

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年8月8日(08.08.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/162452 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/7088 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01) C12N 15/861 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/003376

(22) 国際出願日: 2024年2月1日(01.02.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-014899 2023年2月2日(02.02.2023) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人国立がん研究センター (NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 Tokyo (JP). 学校法人順天堂 (JUNTENDO EDUCATIONAL FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1138421 東京都文京区本郷2-1-1 Tokyo (JP). 公益財団法人微生物化学研究会 (MICROBIAL CHEMISTRY RESEARCH FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1410021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 清野 透 (KIYONO, Tohru); 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター内 Tokyo (JP). 中原 知美 (NAKAHARA, Tomomi); 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター内 Tokyo (JP). 齋藤 泉 (SAITO, Izumu); 〒1138421 東京都文京

区本郷2丁目1番1号 学校法人順天堂大学内 Tokyo (JP). 田中 友子 (TANAKA, Tomoko); 〒1138421 東京都文京区本郷2丁目1番1号 学校法人順天堂大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 伊東 忠重, 外 (ITO, Tadashige et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号 丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 16階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, 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.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, 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, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING HPV TESTED-POSITIVE CANCER OR HPV PRETESTED-POSITIVE CANCER PATHOLOGICAL CHANGE GENE, AND RECOMBINANT ADENOVIRUS VECTOR

(54) 発明の名称: H P V 陽性がん又は H P V 陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物、及び組換えアデノウイルスベクター

(57) Abstract: This pharmaceutical composition is for treating human papilloma virus (HPV) tested-positive cancer or an HPV pretested-positive cancer pathological change gene, and includes: Cas guide RNA or a nucleic acid molecule encoding the same; and a Cas9 nickase or a nucleic acid molecule encoding the same. The Cas guide RNA or the nucleic acid molecule encoding the same includes a pair of specific Cas guide RNA or a pair of nucleic acid molecules encoding the same, or a combination of such pairs.

(57) 要約: C a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、C a s 9 ニッカーゼ又はそれをコードする核酸分子とを含み、前記C a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子が、特定のC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペア又はペアの組合せを含むヒトパピローマウイルス (H P V) 陽性がん又はH P V陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物である。

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称：

ＨＰＶ陽性がん又はＨＰＶ陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物、及び組換えアデノウイルスベクター

技術分野

[0001] 本発明は、ＨＰＶ陽性がん又はＨＰＶ陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物、及び組換えアデノウイルスベクターに関する。

背景技術

[0002] 世界の全がんの新規罹患患者数の約４．５％は、高リスク型ヒトパピローマウイルス（ＨＲ－ＨＰＶ）感染が原因である。子宮頸がんは、年間約５０万人が罹患し２７万人が死亡している。また、中咽頭がんは、年間約１０万人（約４０％はＨＰＶ陽性）が罹患し、５万人が死亡している。

[0003] 子宮頸がんやその前駆病変である子宮頸部異形成の発症年齢は若年化しており、妊孕性が温存できる治療法が求められている。また、中咽頭がんは、嚥下・摂食・構音障害などにより手術後のＱＯＬの維持が極めて困難であるため、非侵襲的な治療法の開発が求められている。

[0004] 原核生物の有するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムの１つであるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムは、遺伝子配列を効率よく書き換えるゲノム編集技術として、がんや遺伝病の治療などへの臨床応用が期待されている。基本的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９システムは、ＤＮＡ二本鎖を切断するＣａｓ９タンパク質と、標的ゲノム上の位置特異性を決定するＣＲＩＳＰＲ RNA（*crRNA*）及びこれと一部相補性を有し、Ｃａｓ９タンパク質への結合の足場となる活性化RNA（*trans-activating crRNA*：*tracrRNA*）からなるガイドRNA（*gRNA*）とから構成される。*crRNA*と*tracrRNA*からなるガイドRNAは、これらを融合した単一ガイドRNA（*single guide RNA*／*sgRNA*）として供給することも可能である。そして、当該ガイドRNAは、これをコード

するDNAを含む適当なベクターを用いて、標的細胞内で発現することができる。

[0005] CRISPR/Cas9システムは部位特異的なゲノム切断をもたらすものの、その精度は完全ではなく、本来意図したゲノム領域以外の位置でゲノムを切断（オフターゲット切断）することがあり、当該切断によるオフターゲット変異が生じる。ヒトのゲノムは3000M塩基程度の巨大なサイズを有するため、CRISPR/Cas9システムをそのままヒトのゲノム編集治療に適用すると、標的以外の部位を数百カ所で切断する可能性があるため、治療方法として実用化することができない。

[0006] これまで、Cas9タンパク質のオフターゲット変異を抑制するために様々な開発が行われてきた。例えば、DNAの一方の鎖のみを切断する（ニックを入れる）Cas9ニッカーゼ（Nickase）用い、近接する位置（例えば2個のガイドRNAの5'端から30塩基対程度以内）で、2本鎖DNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖にニック（一本鎖切断）を生じることにより、これら2つの位置でニックが形成された時に初めて当該部位でゲノムが切断されるように構成することで（ダブルニックングシステム）、オフターゲット変異の頻度を大幅に低下させる試みがなされている。

[0007] ここで、ダブルニックングシステムでは、ゲノム上に一カ所のDNA2重鎖切断部位を作成するために、2個のガイドRNA（ガイドRNAペア）を用いる必要があり、ゲノムから1つのDNA領域をその両端を切断して欠失させるためには、2つのガイドRNAペア、すなわち4個のガイドRNAが必要となる。しかしながら、単一の核酸ベクターから複数のガイドRNAを同時に発現させることは困難であることが知られている。

