またはそれが

らなる。いくつかの実施形態では、鋳型 DNA は、野生型 DMD のエクソン 45 から 55 のヌクレオチド配列と隣接する第 1 及び第 2 の標的部位の一部を含む。本明細書に記載されるとおり、標的部位は、対象のゲノムにおいて標的配列の位置とは野生型 DMD のエクソン 45 から 55 のヌクレオチド配列の反対の末端に位置し得る。そのような構成は、置換エクソン配列の正しい挿入時には標的とする配列を喪失させるが、置換エクソン配列が正しい方向で挿入されない場合は、標的配列を再構成する（場合によって、Cas タンパク質による切断が続く）。

【0053】

いくつかの実施形態では、ゲノムの改変は、野生型 DMD のエクソン 45 から 55 を含む鋳型 DNA による DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間のヌクレオチド配列の置換を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの改変は、配列番号 10 または 11 のヌクレオチド配列による DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間のヌクレオチド配列の置換を含む。いくつかの実施形態では、DMD のイントロン 44 からイントロン 55 の間のヌクレオチド配列の置換は、非相同末端結合（NHEJ）により生じる。

10

【0054】

いくつかの実施形態では、細胞は、Cas タンパク質、第 1 の gRNA、第 2 の gRNA、または鋳型 DNA を形質導入する 1 つ以上のウイルスと接触させられる。ウイルスは限定されず、本明細書に記載されている任意のウイルスであり得る。いくつかの実施形態では、1 つ以上のウイルスは、AAV ウイルスである。いくつかの実施形態では、対象は、Cas タンパク質をコードする核酸を細胞に形質導入する第 1 のウイルスならびに第 1 の gRNA、第 2 の gRNA、及び鋳型 DNA をコードする核酸を細胞に形質導入する第 2 のウイルスを投与される。いくつかの実施形態では、第 2 のウイルスは、配列番号 26 または 27 のヌクレオチド配列を形質導入する。

20

【0055】

いくつかの実施形態では、改変されたゲノムを有する細胞は、野生型 DMD のエクソン 45 から 55 によってコードされるアミノ酸配列が欠如した機能的な切断型ジストロフィンを発現する。いくつかの実施形態では、改変されたゲノムを有する細胞は、野生型 DMD のエクソン 45 から 55 によってコードされるアミノ酸配列を含む完全長型ジストロフィンを発現する。いくつかの実施形態では、改変されたゲノムを有する細胞は、配列番号 28 または配列番号 28 と少なくとも 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、もしくは 99.9 % 相同なヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む完全長型ジストロフィンを発現する。

30

【0056】

いくつかの実施形態では、細胞は、エキスピボ、またはインピボで接触させられる。本明細書で使用される場合、細胞を 1 つ以上のウイルスと「接触させること」は、対象の全身に（例えば、静脈内に）または局所的に（例えば、筋肉内注射）ウイルスを投与することを含み得る。あるいは、他の投与経路が選択されてよい（例えば、経口、吸入、鼻腔内、気管内、動脈内、眼内、静脈内、筋肉内、及び他の親経路）。接触方法は限定されず、当該技術分野において利用可能な任意の好適な方法であってよい。

40

【0057】

いくつかの実施形態では、ウイルス組成物は、ヒト患者に対して約 1.0×10^9 GC ~ 約 1.0×10^{15} GC の範囲内（体重が 70 kg の平均的な対象を処置するために）、好ましくは 1.0×10^{12} GC ~ 1.0×10^{14} GC である複製欠損ウイルスの量を含むために投与単位で製剤化され得る。好ましくは、製剤中の複製欠損ウイルスの用量は、 1.0×10^9 GC、 5.0×10^9 GC、 1.0×10^{10} GC、 5.0×10^{10} GC、 1.0×10^{11} GC、 5.0×10^{11} GC、 1.0×10^{12} GC、 5.0×10^{12} GC、または 1.0×10^{13} GC、 5.0×10^{13} GC、 1.0×10^{14} GC、 5.0×10^{14} GC、または 1.0×10^{15} GC である。

【0058】

50

筋ジストロフィーを処置するさらなる方法

本開示のいくつかの態様は、哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムを改変するための方法であって、細胞を Cas タンパク質ならびに第 1 及び第 2 のガイドリボ核酸 (gRNA) と接触させ、それによって第 1 の標的部位と第 2 の標的部位との間に位置する哺乳動物の筋肉または筋肉前駆細胞のゲノムを改変することを含み、第 1 の gRNA は、DMD の第 1 のイントロンに位置する第 1 の標的部位とハイブリダイズし、第 2 の gRNA は、DMD の別のイントロンに位置する第 2 の標的部位とハイブリダイズする、方法を対象とする。

【0059】

標的部位間に位置する DMD エクソンは、限定されない。いくつかの実施形態では、標的部位間に位置する DMD エクソンは、機能的なジストロフィンタンパク質（すなわち、機能的な切断型ジストロフィンタンパク質）を産生するために必須ではない。いくつかの実施形態では、DMD エクソン 23 は、第 1 の標的部位と第 2 の標的部位との間に位置する。

【0060】

いくつかの実施形態では、対象の筋肉または筋肉前駆細胞の少なくとも 1%、2%、3%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50% 以上が、本明細書中で開示されている方法によって改変されたそのゲノムを有する。

【0061】

筋ジストロフィーは限定されず、本明細書に記載されている任意の筋ジストロフィーであり得る。いくつかの実施形態では、筋ジストロフィーは、ベッカー型筋ジストロフィーまたはデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。患者の筋肉または筋肉前駆細胞は限定されず、本明細書に記載されている任意の筋肉または筋肉前駆細胞であり得る。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、「筋肉または筋肉前駆細胞」は、骨格筋細胞または骨格筋前駆細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、幹細胞または人工多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、人工多能性幹細胞は、対象の細胞から誘導される。

【0062】

Cas タンパク質は限定されず、本明細書に記載されている任意の Cas タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、Cas タンパク質は、Cas9（例えば、saCas9、spCas9、SauriCas9、KKHCas9）である。いくつかの実施形態では、Cas タンパク質は、単独または 1 から 2 つの gRNA を伴い適したウイルスベクター（例えば、AAV）にパッケージングされる程十分に小さい。gRNA は限定されず、任意の適切な gRNA であり得る。

【0063】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を第 1 の標的部位と第 2 の標的部位との間に位置する DMD エクソンのヌクレオチド配列を含む鋳型 DNA と接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、鋳型 DNA は、第 1 の標的部位と第 2 の標的部位との間に位置する DMD エクソンのヌクレオチド配列と隣接する第 1 及び第 2 の標的部位の一部を含む。本明細書に記載されるとおり、標的部位は、対象のゲノムにおいて標的配列の位置とは DMD エクソンのヌクレオチド配列の反対の末端に位置し得る。そのような構成は、置換エクソン配列の正しい挿入時には標的とする配列を喪失させるが、置換エクソン配列が正しい方向で挿入されない場合は、標的配列を再構成する（場合によって、Cas タンパク質による切断が続く）。

【0064】

いくつかの実施形態では、ゲノムの改変は、第 1 の標的部位と第 2 の標的部位との間に位置する DMD エクソンのヌクレオチド配列を含む鋳型 DNA による第 1 の標的部位と第 2 の標的部位との間に位置するヌクレオチド配列の置換を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列の鋳型配列による置換は、非相同末端結合 (NHEJ) により生じる。

10

20

30

40

50

【0065】

いくつかの実施形態では、第1の標的部位と第2の標的部位との間に位置する細胞のゲノムは、疾患または状態と関連する変異を含む。疾患または状態は限定されず、本明細書に記載されている任意の疾患または状態であり得る。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたはベッカー型筋ジストロフィーである。

【0066】

いくつかの実施形態では、細胞は、Casタンパク質、第1のgRNA、第2のgRNA、または鑄型DNAを形質導入する1つ以上のウイルスと接触させられる。いくつかの実施形態では、細胞は、Casタンパク質をコードする核酸を細胞に形質導入する第1のウイルスならびに第1のgRNA、第2のgRNA、及び鑄型DNAをコードする核酸を細胞に形質導入する第2のウイルスと接触させられる。ウイルスは限定されず、本明細書に記載されている任意のウイルスであり得る。いくつかの実施形態では、少なくとも第1のウイルスまたは第2のウイルスは、AAVウイルスである。

10

【0067】

いくつかの実施形態では、改変されたゲノムを有する細胞は、1つ以上のDMDエクソンによってコードされるアミノ酸配列が欠如した機能的な切断型ジストロフィンを発現する。いくつかの実施形態では、改変されたゲノムを有する細胞は、完全長型ジストロフィンを発現する。

【0068】

いくつかの実施形態では、細胞は、インビトロ、エクスピボ、またはインビボで接触させられる。

20

【0069】

組成物

本開示のいくつかの態様は、Casタンパク質をコードする核酸を細胞に形質導入する第1のウイルスならびに第1のgRNA、第2のgRNA、及び鑄型DNAをコードする核酸を細胞に形質導入する第2のウイルスを含む組成物であって、第1のgRNAは、DMDの第1のイントロンに位置する第1の標的部位とハイブリダイズし、第2のgRNAは、DMDの別のイントロンに位置する第2の標的部位とハイブリダイズし、鑄型DNAは、第1の標的部位と第2の標的部位との間に位置する1つ以上のDMDエクソンをコードする、組成物に関する。いくつかの実施形態では、Casタンパク質は、本明細書に記載されているCasタンパク質（例えば、Cas9）である。いくつかの実施形態では、第1のgRNA、第2のgRNA、及び鑄型DNAが本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、第1のAAV及び第2のAAVを含む組成物は、DMDのイントロン44から55の間に位置する対象のDMDの配列をエクソン45～55をコードする配列で置換するために使用することができる。いくつかの実施形態では、DMDのイントロン44から55の間に位置する対象のDMDの配列をエクソン45～55をコードする配列で置換する際に使用するための第1のAAV及び第2のAAVが本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、第1のAAV及び第2のAAVを含む組成物は、DMDのイントロン22と23との間に位置する対象のDMDの配列を、エクソン23をコードする配列で置換するために使用することができる。

30

40

【0070】

「減少させる」、「低減する」、「低減される」、「低減」、「減少」、及び「阻害する」という用語はすべて、本明細書では一般に、基準と比較して統計的に有意な量の減少を意味するよう使用される。ただし、誤解を避けるために、「低減する」、「低減」もしくは「減少させる」または「阻害する」は、一般に、基準レベルと比較して少なくとも10%の減少を意味し、例えば、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約

50

90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%までの減少及び例えば、基準レベルと比較して所与の要素またはパラメーターの完全な不在を含む減少、あるいは所与の処置がない場合と比較して10～99%の間のあらゆる減少を含むことができる。

【0071】

「増加した」、「増加する」または「増大させる」または「活性化する」という用語はすべて、本明細書では一般に、静的に有意な量の増加を意味するよう使用される。誤解を避けるために、「増加した」、「増加する」、「増大させる」、または「活性化する」という用語は、基準レベルと比較して少なくとも10%の増加、例えば、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%までの増加及び100%の増加を含む増加もしくは基準レベルと比較して10～100%の間のあらゆる増加、あるいは少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍もしくは少なくとも約10倍の増加、または基準レベルと比較して2倍から10倍以上の間のあらゆる増加を意味する。

10

【0072】

本明細書で使用される場合、「含む (comprising)」または「含む (comprises)」という用語は、組成物、方法、及び方法または組成物に不可欠な、それらの各々の構成成分（複数可）に関連して使用されるが、不可欠であろうとなかろうと、指定されていない要素を含むことについて制限されない。

20

【0073】

「からなる」という用語は、本明細書に記載の組成物、方法、及びそれらのそれぞれの構成要素を指し、これらは、実施形態の説明に記載されていないいかなる要素も除く。

【0074】

本明細書で使用される場合、「から本質的にからなる」という用語は、所与の実施形態に必要な要素を指す。用語は、その実施形態の基本的及び新規または機能的特徴（複数可）に実質的に影響を及ぼさない要素の存在を可能にする。