[0008] これまでに、単一の核酸ベクターから複数のガイドRNAを同時に発現させる技術として、アデノウイルスベクターを用いた技術が提案されている（例えば、特許文献1参照）。

前記提案の技術によれば、複数のガイドRNAを同時に発現することができる。一方で、ガイドRNAの数を多くすると、アデノウイルスの調製の段

階で欠失が生じてしまうこともあり、ガイドRNAの数を多くした場合でも欠失を抑制することができる技術の開発が強く求められている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第2020/067004号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、前記従来における諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、HPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変に対し、優れた治療効果を奏するHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物、及び遺伝子治療等に用いられる、より優れた組換えアデノウイルスベクターを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明は、本発明者らの前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、

<1> CasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、Cas9ニッカーゼ又はそれをコードする核酸分子とを含み、

前記CasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子が、下記(1)～(33)から選択されるCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペア又はペアの組合せを含むことを特徴とするヒトパピローマウイルス(HPV)陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物である：

(1) 配列番号1で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号2で表される配列若しくは配列番号2で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコ

ードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号4で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(2) 配列番号1で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号2で表される配列若しくは配列番号2で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号5で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号6で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(3) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号9で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号10で表される配列若しくは配列番号10で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(4) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号5で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号6で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(5) 配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA

A又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 12 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 13 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(6) 配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 11 で表される配列若しくは配列番号 11 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 5 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 6 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(7) 配列番号 1 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 2 で表される配列若しくは配列番号 2 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 4 で表される配列若しくは配列番号 4 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 12 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 13 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(8) 配列番号 1 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 2 で表される配列若しくは配列番号 2 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 4 で表される配列若しくは配列番号 4 で表さ

れる配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号14で表される配列若しくは配列番号14で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号15で表される配列若しくは配列番号15で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(9) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(10) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号4で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするCasガ

イドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(11) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号9で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号10で表される配列若しくは配列番号10で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号14で表される配列若しくは配列番号14で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号15で表される配列若しくは配列番号15で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(12) 配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号4で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号14で表される配列若しくは配列番号14で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号15で表される配列若しくは配列番号15で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(13) 配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号

4 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 9 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 10 で表される配列若しくは配列番号 10 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 14 で表される配列若しくは配列番号 14 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 15 で表される配列若しくは配列番号 15 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(14) 配列番号 16 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 17 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 19 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(15) 配列番号 16 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 20 で表される配列若しくは配列番号 20 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 19 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(16) 配列番号 16 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 20 で表される配列若しくは配列

番号 20 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 21 で表される配列若しくは配列番号 21 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 22 で表される配列若しくは配列番号 22 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(17) 配列番号 23 で表される配列若しくは配列番号 23 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 24 で表される配列若しくは配列番号 24 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 21 で表される配列若しくは配列番号 21 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 22 で表される配列若しくは配列番号 22 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(18) 配列番号 16 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 17 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 25 で表される配列若しくは配列番号 25 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 26 で表される配列若しくは配列番号 26 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 27 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又

はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(19) 配列番号16で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号17で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号28で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号29で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号21で表される配列若しくは配列番号21で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号22で表される配列若しくは配列番号22で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(20) 配列番号16で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号20で表される配列若しくは配列番号20で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号25で表される配列若しくは配列番号25で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号26で表される配列若しくは配列番号26で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号18で表される配列若しくは配列番号18で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号27で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(21) 配列番号16で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号20で表される配列若しくは配列番号20で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイド

R N A又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 2 5 で表される配列若しくは配列番号 2 5 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 2 6 で表される配列若しくは配列番号 2 6 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 1 8 で表される配列若しくは配列番号 1 8 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 1 9 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(2 2) 配列番号 2 5 で表される配列若しくは配列番号 2 5 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 2 6 で表される配列若しくは配列番号 2 6 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 1 8 で表される配列若しくは配列番号 1 8 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 2 7 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 2 1 で表される配列若しくは配列番号 2 1 で表される配列の第 2 ～ 2 0 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 2 2 で表される配列若しくは配列番号 2 2 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(2 3) 配列番号 2 5 で表される配列若しくは配列番号 2 5 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 2 6 で表される配列若しくは配列番号 2 6 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそ

れをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 19 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 21 で表される配列若しくは配列番号 21 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 22 で表される配列若しくは配列番号 22 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(24) 配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペア；

(25) 配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 11 で表される配列若しくは配列番号 11 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペア；

(26) 配列番号 12 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 13 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペア；

(27) 配列番号 12 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 13 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 11 で表される配列若しくは配列番号 11 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(28) 配列番号12で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(29) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(30) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号5で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号6で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(31) 配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号5で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号6で表される配列を標的とするCasガイド

R N A又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(32) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(33) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号5で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号6で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ。

<2> 前記C a sガイドR N Aをコードする核酸分子及び前記C a s 9ニッカーゼをコードする核酸分子が、核酸ベクターに搭載されている前記<

1 >に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物である。

<3> 前記核酸ベクターが、組換えアデノウイルスベクター又は組換えレンチウイルスベクターである前記<2>に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物である。

<4> 前記組換えアデノウイルスベクターが、L4/E3領域において、12.4K遺伝子配列を欠失し、かつL4ポリA領域配列を有する組換えアデノウイルスベクターである前記<3>に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物である。