【0075】

「統計学的に有意な」または「有意に」という用語は、統計的有意性を指し、一般に0.05よりも大きい（関連する統計的検定によって算出される）「p」値を意味する。当業者は、任意の特定の試験に関連する統計的検定が、分析されているデータの種類の依存することを容易に理解することになる。追加の定義は、以下で個々の節の本文中において提供される。

30

【0076】

細胞生物学及び分子生物学の一般的な用語の定義は、Merck Research Laboratoriesによって出版された“The Merck Manual of Diagnosis and Therapy”, 19th Edition, 2006 (ISBN 0-911910-19-0); Blackwell Science Ltd.によって出版されたRobert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); Elsevierによって出版されたThe ELISA guidebook (Methods in molecular biology 149) by Crowther J. R. (2000); Immunology by Werner Luttmann, 2006で見つけることができる。分子生物学の一般的な用語の定義は、Jones & Bartlett Publishingによって出版されたBenjamin Lewin, Genes X, 2009 (ISBN-10: 0763766321); VCH Publishers, Inc.によって出版されたKendrew et al. (eds.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive

40

50

e Desk Reference, 1995 (ISBN 1-56081-569-8) 及び Current Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan et al., eds. でも見つけることができる。

【0077】

別段の記載がない限り、本発明は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (2001) 及び Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1995) に記載されているような、標準的な手順を使用して実施され、その両方とも、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【0078】

本開示の実施形態の説明は、網羅的であること、または本開示を開示された正確な形式に限定することを意図するものではない。本開示の特定の実施形態、及びそれに対する例が、説明のために本明細書において記載されているが、関連分野の当業者が認識するであろうとおり、種々の等価な改変物が、本開示の範囲内において可能である。例えば、方法ステップまたは機能が所与の順序で提示されているが、代替的实施形態は、機能を異なる順序で行ってもよく、または機能は、実質的に同時に行われてもよい。本明細書において提供される本開示の教示は、適切であれば他の手順または方法に適用可能である。本明細書に記載されている各種実施形態は、さらなる実施形態を提供するために組み合わせられてもよい。本開示の態様は、必要に応じて、上記の参考文献及び出願の組成物、機能及び概念を使用して、本開示のさらに別の実施形態を提供するために改変されてもよい。これら及びその他の変更が、詳細な説明に照らして、本開示に対して行われてもよい。

20

【0079】

前述の実施形態のいずれかの特定の要素も、他の実施形態の要素に対して組み合わせられても、または置換されてもよい。さらに、本開示の特定の実施形態に関連する利点が、これらの実施形態の文脈において記載されてきたが、他の実施形態もそのような利点を示すことがあり、本開示の範囲内にあるために、必ずしもすべての実施形態がそのような利点を示す必要はない。

30

【0080】

特定されたすべての特許及び他の刊行物は、例えば、本発明と関連して使用され得る、かかる刊行物に記述される手順を記述及び開示する目的で参照することにより、明示的に本明細書に組み込まれる。これらの刊行物は、本出願の出願日以前の、それらの開示のためにのみ提供される。この点に関して、先行発明もしくは先行刊行物、または他の任意の理由により、発明者らがそのような開示に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるべきではない。これらの文献の日付または内容に関する描写に関する記載の全ては、出願人に利用可能な情報に基づいているが、これらの文献の日付または内容の正確さについて認めるものではない。

40

【0081】

当業者は、本発明が、目的を実行し、言及される目的及び利点、ならびにそれに固有のものを得るのによく適合していることを容易に理解する。本明細書中の説明及び例の詳細は、特定の実施形態を代表するものであり、例示的なものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。その中の改変及びその他の使用を、当業者は思いつくであろう。これらの改変は、本発明の趣旨の範囲内に含まれる。本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく、本明細書中で開示されている本発明にさまざまな置換及び改変が行われてもよいことは当業者に容易にわかるであろう。

【0082】

冠詞「a」及び「an」は、本明細書及び特許請求の範囲において本明細書中で使用さ

50

れる場合、明らかに反対のことが示されない限り、複数の指示対象を含むことが理解されるべきである。群の1つ以上の要素の間に「または」を含む請求項または明細書は、その反対が示されるか、または別途文脈から明白でない限り、1つ、2つ以上、またはすべての群要素が、所与の製品または過程において存在するか、用いられるか、または別途関連している場合に、満たされると考えられる。本発明は、群の正確に1つの要素が、所与の製品または過程において存在するか、用いられるか、または別途関連している実施形態を含む。本発明はまた、2つ以上、またはすべての群要素が、所与の製品または過程において存在するか、用いられるか、または別途関連している実施形態も含む。さらに、別に指示がある場合を除いてまたは不一致もしくは矛盾が生じるであろうことが当業者には明白である場合を除いて、本発明が、1つ以上の挙げられた請求項の1つ以上の限定、要素、条項、記述用語などが同じ基本請求項（または、関連する場合、任意の他の請求項）に従属する別の請求項に組み込まれるすべての変形物、組み合わせ、及び置換物を提供することが理解されるべきである。本明細書に記載されているすべての実施形態は、適切な場合には、本発明のすべての異なる態様に適用可能であることが想定される。適切な場合はいつでも、任意の実施形態または態様を1つ以上の他のそのような実施形態または態様と自由に組み合わせることができることも想定される。要素が、一覧として、例えば、マーカッシュ群または同様の形式で提示される場合、要素の各サブグループも開示され、任意の要素（複数可）が群から削除され得ることが理解されるべきである。一般に、本発明または本発明の態様が、特定の要素、特徴等を含むように言及される場合、本発明の特定の実施形態または本発明の態様は、そのような要素、特徴等からなる、またはそれらから本質的になることを理解するべきである。簡略化するために、これらの実施形態は、本明細書において、いかなる場合でも、非常に多くの言葉で具体的に記載されている訳ではない。特定の除外が本明細書に列挙されているかどうかにかかわらず、本発明の任意の実施形態または態様が、特許請求の範囲から明示的に除外され得ることも理解されるべきである。例えば、任意の1つ以上の活性剤、添加剤、成分、任意の薬剤、生物の種類、障害、対象、またはそれらの組合せが除外され得る。

10

20

【0083】

請求項または明細書が物質の組成物に関する場合、別に指示がある場合を除いてまたは不一致もしくは矛盾が生じるであろうことが当業者には明白である場合を除いて、本明細書中で開示されている方法のいずれかに従って物質の組成物を生成または使用する方法、及び本明細書中で開示されている目的のいずれかのために物質の組成物を使用する方法が本発明の態様であることが理解されるべきである。請求項または明細書が方法に関する場合、例えば、別に指示がある場合を除いて、または矛盾もしくは不一致が生じることになると当業者に明らかでない限り、方法の実施に有用な組成物を作製する方法、及び方法に従って生成された製品が本発明の態様であると理解されるべきである。

30

【0084】

本明細書中で範囲が示される場合、本発明は、エンドポイントが含まれる実施形態、両エンドポイントが除外される実施形態、及び一方のエンドポイントが含まれ、他方が除外される実施形態を含む。別に指示がある場合を除いて、両エンドポイントが含まれていると想定されるべきである。さらに、別に指示がある場合を除いて、または別途文脈及び当業者の理解から明白でない限り、範囲として表される値は、文脈が別途明確に指示しない限り、範囲の下限の単位の10分の1まで、本発明の異なる実施形態の明記された範囲内の任意の特定の値または部分範囲をとることができることが理解されるべきである。一連の数値が本明細書中で明記される場合、本発明が、一連の値の中の任意の2つの値によって定義される任意の間にある値または範囲と類似して関連する実施形態を含むこと、最低値が最小とされてもよく、最大値が最大とされてもよいことも理解されるべきである。数値は、本明細書中で使用される場合、パーセンテージとして表される値を含む。数値の前に「約」または「およそ」が付いている本発明の任意の実施形態に関して、本発明は、厳密な値が列挙される実施形態を含む。数値の前に「約」または「およそ」が付いていない本発明の任意の実施形態に関して、本発明は、値の前に「約」または「およそ」が付いて

40

50

いる実施形態を含む。

【0085】

「およそ」または「約」は、別に明記されない、または別に文脈から明白でない限り（そのような数値が可能な値の100%を許容されないほど上回る場合を除いて）、一般に1%の範囲内、またはいくつかの実施形態では、数値の5%の範囲内、またはいくつかの実施形態では、いずれかの（数値より大きい、または小さい）方向に数値の10%の範囲内にある数を含む。明確に反対のことが示されていない限り、2つ以上の行為を含む本明細書中で特許請求されるいずれかの方法において、方法の行為の順序は、必ずしも方法の行為が列挙されている順序に限定されず、本発明は、順序がそのように限定されない実施形態を含むことが理解されるべきである。別に指示がある場合を除いて、または文脈から明らかでない限り、本明細書に記載される任意の製品または組成物が、「単離されている」と見なされる場合があることも理解されるべきである。

10

【実施例】

【0086】

実施例 1

ヒトDMD遺伝子のイントロン44またはイントロン55内の別々の領域を標的とする16の候補Staphylococcus aureus Cas9 (SaCas9) 適合gRNAペアが同定された。次に、コンビナトリアルアプローチを用いて、HEK293T細胞における切断効率をテストした。具体的には、SaCas9とgRNAで細胞をトランスフェクションし、トランスフェクション後5日目にトランスフェクションした細胞からDNAを抽出した。各gRNAペアについて、最遠位切断部位の上流と下流のプライマーを設計し、各gRNAが効率的に切断し、非相同末端接合 (NHEJ) が2つの接合部をライゲートした場合にのみPCRで増幅する、イントロン44と55の接合部をPCR増幅させるために使用した。増幅された産物はアガロースゲル上で実行され、期待されるサイズにスクリーニングされた。ガイドペア「B」及び「K」は、予想されるサイズ及びバンド強度に基づいて、最も効率的であると同定された (図10)。

20

【0087】

ダブル切断－置換方法を用いてエクソン45～55をゲノムレベルで置換できるかどうかを試験するために、エクソン45～55の正しいコーディング配列と、どちらかの端部上で隣接するイントロン配列の約200bpとをそれぞれ含む2つの鋳型を設計した。各鋳型はまた、逆方向のガイドペア（すなわち、エクソン45に近接するイントロン55 gRNAのリバース、及びエクソン55に近接するイントロン44 gRNAのリバース）の1つによって隣接された。例えば、AAV-gRNA-HITI-Dmd鋳型の青色領域とmdxゲノムの青色領域におけるgRNA1切断部位、及び鋳型とmdxゲノムの黄色領域におけるgRNA2の切断部位を示す図2を参照。

30

【0088】

NHEJによる鋳型が、ゲノム切断部位間に正確に挿入され得ることを確認するために、各ガイドペアを、対応するDNA鋳型と共に、HEK293T細胞に別々にトランスフェクトし、トランスフェクション後5日目にDNAを採取した。鋳型の正確な挿入を検出するために、鋳型上のゲノムイントロン44とエクソン45の間の接合、及び鋳型上のエクソン55とゲノムイントロン55の間の接合の存在についてのPCRを実施した。さらに、鋳型挿入のないイントロン－イントロン接合についても、この可能性が治療的であることから、アッセイした。

40

【0089】

鋳型上のエクソン55とイントロン55との間の接合部について増幅を続けると、両ガイドペアについて予想されるサイズのバンドが認められた (図11) だけでなく、イントロン－イントロン接合部についても両ガイドペアについて鋳型がない場合、予想されるサイズのバンドが認められた (図12)。ライゲーションイベントの頻度を定量し、インデルをスクリーニングするために、鋳型上のイントロン44とエクソン45の間の接合部でディープアンプリコンシーケンスを行った (図13)。興味深いことに、2つのガイドペ