<5> ベクターゲノム上で合計4個以上のCasガイドRNAをコードする核酸分子を2カ所以上の部位に分割して有する前記<4>に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物である。

<6> ベクターゲノム上で合計6個以上のCasガイドRNAをコードする核酸分子を2カ所以上の部位に分割して有する前記<5>に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物である。

<7> ベクターゲノム上で合計8個以上のCasガイドRNAをコードする核酸分子を2カ所以上の部位に分割して有する前記<5>に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物である。

<8> CasガイドRNAをコードする核酸分子の最多の連続数が6個である前記<5>から<7>のいずれかに記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物である。

<9> 前記Cas9ニッカーゼをコードする核酸分子が、配列番号87で表される短縮されたEFプロモーターの下流に位置する前記<2>から<8>のいずれかに記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物である。

<10> 前記Cas9ニッカーゼをコードする核酸分子と、前記Cas9ニッカーゼをコードする核酸分子とを同一ベクター上に有する前記<2>から<9>のいずれかに記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺

伝子治療用医薬組成物である。

<11> 前記核酸ベクターが組換えアデノウイルスベクターであり、
前記Cas9ニッカーゼをコードする核酸分子が、前記アデノウイルスベクターのE4領域に搭載されている前記<4>から<10>のいずれかに記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物である。

<12> L4/E3領域において、12, 4K遺伝子配列を欠失し、かつL4ポリA領域配列を有することを特徴とする組換えアデノウイルスベクターである。

<13> L4/E3領域において、アデノウイルス5型の位置付けで、第27, 864番塩基～第28, 137番塩基、及び第28, 200番塩基以降が欠失している前記<12>に記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<14> ベクターゲノム上で合計4個以上のCasガイドRNA発現ユニットを2カ所以上の部位に分割して有することを特徴とする組換えアデノウイルスベクターである。

<15> 前記CasガイドRNA発現ユニットが、アデノウイルスの必須領域の少なくとも一部を挟んだ2カ所以上の部位に分割して搭載されている前記<14>に記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<16> 前記CasガイドRNA発現ユニットが、前記アデノウイルスベクターのE1領域、E3領域、及びE4領域からなる群から選択される2カ所以上の部位に分割して搭載されている前記<14>から<15>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<17> ベクターゲノム上で合計6個以上のCasガイドRNA発現ユニットを有する前記<14>から<16>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<18> ベクターゲノム上で合計8個以上のCasガイドRNA発現ユニットを有する前記<14>から<17>のいずれかに記載の組換えアデノ

ウイルスベクターである。

<19> Cas ガイドRNA 発現ユニットの最多の連続数が6個である前記<14>から<18>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<20> Cas タンパク質発現ユニットを有する前記<14>から<19>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<21> 組換えアデノウイルスベクターが前記<12>から<13>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである前記<14>から<20>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<22> ヒトパピローマウイルス (HPV) を標的とする Cas ガイドRNA 発現ユニットを有する前記<14>から<21>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<23> ベクターゲノム上で合計6個以上のショートヘアピンRNA 発現ユニットを2カ所以上の部位に分割して有することを特徴とする組換えアデノウイルスベクターである。

<24> 前記ショートヘアピンRNA 発現ユニットが、アデノウイルスの必須領域の少なくとも一部を挟んだ2カ所以上の部位に分割して搭載されている前記<23>に記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<25> 前記ショートヘアピンRNA 発現ユニットが、前記アデノウイルスベクターのE1領域、E3領域、及びE4領域からなる群から選択される2カ所以上の部位に分割して搭載されている前記<23>から<24>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<26> ベクターゲノム上で合計8個以上のショートヘアピンRNA 発現ユニットを有する前記<23>から<25>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<27> ショートヘアピンRNA 発現ユニットの最多の連続数が4個である前記<23>から<26>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<28> 組換えアデノウイルスベクターが前記<12>から<13>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである前記<23>から<27>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<29> ベクターゲノム上で、2個以上のCasガイドRNA発現ユニットと、2個以上のショートヘアピンRNA発現ユニットとを有することを特徴とする組換えアデノウイルスベクターである。

<30> CasガイドRNAの標的がセーフハーバー領域であり、ショートヘアピンRNAの標的がCypor mRNAである前記<29>に記載の組換えアデノウイルスベクターである。

<31> 組換えアデノウイルスベクターが前記<12>から<13>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである前記<29>から<30>のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、従来における前記諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、HPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変に対し、優れた治療効果を奏するHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物、及び遺伝子治療等に用いられる、より優れた組換えアデノウイルスベクターを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、HPV16の遺伝子の構造を示す模式図である。

[図2]図2は、ダブルニッキングを説明するための図である。

[図3]図3は、試験例1におけるgRNA候補の試験管内における切断効率を調べた結果を示す図である。

[図4]図4は、試験例1におけるgRNA候補の試験管内における切断効率を調べた結果を示す図である。

[図5]図5は、試験例1におけるgRNA候補の試験管内における切断効率を調べた結果を示す図である。

[図6]図6は、試験例1におけるHPV16(+)子宮頸がん細胞を用いたダ

ブルニッキング g R N A の検討の結果を示す図である（g R N A : 1 組 2 個（1 ペア））。

[図7]図 7 は、試験例 1 における H P V 1 6 （+）子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキング g R N A の検討の結果を示す図である（g R N A : 2 組 4 個（2 ペアの組合せ））。

[図8]図 8 は、試験例 1 における H P V 1 6 （+）子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキング g R N A の検討の結果を示す図である（g R N A : 3 組 6 個（3 ペアの組合せ））。

[図9]図 9 は、試験例 1 における H P V 1 6 （+）子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキング g R N A の検討の結果を示す図である（g R N A : 4 組 8 個（4 ペアの組合せ））。

[図10]図 1 0 は、試験例 1 における H P V 1 6 （+）子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキング g R N A の検討の結果を示す図である（g R N A : 4 組 8 個（4 ペアの組合せ））。

[図11]図 1 1 は、試験例 1 における H P V 1 6 （+）子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキング g R N A の検討の結果を示す図である（g R N A : 1 組 2 個（1 ペア））。

[図12]図 1 2 は、試験例 1 における H P V 1 6 （+）子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキング g R N A の検討の結果を示す図である（g R N A : 1 組 2 個（1 ペア）又は 2 組 4 個（2 ペアの組合せ））。

[図13]図 1 3 は、試験例 1 における H P V 1 6 （+）子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキング g R N A の検討の結果を示す図である（g R N A : 1 組 2 個（1 ペア）又は 2 組 4 個（2 ペアの組合せ））。

[図14]図 1 4 は、試験例 1 における H P V 1 6 （+）子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキング g R N A の検討の結果を示す図である（g R N A : 1 組 2 個（1 ペア）又は 2 組 4 個（2 ペアの組合せ））。

[図15]図 1 5 は、試験例 1 における H P V 1 6 （+）子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキング g R N A の検討の結果を示す図である（A c i d R e

dで染色した96ウェルプレート)。

[図16]図16は、HPV18の遺伝子の構造を示す模式図である。

[図17]図17は、試験例2におけるgRNA候補の試験管内における切断効率を調べた結果を示す図である。

[図18]図18は、試験例2におけるgRNA候補の試験管内における切断効率を調べた結果を示す図である。

[図19]図19は、試験例2におけるgRNA候補の試験管内における切断効率を調べた結果を示す図である。

[図20]図20は、試験例2におけるgRNA候補の試験管内における切断効率を調べた結果を示す図である。

[図21]図21は、試験例2におけるHPV18(+)子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキングgRNAの検討の結果を示す図である(gRNA:1組2個(1ペア))。

[図22]図22は、試験例2におけるHPV18(+)子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキングgRNAの検討の結果を示す図である(gRNA:2組4個(2ペアの組合せ))。

[図23]図23は、試験例2におけるHPV18(+)子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキングgRNAの検討の結果を示す図である(gRNA:3組6個(3ペアの組合せ))。

[図24]図24は、試験例2におけるHPV18(+)子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキングgRNAの検討の結果を示す図である(gRNA:4組8個(4ペアの組合せ))。

[図25]図25は、実験に用いた8重ガイドRNA発現ユニット搭載アデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

[図26]図26は、実験に用いた8重ガイドRNA発現ユニット搭載アデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

[図27]図27は、実験に用いた8重ガイドRNA発現ユニット搭載アデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