50

ア（「B」37%、「K」83%）の間で－1または完全なライゲーシンの効率における差異が検出された。これは、マイクロホモロジー効果によるか、またはガイドペア「B」がより多くのオフターゲット部位を有するためだろう。

【0090】

これらの実験に続き、このシステムとその効果をさらに特徴づけるためのフォローアップ実験を実行した。補正後のRNA及びタンパク質産生を正確に定量するために、ジストロフィンの喪失をもたらすエクソン45から55の-span内の変異を含むヒトDMD筋芽細胞との以前のトランスフェクションを繰り返す。この実験により、DNAレベルの編集がジストロフィンのRNA及びタンパク質産生の救済につながるかどうかを検出することが可能である。次のステップは、ヒトの異種移植モデルを用いたインビボへの移行であり、ヒトの筋肉をマウスに移植し、上記のゲノム編集機構を搭載したAAVベクターをマウスに全身投与し、ヒトの筋肉に遺伝子導入することが可能である。

10

【0091】

配列

【0092】

gRNA及び鋳型配列

【0093】

HITI B gRNAの標的配列：CTAAGGAAGAACTTCACAA（配列番号6）及びTTGTGAAGTTCTTTCTTAG（配列番号7）（すなわち、gRNAペア「B」）

20

【0094】

HITI K gRNA：CTGCCTGTCTCCAGTCAAA（配列番号8）及びATTTTGTACATATTTTCAGG（配列番号9）（すなわち、gRNAペア「K」）

【0095】

HITI B 鋳型（配列番号10）：ACTCGGATGTTTAACTGACTTGCTTACATGTCAGTTTTCATAGGGAAATTTTTCACATGGAGCTTTTGTATTTCTTTCTTTTGCCAGTACAACCTGCATGTGGGTAGCACACTGTTTAAATCTTTTCTCAAATAAAAAGACATGGGGCTTTCATTTTGTTTTGCCTTTTGTGTATCTTACAGGAACCTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGGCAAACTGTGTGTCAGAAACATTGAAATGCAACTGGGGAAAGAAATAATTTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTATTCTACAGGAATAAATTTGGGGAAGCCTGAAATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAAACAGCTGTTCAGACAAGAAAAAGAGGCTAGAAAGAACAAAAGAAATATCTTGTTCAGAAATTTCAAAGAGATTTAATAATGAATTTGTTTTATGGTTTGGAGGAAGCAGATAACATTTGCTAGTATCCCCACTTGAACCTGGAAAGAGCAGCAACTAAAGAAAGCTTGAAGCAAGTCAAGTTACTGGTGGAAAGAGTTTGCCCCCTGCGCCAGGGAAATTCCTCAAAACAATTAAATGAAACTGGAGGACCCGTGCTTGTAAAGTGCTCCCATAAAGCCCAAGAAAGAGCAAGATAAACTTTGAAAAATAAGCTCAAGCAGACAAATCTCCAGTGGATAAAGGTTTCCAGAGCTTTACCTGAGAAACAAGGAGAAATTTGAAGCTCAAAATAAAGACCTTTGGGCAGCTTTGAAAAAAAGCTTTGAAGACCTTTGAAGAGCAGTTAAATCATCTGCTGCTGTGGTTATCTCCTATTAGGAATCAGTTTGGAAATTTATAACCAACCAACCAAGAAAGGACCATTTGACGTTAAGGAAACTGAAATAGCAGTTTCAAGCTAAACAACCGGATGTGGAAAGAGATTTTGTCTAAAGGGGAGCATTTGTACAAAGGAAAAAACAGCCACTCAGCCAGTGAAGAGGAAGTTAGAAAGATCTGAGCTCTGAGTGGAAAGGCGGTAAACCG

30

40

50

TTTACTTCAAGAGCTGAGGGGCAAAGCAGCCTGACCTAGCT
CCTGGACTGACCACTATTGGAGCCTCTCCTACTCAGACTG
TTACTCTGGTGACACAACCTGTGGTTACTAAGGAAACTGC
CATCTCCAAACTAGAAATGCCATCTTCCCTTGATGTTGGAG
GTACCTGCTCTGGCAGATTTCAACC CGGGCTTGGACAGAAC
TTACCGACTGGCTTTCTCTGCTTGATCAAGTTATAAAATC
ACAGAGGGGTGATGGTGGGTGACCTTGAGGATATCAACGAG
ATGATCATCAAGCAGAAGGGCAACAATGCAGGATTTGGAAC
AGAGGCGTCCCCAGTTGGAAGAACTCATTTACCGCTGCCCA
AAATTTGAAAAACAAGACCAGCAATCAAGAGGGCTAGAACCA
ATCATTACGGATCGAATTGAAAGAAATTCAGAAATCAGTGGG
ATGAAGTACAAGAACACCTTTCAGAACCGGAGGGCAACAGTT
GAATGAAATGTTAAAGGATTTCAACACAATGGCTGGAAAGCT
AAGGAAGAAAGCTGAGCAGGGTCTTAGGACAGGGCCAGAGCCA
AGCTTTGAGTCATGGAAGGAGGGGTCCCTATACAGTAGATGC
AATCCAAAAGAAAAATCACAGAAACCACAAGCAGTTGGCCAAA
GACCTCCGCCAGTGCGCAGACAAATGTAGATGTGGCAAAATG
ACTTGGCCCTGAAACTTCTCCGGGATTTATTCTGCAGATGA
TACCAGAAAAAGTCCACATGATAACAGAGAAATATCAATGCC
TCTTGGAGAAAGCATTCATAAAAAGGGTGAGTGAGCGAGAGG
CTGCTTTTGGAAAGAAACTCATAGATTTACTGCAACAGTTCCC
CCTGGACCTGGAAAAAGTTTCTTGCCTGGCTTACAGAAAGCT
GAAACAACCTGCCAATGTCCTACAGGATGCTACCCCGTAAGG
AAAGGCTCCTAGAAAGACTCCAAGGGAGTAAGAGAGCTGAT
GAAACAATGGCAAGTAAGTCAGGCATTTTC CGCTTTTAGCAC
TCTTGTGGATCCAATTGAACAATTTCTCAGCATTTGTACTT
GTAACCTGACAAGCCAGGGACAAAAACAATAAGTTGCTTTT
ATACAGCCTGATGTATTTTCGGGTATTTGGGACAAAGGAGGAGA
GAGCTAAGGAAGAAGAACTTCACAAAAAGAAAT

【0096】

HITI K 鑄型 (配列番号 11) : GAACCTCCAGGATGGCATTGGGC
AGCGGCAAACCTGTTGTTCAGAACATTTGAATGCAACCTGGGGA
AGAAATAATTTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTATTT
CTACAGGAAAAAATTTGGGAAGCCTGAATCTGCGGTGGCAGG
AGGTCTGCAAAACAGCTGTTCAGACAGAAAAAAGAGGGCTAGA
AGAACAAAAAGAAATATCTTGTTCAGAAATTTCAAAGAGATTTA
AATGAATTTTGTTTTATGGTTTGGAGGAAGCAGATAACATTTG
CTAGTATCCCACCTTGAACCTGGAAAAAGAGCAGCAACTAAA
AGAAAAAGCTTTGAGCAAGTCAAGTTTACTGGTGGAAAGAGTTG
CCCCCTGCGCCAGGGGAATTTCTCAAAACAATTAATAAGAACTG
GAGGACCCGTGCTTTGTAAGTGCTCCCATAGCCCAAGAGGA
GCAAGATAAACTTTGAAAAATAAGCTCAAGCAGACAAATCTC
CAGTGGATAAAGGTTTTCAGAGGCTTTTACCTGAGAAACAAG
GAGAAATTTGAAGCTCAAAATAAAAGACCTTGGGCAGCTTTGA
AAAAAAGCTTTGAAGACCTTTGAAGAGCAGTTAAATCATCTG
CTGCTGTGGTTATCTCCTATTAGGAATCAGTTTGGAAATTT
ATAACCAACCAAAACCAAGAAGGACCATTTGACGTTAAGGA
AACTGAAATAGCAGTTTCAAGCTAAACAACCGGATGTGGAA
GAGATTTTGTCTAAAGGGCAGCATTTGTACAAAGGAAAAAC
CAGCCACTCAGCCAGTGAAAGAGGAAGTTAGAAAGATCTGAG

CTCTGAGTGGAAGGCGGTAAACCGTTTACTTCAAGAGCTG
AGGGCAAAGCAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTA
TTGGAGCCTCTCCTACTCAGACTGTTACTCTGGTGACACA
ACCTGTGGTTACTAAGGA AACTGCCATCTCCA AACTAGAA
ATGCCATCTTCTCTTGATGTTGGAGGTACCTGCTCTGGCAG
ATTTCAACCGGGCTTGGACAGAACTTACCGACTGGCTTTTC
TCTGCTTGATCAAGTTATAA AATCACAGAGGGTGATGGTG
GGTGACCTTGAGGATATCAACGAGATGATCATCAAGCAGA
AGGCAACAATGCAGGATTTGGAAACAGAGGCGTCCCCAGTT
GGAAGAACTCATTTACCGCTGCCCAA AATTTGAAAAACAAG
ACCAGCAATCAAGAGGCTAGAAACAATCATTTACGGATCGAA
TTGAAAGAATTTCAGAAATCAGTG GGGATGAAGTACAAGAACAA
CCTTTCAGAAACCGGAGGCAACAGTTGAATGAAATGTTAAAG
GATTCAAACA AATGGCTGGAAAGCTAAGGAAGAAAGCTGAGC
AGGTCTTAGGACAGGCGCAGAGCCAAAGCTTTGAGTCAATGGAA
GGAGGGTCCCTATACAGTAGATGCAATCCAA AAGAA AATC
ACAGAAACCAAGCAGTTGGCCAAAGACCTCCGCCAGTGGC
AGACAAATGTAGATGTGGCAA AATGACTTTGGCCCTGAAACT
TCTCCGGGATTTATTTCTGCAGATGATACCAGAA AAGTCCAC
ATGATAACAGAGAATATCAATGCCTCTTTGGAGAAAGCATTC
ATAA AAGGGTGAGTGAGCGAGAGGCTGCTTTGGAAAGAAAC
TCATAGATTACTGCAACAGTTTCCCCCTGGACCTGGAA AAG
TTTCTTTGCCCTGGCTTTACAGAAAGCTGAAACA AACTGCCAATG
TCCTACAGGATGCTACCCGTAAGGA AAGGCTCCTAGAAAGA
CTCCAAGGGAGTAA AAGAGCTGATGAAACA AATGGCAAGTA
AGTCAGGCATTTTCCGCTTTAGCACTCTTTGTGGATCCAATT
GAACAATTCTCAGCATTTTGTA CTTTGTA AACTGACACCCAGC
CTGAAATATGTAGCA A AAT

10

20

30

40

50

【0097】

gRNAスクリーニング用PCR

【0098】

Screen__F : GAGGCCAA AACAATGCAGAG (配列番号12)

【0099】

Screen__R : GGAGAGAA AATCTTCTTTGACAAACAC (配列番号13)

【0100】

プライマーは、フォワードプライマーがイントロン44の全てのgRNA切断部位の上流にあり、リバースプライマーがイントロン55の全てのgRNA切断部位の下流にあるように、任意のガイドペアを有する介在配列の削除が同じプライマーで増幅されるように選択された。延長時間は、製造元の指示に従い、各gRNAペアの予想される削除のアンブリコンサイズに応じて変更した。

【0101】

削除及び正しい挿入の検証のためのPCRプライマー

【0102】

HITI B

【0103】

5' 挿入接合部

【0104】

F : TGGAAACACAGTTTAATTCACTTTGG (配列番号14)

【0105】

R : CCGCAGATTTCAGGCTTCC (配列番号 15)

[0106]

3' 挿入接合部

[0107]

F : CTGAAACAACCTGCCAATGTCC (配列番号 16)

[0108]