[図28]図28は、L4ポリA配列を回復したL4／E3欠失の延長を説明するための図である。

[図29]図29は、試験例4の結果を示す図である。

[図30]図30は、試験例5の結果を示す図である。

[図31]図31は、試験例6の結果を示す図である。

[図32]図32は、試験例7の結果を示す図である。

[図33]図33は、試験例8の結果を示す図である。

[図34]図34は、試験例10で用いたアデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

[図35]図35は、試験例10で用いたアデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

[図36]図36は、試験例10の結果を示す図である。

[図37]図37は、試験例10の結果を示す図である。

[図38]図38は、試験例10の結果を示す図である。

[図39]図39は、試験例10の結果を示す図である。

[図40]図40は、試験例11で用いたアデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

[図41]図41は、試験例11の結果を示す図である。

[図42]図42は、試験例11の結果を示す図である。

[図43]図43は、試験例12で用いたアデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

[図44]図44は、試験例12の結果を示す図である。

[図45]図45は、試験例12の結果を示す図である。

[図46]図46は、試験例13の結果を示す図である。

[図47]図47は、試験例13の結果を示す図である。

[図48]図48は、試験例13の結果を示す図である。

[図49]図49は、試験例13の結果を示す図である。

[図50]図50は、試験例13の結果を示す図である。

[図51]図51は、試験例13の結果を示す図である。

[図52]図52は、試験例13の結果を示す図である。

[図53]図53は、試験例13の結果を示す図である。

[図54]図54は、試験例13の結果を示す図である。

[図55]図55は、試験例13の結果を示す図である。

[図56]図56は、試験例14で用いたアデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

[図57]図57は、試験例14の結果を示す図である。

[図58]図58は、試験例14の結果を示す図である。

[図59]図59は、試験例15で用いたアデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

[図60]図60は、試験例15の結果を示す図である。

[図61]図61は、試験例15の結果を示す図である。

[図62]図62は、試験例16で用いたアデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

[図63]図63は、試験例16の結果を示す図である。

[図64]図64は、試験例16の結果を示す図である。

[図65]図65は、試験例17で用いたアデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

[図66]図66は、試験例17の結果を示す図である。

[図67]図67は、試験例17の結果を示す図である。

[図68]図68は、試験例18におけるマウスの状態を示す図である。

[図69]図69は、試験例18において、腫瘍の大きさを経時的に測定した結果を示す図である。

[図70]図70は、試験例19で用いたノックインベクターの模式図である。

[図71]図71は、試験例19で用いたノックインベクターの模式図である。

[図72]図72は、マウスのフェニルアラニン水酸化酵素をコードする遺伝子を説明するための模式図である。

[図73]図73は、試験例20の結果を示す図である。

[図74]図74は、試験例21の実験の概略を説明するための図である。

[図75]図75は、試験例21におけるドナーDNAを説明するための図である。

[図76]図76は、試験例21におけるPCRの結果を示す図である。

[図77]図77は、試験例22の結果を示す図である。

[図78]図78は、試験例22の結果を示す図である。

[図79]図79は、試験例22の結果を示す図である。

[図80]図80は、試験例22の結果を示す図である。

[図81]図81は、試験例22の結果を示す図である。

[図82]図82は、試験例23の実験の概略を説明するための図である。

[図83]図83は、試験例23における6週目の血中フェニルアラニン濃度を測定した結果を示す図である。

[図84]図84は、試験例23における13週目の血中フェニルアラニン濃度を測定した結果を示す図である。

[図85]図85は、試験例23におけるノックイン効率検討を行なった結果を示す図である。

[図86]図86は、試験例23におけるノックイン効率検討を行なった結果を示す図である。

[図87]図87は、試験例23におけるT7E1アッセイでミスマッチを検出した結果を示す図である。

[図88]図88は、点変異修復とcDNAノックインとを説明するための模式図である。

[図89]図89は、試験例24で用いたベクターを説明するための模式図である。

[図90]図90は、試験例25の結果を示す図である。

[図91]図91は、試験例25の結果を示す図である。

[図92]図92は、試験例26の結果を示す図である。

[図93]図93は、試験例27におけるセーフハーバー領域、ドナーDNAを説明するための模式図である。

[図94]図94は、試験例27におけるPCRの結果を示す図である。

[図95]図95は、試験例27におけるPCR DNAをBamHIで切断した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] (HPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物)

本発明のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物は、CasガイドRNA又はそれらをコードする核酸分子と、Cas9ニッカーゼ又はそれをコードする核酸分子とを少なくとも含み、必要に応じて更にその他の成分を含む。

[0015] 前記HPV陽性がんとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、子宮頸がん、中咽頭がんなどが挙げられる。

[0016] 前記HPV陽性前がん病変としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、子宮頸部異形成などが挙げられる。

[0017] 前記HPVの型としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、HPV16、HPV18などが挙げられる。

[0018] <CasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子>

前記CasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子は、下記(1)～(33)から選択されるCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペア又はペアの組合せを含む。前記CasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子は、下記(1)～(33)から選択されるCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子の組合せのみからなるものであってもよいし、更に他のCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子を含んでもよい。

[0019] 下記(1)から(13)、(24)から(33)は、HPV16に対して好適に用いることができる。

(1) 配列番号1で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそ

れをコードする核酸分子と、配列番号 2 で表される配列若しくは配列番号 2 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 4 で表される配列若しくは配列番号 4 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(2) 配列番号 1 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 2 で表される配列若しくは配列番号 2 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 5 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 6 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(3) 配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 9 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 10 で表される配列若しくは配列番号 10 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(4) 配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 5 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 6 で表される配列を標的とする Cas ガイド

R N A又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(5) 配列番号3で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(6) 配列番号3で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号5で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号6で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(7) 配列番号1で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号2で表される配列若しくは配列番号2で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号4で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(8) 配列番号1で表される配列を標的とするC a sガイドR N A又はそれをコードする核酸分子と、配列番号2で表される配列若しくは配列番号2

で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号4で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号14で表される配列若しくは配列番号14で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号15で表される配列若しくは配列番号15で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(9) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(10) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号4で表さ

れる配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(11) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号9で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号10で表される配列若しくは配列番号10で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号14で表される配列若しくは配列番号14で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号15で表される配列若しくは配列番号15で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(12) 配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号4で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号14で表される配列若しくは配列番号14で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号15で表される配列若しくは配列番号15で表される配

列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(13) 配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号4で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号9で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号10で表される配列若しくは配列番号10で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号14で表される配列若しくは配列番号14で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号15で表される配列若しくは配列番号15で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

[0020] (24) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペア

(25) 配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペア

(26) 配列番号12で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペア

(27) 配列番号12で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とする

C a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(28) 配列番号12で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(29) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(30) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号5で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号6で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(31) 配列番号3で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又は

それをコードする核酸分子と、配列番号 11 で表される配列若しくは配列番号 11 で表される配列の第 3～21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 5 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 6 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(32) 配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3～21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 11 で表される配列若しくは配列番号 11 で表される配列の第 3～21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 12 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 13 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(33) 配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3～21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 11 で表される配列若しくは配列番号 11 で表される配列の第 3～21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 12 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 13 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 5 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 6 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

[0021] 下記 (14) から (23) は、HPV18 に対して好適に用いることができる。

(14) 配列番号 16 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 17 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 19 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(15) 配列番号 16 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 20 で表される配列若しくは配列番号 20 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 19 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(16) 配列番号 16 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 20 で表される配列若しくは配列番号 20 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 21 で表される配列若しくは配列番号 21 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 22 で表される配列若しくは配列番号 22 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコー

ドする核酸分子のペアとの組合せ

(17) 配列番号23で表される配列若しくは配列番号23で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号24で表される配列若しくは配列番号24で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号21で表される配列若しくは配列番号21で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号22で表される配列若しくは配列番号22で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(18) 配列番号16で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号17で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号25で表される配列若しくは配列番号25で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号26で表される配列若しくは配列番号26で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号18で表される配列若しくは配列番号18で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号27で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(19) 配列番号16で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号17で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号28で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号29で表される配列を標的とするCasガ

イドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号21で表される配列若しくは配列番号21で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号22で表される配列若しくは配列番号22で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(20) 配列番号16で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号20で表される配列若しくは配列番号20で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号25で表される配列若しくは配列番号25で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号26で表される配列若しくは配列番号26で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号18で表される配列若しくは配列番号18で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号27で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(21) 配列番号16で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号20で表される配列若しくは配列番号20で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号25で表される配列若しくは配列番号25で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号26で表される配列若しくは配列番号26で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 19 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(22) 配列番号 25 で表される配列若しくは配列番号 25 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 26 で表される配列若しくは配列番号 26 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 27 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 21 で表される配列若しくは配列番号 21 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 22 で表される配列若しくは配列番号 22 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

(23) 配列番号 25 で表される配列若しくは配列番号 25 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 26 で表される配列若しくは配列番号 26 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 19 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 21 で表される配列若しくは配列番号 21 で表される配列の第 2

～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号22で表される配列若しくは配列番号22で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

[0022] 前記CasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子を用いることにより、ダブルニッキング法を用いた切断を行い、HPVゲノムのE6及びE7領域を安全かつ完全に破壊することができ、HPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変を治療することができる。

[0023] 前記CasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子は、RNAの態様であってもよいし、CasガイドRNAをコードする核酸分子の態様であってもよいが、CasガイドRNAをコードする核酸分子、特にDNAの態様が好ましい。

[0024] 前記CasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物における含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0025] <Cas9ニッカーゼ又はそれをコードする核酸分子>

前記Casニッカーゼ又はそれをコードする核酸分子としては、特に制限はなく、公知のCasニッカーゼ又はそれをコードする核酸分子を用いることができる。

[0026] 前記Cas9ニッカーゼ又はそれをコードする核酸分子は、タンパク質の態様であってもよいし、Cas9ニッカーゼをコードする核酸分子の態様であってもよいが、Cas9ニッカーゼをコードする核酸分子の態様が好ましい。

[0027] 前記Cas9ニッカーゼ又はそれをコードする核酸分子のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物における含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0028] 前記CasガイドRNAをコードする核酸分子及び前記Cas9ニッカーゼをコードする核酸分子は、核酸ベクターに搭載されていることが好ましい

。前記C a s ガイドRNAをコードする核酸分子及び前記C a s 9 ニッカーゼをコードする核酸分子は、同一の核酸ベクターに搭載されていてもよいし、異なる核酸ベクターに搭載されていてもよいが、同一の核酸ベクターに搭載されていることが好ましい。

[0029] 前記核酸ベクターとは、外来遺伝子等を標的細胞内に送達するために用いられる、核酸からなる分子を意味する。前記核酸ベクターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、プラスミド、DNAウイルスベクターやRNAウイルスベクター等のウイルスベクターなどが挙げられる。また、非ウイルスベクター系では、脂質ナノ粒子（lipid nanoparticle、LNP）、エレクトロポレーションなどを用いる方法も挙げられる。前記ウイルスベクターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、組換えアデノウイルスベクター、組換えアデノ随伴ウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクター、組換えバキュロウイルスベクター、組換えセンダイウイルスベクター、組換えワクシニアウイルスベクター、組換えヘルペスウイルスベクターなどが挙げられる。これらの中でも、組換えアデノウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターが好ましい。

[0030] 前記組換えアデノウイルスベクターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、後述する本発明の組換えアデノウイルスベクターが好ましい。

[0031] 前記組換えアデノウイルスベクター上での前記C a s ガイドRNAをコードする核酸分子の配置としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、1カ所の部位にすべて配置してもよいし、2カ所以上の部位に分割して配置してもよい。

[0032] 前記C a s ガイドRNAをコードする核酸分子を合計4個以上用いる場合には、前記組換えアデノウイルスベクター上で2カ所以上の部位に分割して配置することが好ましい。

[0033] 前記C a s ガイドRNAをコードする核酸分子を2カ所以上の部位に分割

して配置する場合には、後述する本発明のC a sガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターにおけるC a sガイドRNA発現ユニットと同様に配置することが好ましい。

[0034] 前記C a sガイドRNAをコードする核酸分子は、後述する本発明のC a sガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターにおけるC a sガイドRNA発現ユニットと同様に、プロモーターなどその発現を調節する発現調節領域等と共に用いることができる。

[0035] 前記C a s 9ニッカーゼをコードする核酸分子は、後述する本発明のC a sガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターにおけるC a sタンパク質発現ユニットと同様に、プロモーター、ポリA等と共に用いることができる。

[0036] 前記C a s 9ニッカーゼをコードする核酸分子は、後述する本発明のC a sガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターにおけるC a sタンパク質発現ユニットと同様に配置することが好ましい。

[0037] 前記核酸ベクターの製造方法としては、特に制限はなく、当業者が通常行う方法によって製造することができる。

[0038] <その他の成分>

前記その他の成分としては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、薬学的に許容される担体などが挙げられる。