R : ACCACCTTAGTTATTCTCC (配列番号 17)

[0109]

削除

[0110]

F : TGGAAACACAGTTAATTCACTTGG (配列番号 18)

[0111]

R : ACCACCTTAGTTATTCTCC (配列番号 19)

[0112]

HITI K

[0113]

5' 挿入接合部

[0114]

F : GTAGCATAAATGGGGTTTCTGC (配列番号 20)

[0115]

R : CCGCAGATTTCAGGCTTCC (配列番号 21)

[0116]

3' 挿入接合部

[0117]

F : CTGAAACAACCTGCCAATGTCC (配列番号 22)

[0118]

R : GCTCAAGTTTTTCAGCCACAG (配列番号 23)

[0119]

削除

[0120]

F : GTAGCATAAATGGGGTTTCTGC (配列番号 24)

[0121]

R : CCGCAGATTTCAGGCTTCC (配列番号 25)

[0122]

HITI B 全配列 (配列番号 26) :

[0123]

c t a a c t a g t c t a g a c t a g c t a a t g t a c a a a a a a g c a g g c
t t t a a a g g a a c c a a t t c a g t c g a c t g g a t c c g g t a c c a a g
g t c g g g c a g g a a g a g g g c c t a t t t c c c a t g a t t c c t t c a t
a t t t g c a t a t a c g a t a c a a g g c t g t t a g a g a g a t a a t t a g
a a t t a a t t t g a c t g t a a a c a c a a a g a t a t t a g t a c a a a a t
a c g t g a c g t a g a a a g t a a t a a t t t c t t g g g t a g t t t g c a g
t t t t a a a a t t a t g t t t t a a a a t g g a c t a t c a t a t g c t t a c
c g t a a c t t g a a a g t a t t t c g a t t t c t t g g c t t t a t a t a t c
t t g t g g a a a g g a c g a a a c a c c g t a g g c a a g t c a g t t a a a c
a t g t t t a a g t a c t c t g t g c t g g a a a c a g c a c a g a a t c t a c
t t a a a c a a g g c a a a a t g c c g t g t t t a t c t c g t c a a c t t g t
t g g c g a g a t t t t t t t a t a a g c t t c c t g t a c a g a a t t c g t
c t g c a a g g g c g a a t t c t g c a g c g t c c c t g t a c a a a a a a g c
a g g c t t t a a a g g a a c c a a t t c a g t c g a c t g g a t c c g g t a c

10

20

30

40

50

c a a g g t c g g g c a g g a a g a g g g c c t a t t t c c c a t g a t t c c t
t c a t a t t t g c a t a t a c g a t a c a a g g c t g t t a g a g a g a t a a
t t a g a a t t a a t t t g a c t g t a a a c a c a a a g a t a t t a g t a c a
a a a t a c g t g a c g t a g a a a g t a a t a a t t t c t t g g g t a g t t t
g c a g t t t t a a a a t t a t g t t t t a a a a t g g a c t a t c a t a t g c
t t a c c g t a a c t t g a a a g t a t t t c g a t t t c t t g g c t t t a t a
t a t c t t g t g g a a a g g a c g a a a c a c c g t t g t g a a g t t c t t t
c c t t a g g t t t a a g t a c t c t g t g c t g g a a a c a g c a c a g a a t
c t a c t t a a a c a a g g c a a a a t g c c g t g t t t a t c t c g t c a a c
t t g t t g g c g a g a t t t t t t t t a t a a g c t t c c t g t a c a g a a t 10
t c g t c t g c a a g g g c g a a t t c t g c a g c g t c c c a c t c g g a t g
t t t a a c t g a c t t g c c t a c a t g t c a g t t t c a t a g g g a a a t t
t t c a c a t g g a g c t t t t g t a t t t c t t t c t t t g c c a g t a c a a
c t g c a t g t g g t a g c a c a c t g t t t a a t c t t t t c t c a a a t a a
a a a g a c a t g g g g c t t c a t t t t t g t t t t g c c t t t t t g g t a t
c t t a c a g g a a c t c c a g g a t g g c a t t g g g c a g c g g c a a a c t
g t t g t c a g a a c a t t g a a t g c a a c t g g g g a a g a a a t a a t t c
a g c a a t c c t c a a a a a c a g a t g c c a g t a t t c t a c a g g a a a a
a t t g g g a a g c c t g a a t c t g c g g t g g c a g g a g g t c t g c a a a 20
c a g c t g t c a g a c a g a a a a a a g a g g c t a g a a g a a c a a a a g a
a t a t c t t g t c a g a a t t t c a a a g a g a t t t a a a t g a a t t t g t
t t t a t g g t t g g a g g a a g c a g a t a a c a t t g c t a g t a t c c c a
c t t g a a c c t g g a a a a g a g c a g c a a c t a a a a g a a a a g c t t g
a g c a a g t c a a g t t a c t g g t g g a a g a g t t g c c c c t g c g c c a
g g g a a t t c t c a a a c a a t t a a a t g a a a c t g g a g g a c c c g t g
c t t g t a a g t g c t c c c a t a a g c c c a g a a g a g c a a g a t a a a c
t t g a a a a t a a g c t c a a g c a g a c a a a t c t c c a g t g g a t a a a
g g t t t c c a g a g c t t t a c c t g a g a a a c a a g g a g a a a t t g a a
g c t c a a a t a a a a g a c c t t g g g c a g c t t g a a a a a a a g c t t g 30
a a g a c c t t g a a g a g c a g t t a a a t c a t c t g c t g c t g t g g t t
a t c t c c t a t t a g g a a t c a g t t g g a a a t t t a t a a c c a a c c a
a a c c a a g a a g g a c c a t t t g a c g t t a a g g a a a c t g a a a t a g
c a g t t c a a g c t a a a c a a c c g g a t g t g g a a g a g a t t t t g t c
t a a a g g g c a g c a t t t g t a c a a g g a a a a a c c a g c c a c t c a g
c c a g t g a a g a g g a a g t t a g a a g a t c t g a g c t c t g a g t g g a
a g g c g g t a a a c c g t t t a c t t c a a g a g c t g a g g g c a a a g c a
g c c t g a c c t a g c t c c t g g a c t g a c c a c t a t t g g a g c c t c t
c c t a c t c a g a c t g t t a c t c t g g t g a c a c a a c c t g t g g t t a
c t a a g g a a a c t g c c a t c t c c a a a c t a g a a a t g c c a t c t t c 40
c t t g a t g t t g g a g g t a c c t g c t c t g g c a g a t t t c a a c c g g
g c t t g g a c a g a a c t t a c c g a c t g g c t t t c t c t g c t t g a t c
a a g t t a t a a a a t c a c a g a g g g t g a t g g t g g g t g a c c t t g a
g g a t a t c a a c g a g a t g a t c a t c a a g c a g a a g g c a a c a a t g
c a g g a t t t g g a a c a g a g g c g t c c c c a g t t g g a a g a a c t c a
t t a c c g c t g c c c a a a a t t t g a a a a a c a a g a c c a g c a a t c a
a g a g g c t a g a a c a a t c a t t a c g g a t c g a a t t g a a a g a a t t
c a g a a t c a g t g g g a t g a a g t a c a a g a a c a c c t t c a g a a c c
g g a g g c a a c a g t t g a a t g a a a t g t t a a a g g a t t c a a c a c a
a t g g c t g g a a g c t a a g g a a g a a g c t g a g c a g g t c t t a g g a 50
c a g g c c a g a g c c a a g c t t g a g t c a t g g a a g g a g g g t c c c t

a t a c a g t a g a t g c a a t c c a a a a g a a a a t c a c a g a a a c c a a
g c a g t t g g c c a a a g a c c t c c g c c a g t g g c a g a c a a a t g t a
g a t g t g g c a a a t g a c t t g g c c c t g a a a c t t c t c c g g g a t t
a t t c t g c a g a t g a t a c c a g a a a a g t c c a c a t g a t a a c a g a
g a a t a t c a a t g c c t c t t g g a g a a g c a t t c a t a a a a g g g t g
a g t g a g c g a g a g g c t g c t t t g g a a g a a a c t c a t a g a t t a c
t g c a a c a g t t c c c c c t g g a c c t g g a a a a g t t t c t t g c c t g
g c t t a c a g a a g c t g a a a c a a c t g c c a a t g t c c t a c a g g a t
g c t a c c c g t a a g g a a a g g c t c c t a g a a g a c t c c a a g g g a g
t a a a a g a g c t g a t g a a a c a a t g g c a a g t a a g t c a g g c a t t
t c c g c t t t a g c a c t c t t g t g g a t c c a a t t g a a c a a t t c t c
a g c a t t t g t a c t t g t a a c t g a c a a g c c a g g g a c a a a a c a a
a a t a g t t g c t t t t a t a c a g c c t g a t g t a t t t c g g t a t t t g
g a c a a g g a g g a g a g a g c t a a g g a a a g a a c t t c a c a a a a g a
a t a t a a g a a t g c g g c c g c t a a a c t a t

10

【0124】

H I T I K 全配列 (配列番号 27)

【0125】

c t a a c t a g t c t a g a c t a g c t a a t g t a c a a a a a a g c a g g c
t t t a a a g g a a c c a a t t c a g t c g a c t g g a t c c g g t a c c a a g
g t c g g g c a g g a a g a g g g c c t a t t t c c c a t g a t t c c t t c a t
a t t t g c a t a t a c g a t a c a a g g c t g t t a g a g a g a t a a t t a g
a a t t a a t t t g a c t g t a a a c a c a a a g a t a t t a g t a c a a a a t
a c g t g a c g t a g a a a g t a a t a a t t t c t t g g g t a g t t t g c a g
t t t t a a a a t t a t g t t t t a a a a t g g a c t a t c a t a t g c t t a c
c g t a a c t t g a a a g t a t t t c g a t t t c t t g g c t t t a t a t a t c
t t g t g g a a a g g a c g a a a c a c c g c t g c c t g t c t c c c a g t c a
a a g t t t a a g t a c t c t g t g c t g g a a a c a g c a c a g a a t c t a c
t t a a a c a a g g c a a a a t g c c g t g t t t a t c t c g t c a a c t t g t
t g g c g a g a t t t t t t t t a t a a g c t t c c t g t a c a g a a t t c g t
c t g c a a g g g c g a a t t c t g c a g c g t c c c t g t a c a a a a a a g c
a g g c t t t a a a g g a a c c a a t t c a g t c g a c t g g a t c c g g t a c
c a a g g t c g g g c a g g a a g a g g g c c t a t t t c c c a t g a t t c c t
t c a t a t t t g c a t a t a c g a t a c a a g g c t g t t a g a g a g a t a a
t t a g a a t t a a t t t g a c t g t a a a c a c a a a g a t a t t a g t a c a
a a a t a c g t g a c g t a g a a a g t a a t a a t t t c t t g g g t a g t t t
g c a g t t t t a a a a t t a t g t t t t a a a a t g g a c t a t c a t a t g c
t t a c c g t a a c t t g a a a g t a t t t c g a t t t c t t g g c t t t a t a
t a t c t t g t g g a a a g g a c g a a a c a c c g a t t t t g c t a c a t a t
t t c a g g g t t t a a g t a c t c t g t g c t g g a a a c a g c a c a g a a t
c t a c t t a a a c a a g g c a a a a t g c c g t g t t t a t c t c g t c a a c
t t g t t g g c g a g a t t t t t t t t a t a a g c t t c c t g t a c a g a a t
t c g t c t g c a a g g g c g a a t t c t g c a g c g t c c c t t t g a c t g g
g a g a c a g g c a g g g g a a t a g c a c a c t g t t t a a t c t t t t c t c
a a a t a a a a a g a c a t g g g g c t t c a t t t t t g t t t t g c c t t t t
t g g t a t c t t a c a g g a a c t c c a g g a t g g c a t t g g g c a g c g g
c a a a c t g t t g t c a g a a c a t t g a a t g c a a c t g g g g a a g a a a
t a a t t c a g c a a t c c t c a a a a a c a g a t g c c a g t a t t c t a c a
g g a a a a a t t g g g a a g c c t g a a t c t g c g g t g g c a g g a g g t c
t g c a a a c a g c t g t c a g a c a g a a a a a a g a g g c t a g a a g a a c

20

30

40

50

a a a a g a a t a t c t t g t c a g a a t t t c a a a g a g a t t t a a a t g a
a t t t g t t t t a t g g t t g g a g g a a g c a g a t a a c a t t g c t a g t
a t c c c a c t t g a a c c t g g a a a a g a g c a g c a a c t a a a a g a a a
a g c t t g a g c a a g t c a a g t t a c t g g t g g a a g a g t t g c c c c t
g c g c c a g g g a a t t c t c a a a c a a t t a a a t g a a a c t g g a g g a
c c c g t g c t t g t a a g t g c t c c c a t a a g c c c a g a a g a g c a a g
a t a a a c t t g a a a a t a a g c t c a a g c a g a c a a a t c t c c a g t g
g a t a a a g g t t t c c a g a g c t t t a c c t g a g a a a c a a g g a g a a
a t t g a a g c t c a a a t a a a a g a c c t t g g g c a g c t t g a a a a a a
a g c t t g a a g a c c t t g a a g a g c a g t t a a a t c a t c t g c t g c t 10
g t g g t t a t c t c c t a t t a g g a a t c a g t t g g a a a t t t a t a a c
c a a c c a a a c c a a g a a g g a c c a t t t g a c g t t a a g g a a a c t g
a a a t a g c a g t t c a a g c t a a a c a a c c g g a t g t g g a a g a g a t
t t t g t c t a a a g g g c a g c a t t t g t a c a a g g a a a a a c c a g c c
a c t c a g c c a g t g a a g a g g a a g t t a g a a g a t c t g a g c t c t g
a g t g g a a g g c g g t a a a c c g t t t a c t t c a a g a g c t g a g g g c
a a a g c a g c c t g a c c t a g c t c c t g g a c t g a c c a c t a t t g g a
g c c t c t c c t a c t c a g a c t g t t a c t c t g g t g a c a c a a c c t g
t g g t t a c t a a g g a a a c t g c c a t c t c c a a a c t a g a a a t g c c 20
a t c t t c c t t g a t g t t g g a g g t a c c t g c t c t g g c a g a t t t c
a a c c g g g c t t g g a c a g a a c t t a c c g a c t g g c t t t c t c t g c
t t g a t c a a g t t a t a a a a t c a c a g a g g g t g a t g g t g g g t g a
c c t t g a g g a t a t c a a c g a g a t g a t c a t c a a g c a g a a g g c a
a c a a t g c a g g a t t t g g a a c a g a g g c g t c c c c a g t t g g a a g
a a c t c a t t a c c g c t g c c c a a a a t t t g a a a a a c a a g a c c a g
c a a t c a a g a g g c t a g a a c a a t c a t t a c g g a t c g a a t t g a a
a g a a t t c a g a a t c a g t g g g a t g a a g t a c a a g a a c a c c t t c
a g a a c c g g a g g c a a c a g t t g a a t g a a a t g t t a a a g g a t t c
a a c a c a a t g g c t g g a a g c t a a g g a a g a a g c t g a g c a g g t c 30
t t a g g a c a g g c c a g a g c c a a g c t t g a g t c a t g g a a g g a g g
g t c c c t a t a c a g t a g a t g c a a t c c a a a a g a a a a t c a c a g a
a a c c a a g c a g t t g g c c a a a g a c c t c c g c c a g t g g c a g a c a
a a t g t a g a t g t g g c a a a t g a c t t g g c c c t g a a a c t t c t c c
g g g a t t a t t c t g c a g a t g a t a c c a g a a a a g t c c a c a t g a t
a a c a g a g a a t a t c a a t g c c t c t t g g a g a a g c a t t c a t a a a
a g g g t g a g t g a g c g a g a g g c t g c t t t g g a a g a a a c t c a t a
g a t t a c t g c a a c a g t t c c c c c t g g a c c t g g a a a a g t t t c t
t g c c t g g c t t a c a g a a g c t g a a a c a a c t g c c a a t g t c c t a
c a g g a t g c t a c c c g t a a g g a a a g g c t c c t a g a a g a c t c c a
a g g g a g t a a a a g a g c t g a t g a a a c a a t g g c a a g t a a g t c a 40
g g c a t t t c c g c t t t a g c a c t c t t g t g g a t c c a a t t g a a c a
a t t c t c a g c a t t t g t a c t t g t a a c t g a c a c c c a g c c t g a a
a t a t g t a g c a a a a t a t a a g a a t g c g g c c g c t a a a c t a t

【0126】

ヒト野生型DMDエクソン45-55（配列番号28）

【0127】

A C T C G G A T G T T T A A C T G A C T T G C C T A C A T G T C A G T T T C A
T A G G G A A A T T T T C A C A T G G A G C T T T T G T A T T T C T T T C T T T
G C C A G T A C A A C T G C A T G T G G T A G C A C A C T G T T T A A T C T T T
T C T C A A A T A A A A A G A C A T G G G G C T T C A T T T T T G T T T T G C C 50

TTTTGTGGTATCTTACAGGAACCTCCAGGATGGCATTGGGCA
 GCGGCAAACTGTTGTCAGAACATTTGAATGCAACTGGGGGAA
 GAAATAATTTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTATTTC
 TACAGGAAAAAATTGGGAAGCCTGAATCTGCGGTGGCAGGGA
 GGTCTGCAAAACAGCTGTCTCAGACAGAAAAAAGAGGGCTAGAA
 GAACAAAAAGAAATATCTTGTCTCAGAAATTTCAAAGAGATTTAA
 ATGAATTTTGTTTTATGGTTGGAGGAAGCAGATAACATTTGC
 TAGTATCCCACCTTGAACCTGGAAAAAGAGCAGCAACTAAAA
 GAAAAGCTTTGAGCAAGTCAAGTTACTGGTGGAAAGAGTTTGC
 CCTTGCGCCAGGGGAATTTCTCAAACAATTAATAATGAAACTGG
 AGGACCCGCTGCTTTGTAAAGTGCTCCCATAAGCCCAGAAAGAG
 CAAGATAAACTTTGAAAAATAAGCTCAAGCAGACAAAATCTCC
 AGTGGATAAAGGTTTTCCAGAGCTTTTACCTGAGAAACAAGG
 AGAAAATTGAAGCTCAAATAAAAGACCTTTGGGCGAGCTTTGAA
 AAAAAAGCTTTGAAGACCTTTGAAGAGCAGTTTAAATCATCTGC
 TGCTGTGGTTATCTCCTATTAGGAATCAGTTTGGAAATTTTA
 TAACCAACCAAAACCAAGAAGGACCATTTTGACGTTTAAGGAA
 ACTGAAATAGCAGTTTCAAGCTAAACAACCCGGATGTGGAAAG
 AGATTTTGTCTAAAGGGCGAGCATTTTGTACAAGGAAAAAACCC
 AGCCACTCAGCCAGTGAAGAGGGAAGTTAGAAAGATCTGAGC
 TCTGAGTGGAAAGGCGGTAAACCCTTTACTTCAAGAGCTGA
 GGGCAAAAGCAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTAT
 TGGAGCCTCTCCTACTCAGACTGTTACTCTGGTGGACACAA
 CCTGTGGTTACTAAAGGAAAACTGCCATCTCCAAACTAGAAAA
 TGCCATCTTCTCTTGATGTTTGGAGGTACCTGCTCTGGCAGA
 TTTCAACCCTGGGCTTTGGACAGAACTTACCCTGAGCTTTCT
 CTGCTTTGATCAAGTTATATAAAATCACAGAGGGTGATGGTGG
 GTGACCTTTGAGGATATCAACGAGATGATCATCAAGCAGAA
 GGCAACAATGCAGGATTTTGGAAACAGAGGGCGTCCCCAGTTTG
 GAAGAAGCTCATTAACCGCTGCCCAAAAATTTGAAAAACAAGA
 CCAGCAATCAAGAGGGCTAGAAACAATCATTAACGGATCGAAT
 TGAAAGAATTTCAGAAATCAGTGGGATGAAGTACAAGAACAC
 CTTCAGAAACCGGAGGCAACAGTTGAATGAATAATGTTAAAGG
 ATTCAAACACAATGGCTGGAAAGCTAAGGAAGAAAGCTGAGCA
 GGTCTTAGGACAGGGCCAGAGCCAAAGCTTTGAGTCAATGGAAAG
 GAGGGTCCCTATACAGTAGATGCAATCCA AAAAGAAAAATCA
 CAGAAACCAAGCAGTTGGCCAAAGACCTCCGCCAGTGGCA
 GACAAAATGTAGATGTGGCAAAATGACTTTGGCCCTGAAAACTT
 CTC CGGGATTATTCTG CAGATGATACCAGAAAAAGTCCACA
 TGATAACAGAGAATATCAATGCCTCTTTGGAGAAAGCATTTCA
 TAAAAAGGGTGAGTGAGCGAGAGGGCTGCTTTTGGAAAGAACT
 CATAGATTACTGCAACAGTTTCCCCCTGGACCTGGAAAAAGT
 TTCTTTGCCCTGGCTTTACAGAAAGCTGAAAAACAACCTGCCAATGT
 CCTACAGGATGCTACCCGTAAGGAAAGGCTCCTAGAAAGAC
 TCCAAGGGAGTAAAAAGAGCTGATGAACAACATGGGCAA

10

20

30

40

【0128】

その他のgRNA標的配列

【表 1】

表 1

gRNA 標的ペア A	CTAAGGAAAGAACTTCACAA (配列番号 6)
	TATGCAGCCATAAAAAAAGG (配列番号 29)
gRNA 標的ペア C	CTAAGGAAAGAACTTCACAA (配列番号 6)
	CTGCCTGTCTCCCAGTCAAA (配列番号 8)
gRNA 標的ペア D	CTAAGGAAAGAACTTCACAA (配列番号 6)
	TTCCTTTTAGGGCAACCTAT (配列番号 30)
gRNA 標的ペア E	TTAGCTCATATATTGACAGG (配列番号 31)
	TATGCAGCCATAAAAAAAGG (配列番号 29)
gRNA 標的ペア F	TTAGCTCATATATTGACAGG (配列番号 31)
	TAGGCAAGTCAGTTAAACAT (配列番号 32)
gRNA 標的ペア G	TTAGCTCATATATTGACAGG (配列番号 31)
	CTGCCTGTCTCCCAGTCAAA (配列番号 8)
gRNA 標的ペア H	TTAGCTCATATATTGACAGG (配列番号 31)
	TTCCTTTTAGGGCAACCTAT (配列番号 30)
gRNA 標的ペア I	ATTTTGCTACATATTTTCAGG (配列番号 9)
	TATGCAGCCATAAAAAAAGG (配列番号 29)
gRNA 標的ペア J	ATTTTGCTACATATTTTCAGG (配列番号 9)
	TAGGCAAGTCAGTTAAACAT (配列番号 32)
gRNA 標的ペア L	ATTTTGCTACATATTTTCAGG (配列番号 9)
	TTCCTTTTAGGGCAACCTAT (配列番号 30)
gRNA 標的ペア M	TCTGAAACAGATGCGTTTGG (配列番号 33)
	TATGCAGCCATAAAAAAAGG (配列番号 29)
gRNA 標的ペア N	TCTGAAACAGATGCGTTTGG (配列番号 33)
	TAGGCAAGTCAGTTAAACAT (配列番号 32)
gRNA 標的ペア O	TCTGAAACAGATGCGTTTGG (配列番号 33)
	CTGCCTGTCTCCCAGTCAAA (配列番号 8)
gRNA 標的ペア P	TCTGAAACAGATGCGTTTGG (配列番号 33)
	TTCCTTTTAGGGCAACCTAT (配列番号 30)