薬学的に許容される担体とは、作用物質（C a sニッカーゼ、C a sガイドRNAなど）の細胞、生物体、又は対象への投与を助ける物質を意味する。

前記薬学的に許容される担体としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、水、N a C l、生理食塩水、乳酸リンゲル液、規定のスクロース、規定のグルコース、結合剤、増量剤、崩壊剤、潤滑剤、コーティング剤、甘味剤、香料、着色剤などが挙げられる。これらは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。

[0039] 前記その他の成分のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物における含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0040] 前記HPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物の剤形としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0041] 前記HPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物の投与方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、経口投与、局所的接触、坐剤としての投与、静脈内、腹腔内、筋肉内、病巣内、髄腔内、鼻腔内、又は皮下の投与などが挙げられる。投与経路としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、非経口、経粘膜（例えば、頬側、舌下、口蓋、歯肉、鼻、膣、直腸、又は経皮）を含む任意の経路とすることができる。前記非経口投与としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、静脈内、筋肉内、細動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、頭蓋内などが挙げられる。送達の他の様式には、リボソーム製剤の使用、静脈内注入、経皮パッチなどが挙げられるが、それらに限定されない。

[0042] 本発明において、「有効量」又は「十分な量」は、有益な、又は所望の結果をもたらすのに十分である作用物質（例えば、Casニッカーゼ等のCasタンパク質、CasガイドRNAなど）の量を指す。治療的有效量は、処置されている対象及び疾患状態、対象の体重及び年齢、疾患状態の重症度、投与の様式などの1つ又は複数に依存して変わり得、それは、当業者により容易に決定することができる。特定の量は、選択された特定の作用物質、標的細胞型、対象における標的細胞の位置、従われるべき投与計画、それが他の作用物質と併用して投与されるかどうか、投与のタイミング、及びそれが運ばれる物理的送達系の1つ又は複数に依存して変わり得る。

[0043] 本発明は、本発明のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物を対象へ投与することを特徴とするゲノム編集による治療方法（遺伝子治療方法）、又は後述する本発明の組換えアデノウイルスベクター

、本発明のC a s ガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターを用いるゲノム編集による治療方法（遺伝子治療方法）にも関する。

[0044] （組換えアデノウイルスベクター）

本発明において、「組換えアデノウイルスベクター」（「アデノウイルスベクター」と称することもある。）とは、アデノウイルス固有の塩基配列とは異なる塩基配列をそのゲノム中に含有するアデノウイルスのことをいう。

[0045] 前記組換えアデノウイルスベクターの由来としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、ヒト由来のアデノウイルスであることが好ましい。ヒト由来のアデノウイルスにおいては、C型に分類される2型又は5型がより好ましい。

[0046] 本発明の組換えアデノウイルスベクターは、L4／E3領域において、12.4K遺伝子配列を欠失し、かつL4ポリA領域配列を有する新規の組換えアデノウイルスベクターである。前記組換えアデノウイルスベクターは、バックボーンを改変し、より長い核酸領域をペイロードして運搬することが可能である。

[0047] 前記組換えアデノウイルスベクターは、L4／E3領域において、アデノウイルス5型の位置付けで、第27,864番塩基～第28,137番塩基、及び第28,200番塩基以降が欠失しているものであることが好ましい。

[0048] 前記組換えアデノウイルスベクターは、E1領域において、アデノウイルス5型の位置付けで、ゲノム左端から第358番塩基までの領域をすべて含むものであることが好ましい。

[0049] 前記組換えアデノウイルスベクターの製造方法としては、特に制限はなく、公知の方法を目的に応じて適宜選択することができる。例えば、既存のアデノウイルスベクターをベースとして、目的とする配列の欠失や挿入等を当業者が通常用いる標準的な遺伝子組み換え技術を用いて導入することにより製造することができる。

- [0050] 前記既存のアデノウイルスベクターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、Miyake S, Saito I et al (PNAS, 93:1320-1324, 1996)に記載されているアデノウイルスベクターが好ましい。前記Miyake S, Saito I et alに記載のアデノウイルスベクターは、E1領域に第455番塩基～第3,328番塩基の欠失と、E3領域に第28,593番塩基～第30,470番塩基の欠失とを有しており、また、E4領域に外来DNAを挿入する部位（クローン化部位）を有している。
- [0051] 前記組換えアデノウイルスベクターは、例えばAd5アデノウイルスベクターと通常組み合わせて使用される293細胞などを用いて増幅させることができる。
- [0052] 前記組換えアデノウイルスベクターは、ヒトの治療用遺伝子、GFP遺伝子等のいわゆるレポーター遺伝子、リコンビナーゼ等のタンパク質をコードする遺伝子、プロモーターやポリA配列などの調節遺伝子、また何ら機能を有さない塩基配列などを搭載することができる。
- [0053] 前記組換えアデノウイルスベクターに搭載する遺伝子等の挿入位置としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、E1領域、E3領域、E4領域などが挙げられる。前記遺伝子等の挿入は、1カ所に挿入してもよいし、2カ所以上に挿入してもよい。
- [0054] 前記組換えアデノウイルスベクターは、CRISPR/Casシステムによるゲノム編集等に好適に用いることができる。
- [0055] 本発明において、「ゲノム編集」は、1つ又は複数のヌクレアーゼ及び／又はニッカーゼを用いて、DNAが、標的DNA、例えば、細胞のゲノムから挿入、置換、又は除去される一連の遺伝子操作を意味する。ヌクレアーゼは、ゲノムにおいて所望の位置に、特異的な二本鎖切断を生じさせ、細胞の内因性機構を利用して、相同組換え修復（HDR）又は非相同末端結合（NHEJ）により、引き起こされた切断を修復する。ニッカーゼは、ゲノムにおいて所望の位置に特異的な一本鎖切断を生じさせる。ある態様において、