10

20

30

40

【0129】

実施例 2 - インビボでの Dmd 遺伝子修飾に関連する革新的な遺伝子置換システムの開発。

【0130】

出願人らは、Dmd 遺伝子の病原性変異を野生型、非病原性配列で特異的に置換することを可能にするために、CRISPR/Cas9 刺激相同性指向性修復 (HDR) に基づく正確なゲノム修正方法を開発中である。したがって、出願人らは、SaCas9、NmCas9、KKH SaCas9、または SaucCas9 によって変異部位の 5 bp 以内に標的化可能な 3 つの Dmd 変異、mdx、mdx^{4cv}、及び mdx^{5cv} を同

50

定した。

【0131】

適合するCas9エンドヌクレアーゼ活性を適切な場所に向ける能力について、これらの候補切断部位を標的とするgRNAをスクリーニングするために、mdx尾端線維芽細胞(TTF)を、Cas9オルソログ及びmdx遺伝子座を標的とするgRNAでヌクレオフェクションした(表2)。ヌクレオフェクション後3日目にゲノムDNAを採取し、PCRを行ってmdx、Pcsk9、及びRunx1遺伝子座(Pcsk9及びRunx1は以前に検証済みのgRNAを用いて標的とし、それぞれKKH SaCas9及びSauriCas9の切断活性と特異性の両方に関して、対照として機能する)を増幅させることを実行した。

10

【0132】

【表2】

表2

条件	Cas9 オルソログスクレオフェクション	gRNA スクレオフェクション	gRNA プロトスペーサー配列	
1	KKH SaCas9	KKH SaCas9 Runx1 gRNA	GTGTCAGAAGTGTAAAGCCCAG	配列ID番号: 34
2	SauriCas9	SauriCas9 Pcsk9 gRNA	CCACCGCAGCCACG CAGAGCA	配列ID番号: 35
3	KKH SaCas9	KKH SaCas9 mdx gRNA	CAAAGTTCCTT GAAAGAGCAA	配列ID番号: 36
4	SauriCas9	SauriCas9 mdx gRNA	GTTCTTGAAAGAGCAATAAA	配列ID番号: 37

20

【0133】

ICE解析により、KKH SaCas9及びSauriCas9の両方が、対照Pcsk9及びRunx1遺伝子座のそれぞれで活性だったことが確認された(図17A)。Dmd遺伝子のエクソン23のディープアンプリコンシーケンスにより、細胞を対照SauriCas9+SauriCas9 Pcsk9 gRNA細胞でトランスフェクトするとmdx遺伝子座にインデルが検出されなかったが、SauriCas9+SauriCas9 mdx gRNA細胞では、対立遺伝子の~12%がmdx部位にインデルを含んでいたことがさらに判明した(図17B)。一方、KKH SaCas9+KKH SaCas9 mdx gRNAについては、mdx遺伝子座に活性が検出されなかった(図17B)。

30

【0134】

その後の努力は、SauriCas9 mdx gRNAに集中した。驚いたことに、このgRNAは、SauriCas9の切断をmdx変異から0bp離れたところに誘導し、最適なHDR効率のための非常に魅力的な候補gRNAとするものである。

【0135】

実施例3—筋肉及びサテライト細胞に対する送達機構の探索

【0136】

骨格筋内の特定の細胞型の標的化がHDR率を有する影響を照明するために、サテライト細胞とも呼ばれる筋幹細胞にCas9発現を制限するシステムを設計した。これを達成するために、Pax7-CreERT²遺伝子導入マウス系統を、Rosa26-LSL-SpCas9-P2A-EGFP遺伝子導入マウス系統と交配させた。Pax7を発現する細胞でタモキシフェンによりCreERT²が誘導されると、SpCas9とEGFPがバイシストロ的に発現される。Pax7の発現は生後間もないマウスの筋肉内のサテライト細胞に限られるため、このシステムではSpCas9とEGFPの発現をサテライト細胞のみに限定する。一旦サテライト細胞がSpCas9を発現したら、サテライト細胞に限定したカラスイッチングシステム可能にし、EGFP遺伝子座を標的とするSpCas9 gRNAをBFPドナー鑄型とともにAAVを介して送達することが可能である。このシステムは、SpCas9及びEGFP発現が筋線維のみに制限される類似のシステムと結合される場合、サテライト細胞における編集が筋線維において検出可能なレ

40

50

ベルのHDRをもたらしのに十分であるかどうかを決定することが可能である。

【0137】

タモキシフェン誘導を最適化するために、注射のどのような投与量及び時間経過が、筋線維での発現をもたらしことなくサテライト細胞でのSpCas9及びGFPの発現を最大化するかを調べた。マウスにP16で75mg/kgのタモキシフェンを4日間毎日注射し、P19でその最後の1回とし、その後P21でサテライト細胞分離のために筋肉を採取した(図18A)。FACS解析は、P16-P19から毎日タモキシフェンを注射するこの方法により、P21で解析したサテライト細胞の25%~30%において検出可能なGFP蛍光を生じたことを示した(図18B)。これらの結果を確認するために、これらの蛍光プロファイルに基づいてタモキシフェン注射マウスから分離されたサテライト細胞の2つのサブセット、EGFP-またはEGFP+(図18C)のいずれかを培養した。共焦点顕微鏡を介したEGFPシグナル強度の検出により、サテライト細胞の2つのサブセットが別々の集団であることを確認した(図18D)。タモキシフェン注射のこの方法は、サテライト細胞において検出可能な遺伝子導入発現を誘導するのに十分であることを知って、発現がサテライト細胞のみに限定されるか否か、またはEGFP(したがってSpCas9も)が、P16~19で注射しP21で採取したマウスの筋繊維において追加的に検出され得るかどうかを次に求めた。そこで、出願人らは、注射したマウスの前脛骨筋(TA)を凍結採取し、Pax7を染色し、及び画像化した。重要なことに、ビヒクルまたはタモキシフェンを注射したマウスの筋繊維においていずれも、GFP+筋繊維が検出されなかった(図19)。さらに、凍結切片で検出されたすべてのGFP+細胞は、Pax7及びDAPI対比染色と共局在し、サテライト細胞であることが確認された(図19)。これらのデータは、EGFP及びSpCas9の発現を生後骨格筋のサテライト細胞区画に制限するためのこの遺伝子導入システムを検証する。

10

20

【0138】

有意なタモキシフェン誘導がP16-P19に注射した後のマウスで観察されたことを受けて、出願人らは、組換え効率が注入後のより遅い時点で増加する可能性があるか、またはタモキシフェン誘導後の時間の増加とともにEGFPが筋繊維内にも検出される可能性があるかを決定することに興味を持った(図20A)。そこで、マウスの第2のグループ(P16-P19で注射)は、P42で採取された。FACS解析は、P16-19からの毎日のタモキシフェン注射が、P42においてサテライト細胞の50%~65%において検出可能なSpCas9-EGFPをもたらししたことを実証した(図20B)。組織学的な解析が行われている。

30

【0139】

mdx遺伝子座を切断することができるgRNAを同定したことを受けて、インビトロでこの変異を正確に修正するためのCRISPR-AAV-HDRシステムの能力をテストするために、HDR鑄型の設計及びクローニングを進めている。これまでの研究で、通常はドナー鑄型の長さが長いほど、インビトロでのHDR効率が高くなることが分かっているが、知られている限りでは、インビボでの応用については、HDR鑄型の長さを変えることの効果は調べられていなかった。そこで、5種類の相同性アーム長を持つ鑄型を設計し、AAVにパッケージしたmdx標的SauriCas9/gRNA複合体とともにこれらの鑄型の筋肉内注射を行う予定である。現在、これらの鑄型をAAV互換のプラスミドバックボーンにクローニングしているところである。その間に、SauriCas9による編集後のジストロフィンの発現回復を検出するために、ジストロフィン染色の最適化に着手している。

40

【0140】

Cas9活性が筋繊維における効率的なHDRに必要なかどうかを理解するために、出願人らは、サテライト細胞における発現を除外しながら筋核に遺伝子編集を制限することに関心を持っている。この目的のために、出願人らは、ヒト骨格アクチン(HSA)-MerCreMerマウスをRosa26-LSL-SpCas9-P2A-EGFPマウスに交配し、筋前駆細胞から排除しながら筋核においてのみCreの誘導を可能にす

50

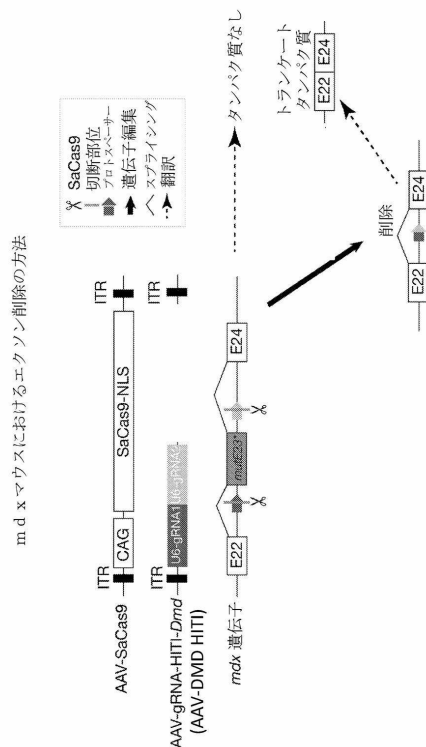
ることを計画している。これらのマウスは効率的な繁殖ができないが、出願人らは小さなコホート動物を入手し、タモキシフェンの注射を開始した。出願人らは、サテライト細胞がCas9-EGFPを発現しないことを確認するためにサテライト細胞のFACS解析を行うことを計画しており、また、EGFPを検出するために筋繊維の凍結採取及び画像化のために筋肉を収集する予定である。

【0141】

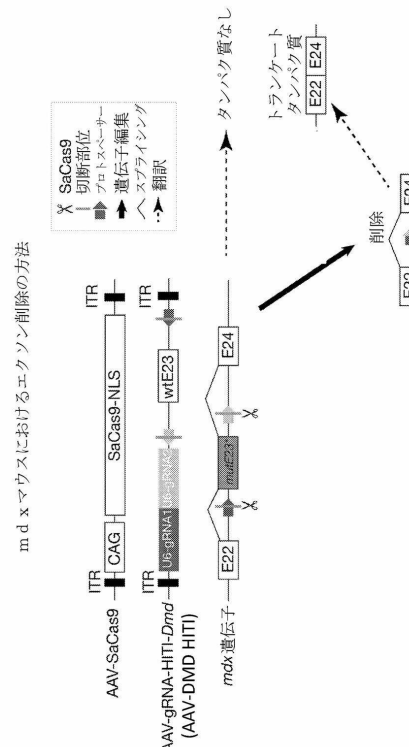
さらに、出願人らは、 $Pax7-CreERT^2+/-$ 、 $Rosa26-LSL-SpCas9-P2A-EGFP+/-$ マウス系におけるタモキシフェン注射をさらに最適化している段階である。タモキシフェンの投与量を(75mg/kg から 100mg/kg に)増やし、注射の回数を(4回から5回に)増やすことにより、出願人らは、組換え効率をさらに高め、これらのマウスのサテライト細胞における遺伝子編集イベントの機会を最大化しようと計画している。タモキシフェン誘導後のEGFP標的gRNA及びBFPドナー鑄型の最終的な送達を準備するために、出願人らは、我々のHDRシステムのこれらの構成要素のそれぞれをコード化するAAVの高タイターバッチをパッケージ化して製造している段階である。

【図面】

【図1】



【図2】



10

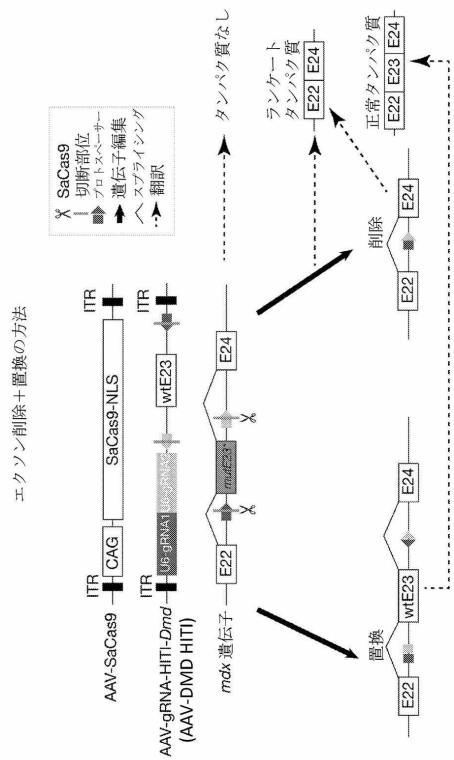
20

30

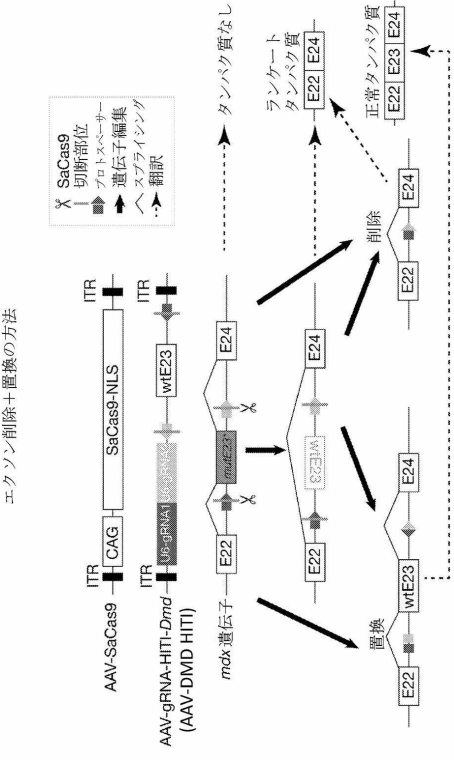
40

50

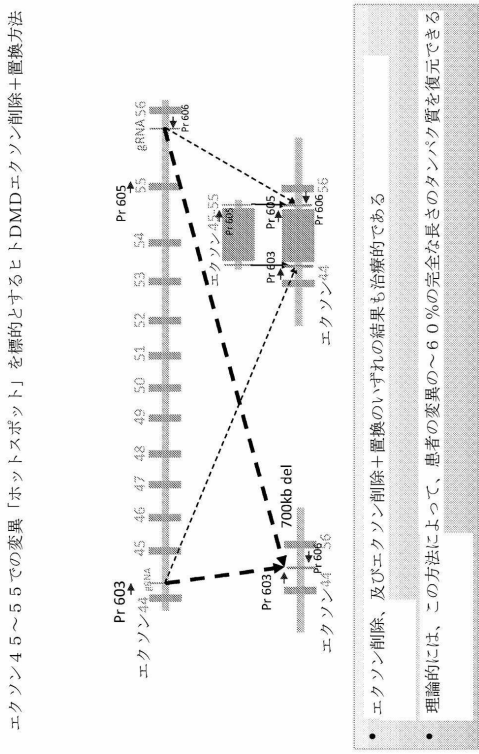
【図 3】



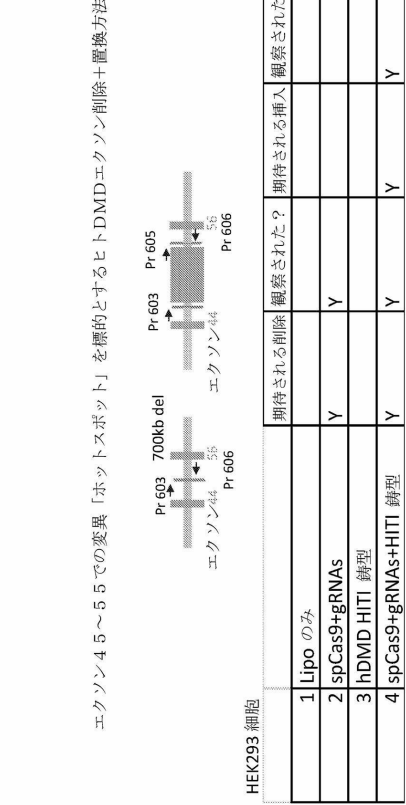
【図 4】



【図 5】



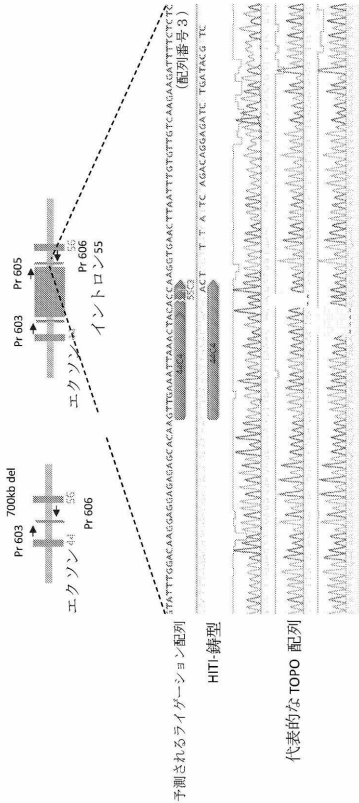
【図 6】



HEK293 細胞	期待される削除				期待される挿入			
	観察された？				観察された？			
	1 Lipo のみ							
	2 spCas9+gRNAs	Y			Y			
	3 hDMD HITI 鋳型							
4 spCas9+gRNAs+HITI 鋳型	Y				Y			Y

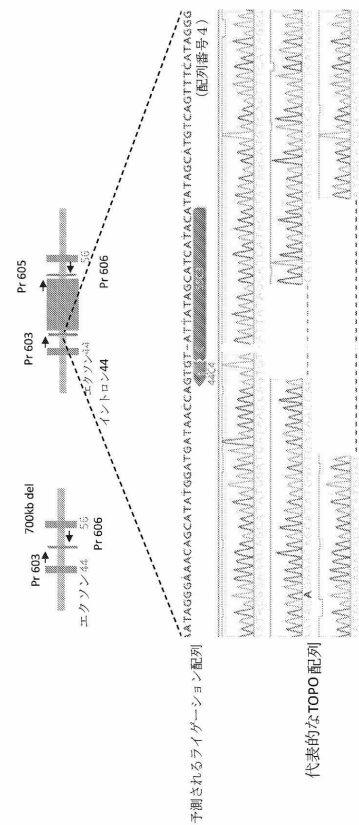
【図 7】

エクソン4 5～5 5での変異「ホットスポット」を標的とするヒトDMDエクソン削除+置換方法



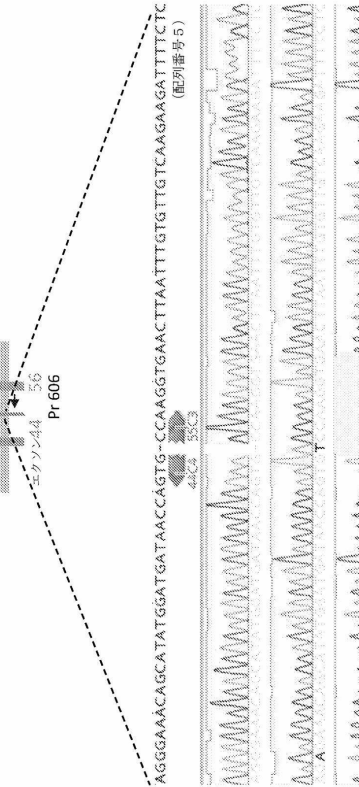
【図 8】

エクソン4 5～5 5での変異「ホットスポット」を標的とするヒトDMDエクソン削除+置換方法

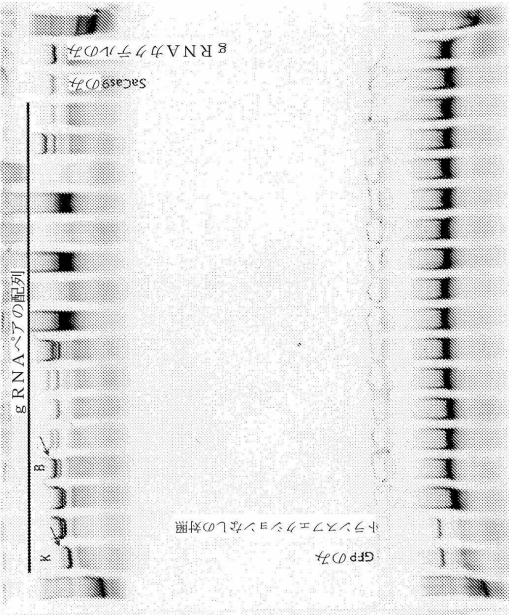


【図 9】

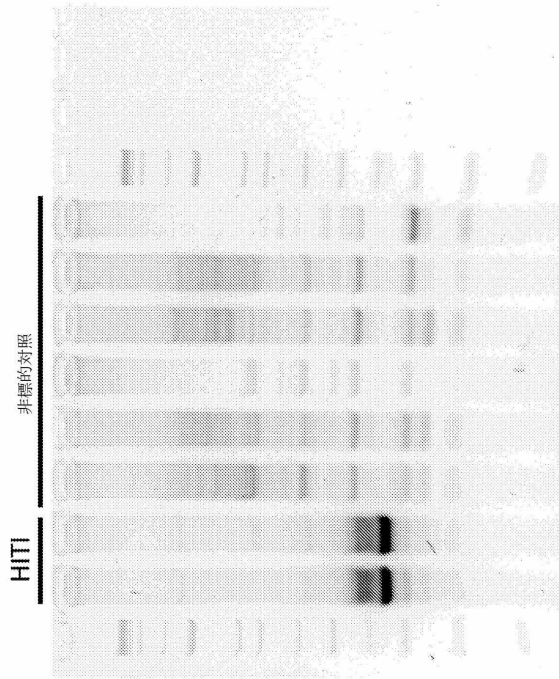
エクソン4 5～5 5での変異「ホットスポット」を標的とするヒトDMDエクソン削除+置換方法



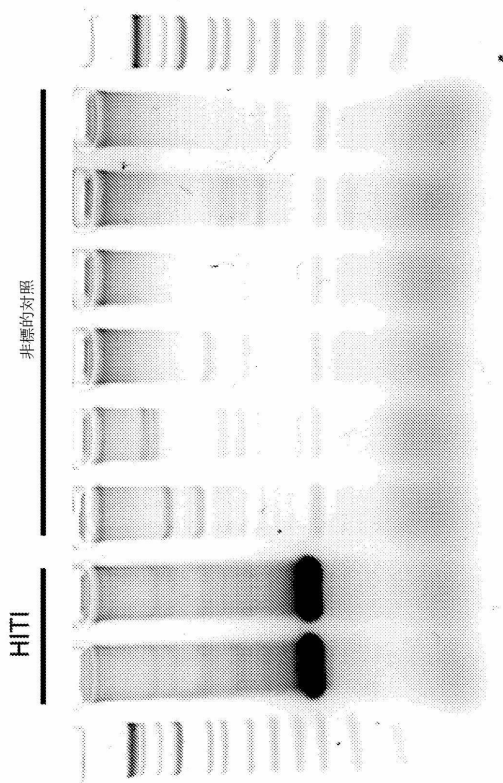
【図 10】



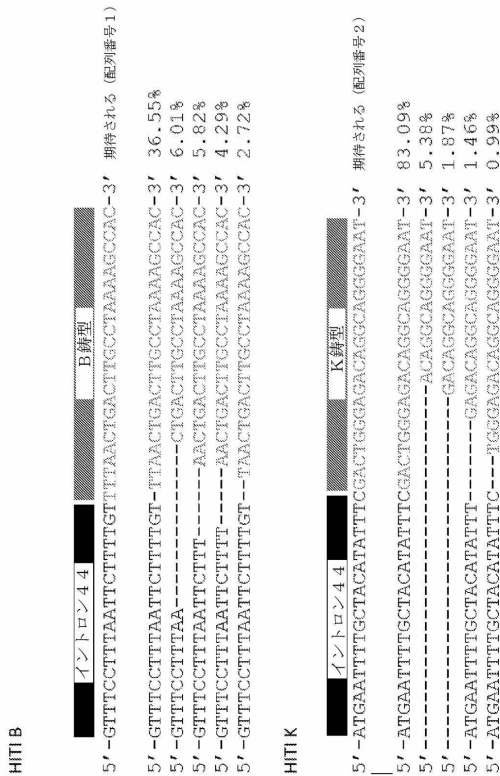
【図 1 1】



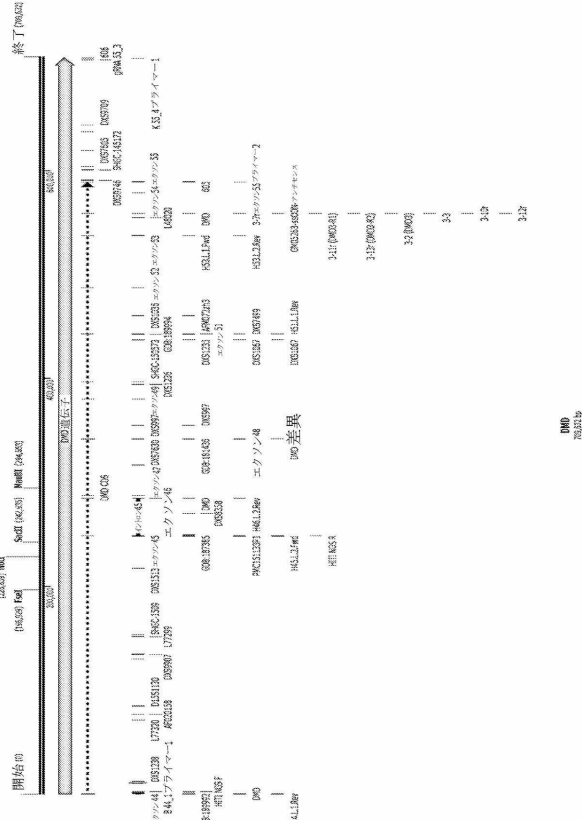
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

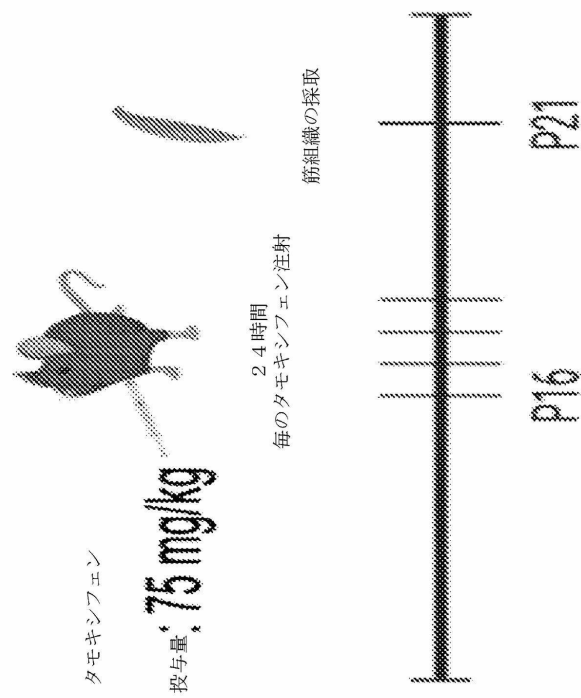
20

30

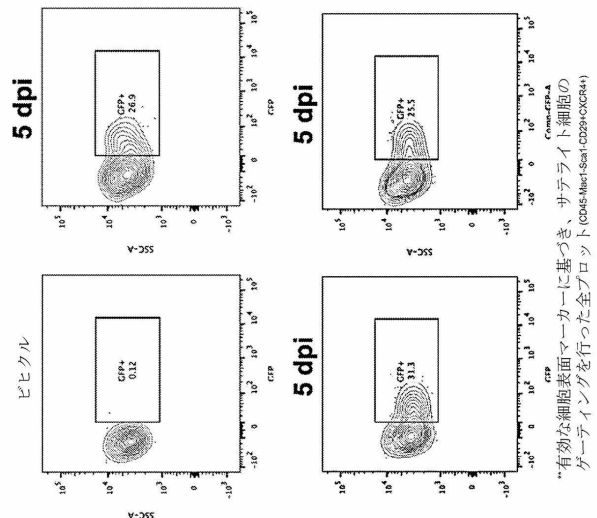
40

50

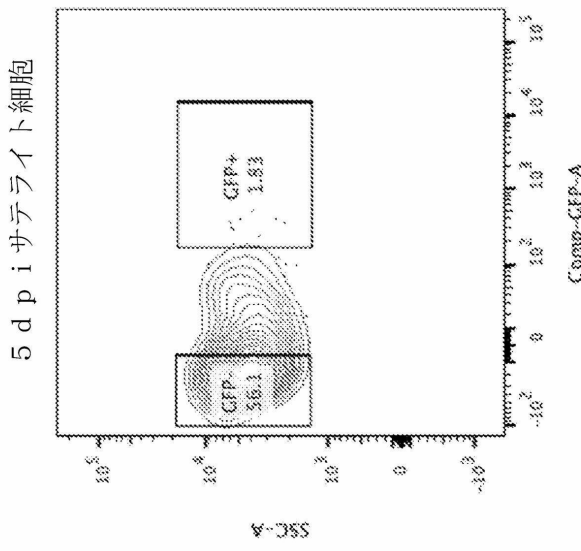
【図 18 A】



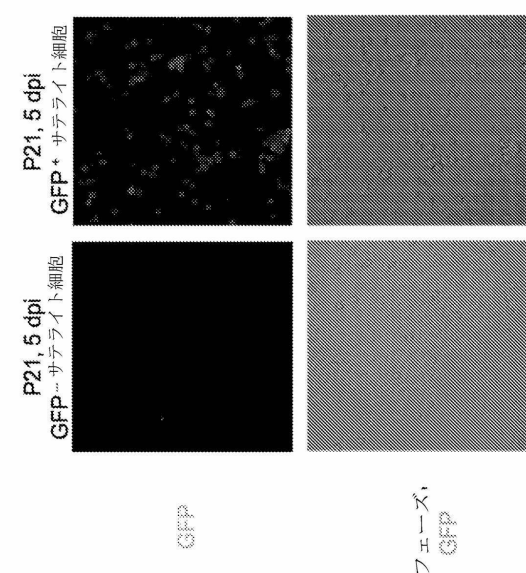
【図 18 B】



【図 18 C】



【図 18 D】



10

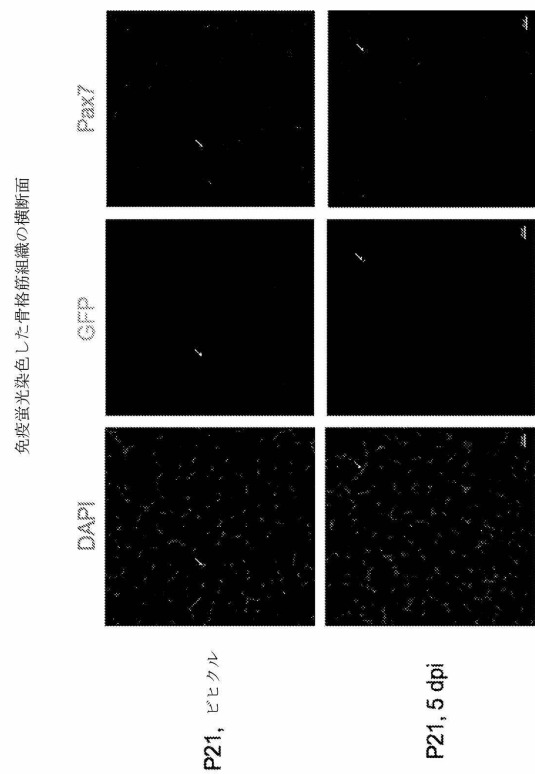
20

30

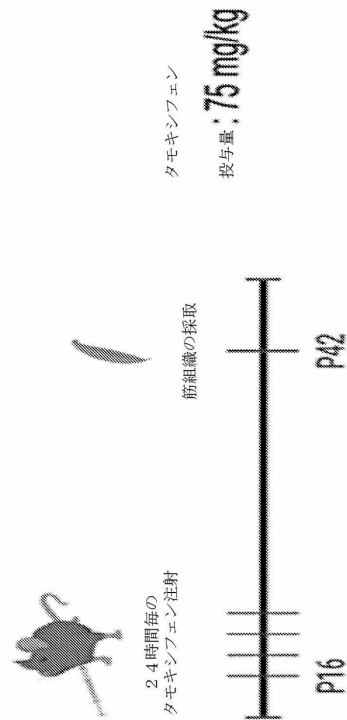
40

50

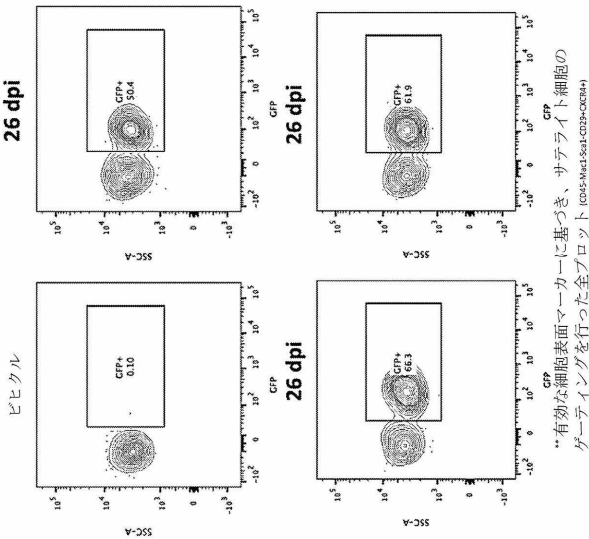
【図 19】



【図 20 A】



【図 20 B】



【配列表】

2023507174000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2020/065437
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 48/00; C12N 9/22; C12N 15/11; C12N 15/86; C12N 15/90 (2021.01) CPC - A61K 48/005; A61K 48/0058; C12N 9/22; C12N 15/11; C12N 15/86; C12N 15/907; C12N 2310/20; C12N 2750/14143 (2021.02)		
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 data base consulted during the international search (name of data base 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 2016/0201089 A1 (DUKE UNIVERSITY) 14 July 2016 (14.07.2016) entire document	1, 2, 21, 22, 52, 53
X	US 2017/0266320 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 21 September 2017 (21.09.2017) entire document	37, 38
A	US 2015/0196670 A1 (ASSOCIATION FRANÇAISE CONTRE LES MYOPATHIES) 16 July 2015 (16.07.2015) entire document	1, 2, 21, 22, 37, 38, 52, 53
A	MIN et al. "CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells," Science Advances, 06 March 2019 (06.03.2019), Vol. 5, No. 3, Pgs. 1-12. entire document	1, 2, 21, 22, 37, 38, 52, 53
A	US 2016/0058889 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 03 March 2016 (03.03.2016) entire document	1, 2, 21, 22, 37, 38, 52, 53
☐ 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 15 February 2021		Date of mailing of the international search report MAR 12 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/065437

Box No. 1 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:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/065437

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.: 3-20, 23-36, 39-51
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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.:

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.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/02
A 6 1 K	38/02	(2006.01)	A 6 1 K	38/02
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47

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

F ターム (参考)

BA02 CA44

4C084 AA02 AA13 NA14 ZA94
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA94
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 CA20 NA14 ZA94
4H045 AA50 BA10 CA40 EA28