2つのニッカーゼは、標的DNAの向かい合わせのストランドに2個の一本鎖切断を生じさせるために用いることができ、それにより、平滑又は突出末端を生み出す。標的DNA配列のゲノム編集を誘導するために任意の適切なヌクレアーゼを導入することができ、それらには、CRISPR関連タンパク質（Cas）ヌクレアーゼ、Cpf1、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、他のエンドー又はエキソヌクレアーゼ、それらのバリエーション、それらの断片、及びそれらの組合せが挙げられるが、それらに限定されない。

[0056] 本発明において、「ゲノム切断」又は「ゲノムの切断」とは、上述のゲノム編集に伴って、ゲノムを構成する2本鎖核酸の両方の鎖が切断されることを意味する。当該2本鎖核酸の切断は、センス鎖とアンチセンス鎖の互に対応する塩基対での切断により、平滑末端を生じるものでもよいし、センス鎖とアンチセンス鎖が近接する異なる位置で切断されることにより、突出末端を生じるものであってもよい。

[0057] 本発明において、「CRISPR/Casシステム」は、原核生物が有する免疫機構であるCRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeat）核酸とCasタンパク質（CRISPR-associated protein）を利用したシステムを意味する。「CRISPR/Casシステム」はクラス1とクラス2に分類され、クラス2の「CRISPR/Casシステム」はさらにI型、V型、VI型に分類される（Yamano et al., Molecular Cell, 2017, Vol. 67, pp. 633–645）。

[0058] I型「CRISPR/Casシステム」に分類される、Casタンパク質としてCas9を利用するシステムは、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）由来のCas9タンパク質と、CRISPR RNA（crRNA）及びこれと部分的に相補的で

あり、C a s 9タンパク質への結合の足場となるトランス作動性RNA (t r a n s - a c t i v a t i n g c r RNA : t r a c r RNA) からなるガイドRNA (g RNA) を利用する。上記c r RNAとt r a c r RNAは、融合した単一のRNA分子 (単一ガイドRNA) として供給されてもよいし、別々のRNA分子 (「非単一ガイドRNA」 と称することがある) として供給されてもよい。一つの態様において、「CRISPR/C a s 9システム」は標的細胞に対して、C a s 9タンパク質をコードするDNA断片、c r RNAをコードするDNA断片及びt r a c r RNAを発現するDNA断片として供給される。また、一つの態様において、「CRISPR/C a s 9システム」は、C a s 9タンパク質をコードするDNA断片及び単一ガイドRNAをコードするDNA断片として供給される。一つの態様において、これらのDNA断片は、ウイルスベクターを用いて標的細胞に供給される。これらのDNA断片は、単一のウイルスベクターあるいは、別々のウイルスベクターにより標的細胞に供給され得る。なお、t r a c r RNAをコードするDNAとしては、特に制限はなく、公知のものを適宜選択することができ、例えば、A d d g e n e 社製のプラスミド (p X 2 6 0) などを適宜選択することができる。

[0059] 前記組換えアデノウイルスベクターは、C a s ガイドRNA発現ユニット、ショートヘアピンRNA発現ユニット、C a s タンパク質発現ユニット、及びドナーDNA発現ユニットからなる群から選択される1種以上を有する組換えアデノウイルスベクターに好適に用いることができる。

[0060] (C a s ガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクター)

本発明のC a s ガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターは、少なくともベクターゲノム上で合計4個以上のC a s ガイドRNA発現ユニットを2カ所以上の部位に分割して有し、必要に応じて更にその他の構成を有する。

C a s ガイドRNA発現ユニットを2カ所以上に分割して組み込むことに

より、8個以上のユニットを含む場合でも、その欠失を防ぐことができる。

前記CasガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターは、動物細胞内で当該CasガイドRNA発現ユニットを安定的に保持することができる。

前記CasガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターは、CRISPR/Casシステムによるゲノム編集等に好適に用いることができる。

[0061] <CasガイドRNA発現ユニット>

前記CasガイドRNA発現ユニット（以下、以下、「ガイドRNA発現ユニット」と称することがある。）は、CRISPR/Casシステムにおいて使用されるCasガイドRNA（「ガイドRNA」と称することもある。）を発現するためのDNA構成単位を意味する。

前記CasガイドRNA発現ユニットは、CasガイドRNAに転写されるDNA核酸配列を含むものである。

[0062] 前記「CasガイドRNA」の態様としては、crRNAとtracrRNAとを融合した単一ガイドRNAを用いる「単一CasガイドRNA」の態様、crRNAとtracrRNAとを別々とした非単一ガイドRNAを用いる「非単一CasガイドRNA」の態様が挙げられる。

[0063] 前記「CasガイドRNA発現ユニット」の態様としては、単一CasガイドRNAを発現するための「単一CasガイドRNA発現ユニット」の態様、crRNAを発現するための「crRNA発現ユニット」の態様、tracrRNAを発現するための「tracrRNA発現ユニット」の態様とすることができる。

[0064] 前記「CasガイドRNA発現ユニット」は、「単一CasガイドRNA発現ユニット」のみからなるものであってもよいし、「crRNA発現ユニット」と「tracrRNA発現ユニット」とからなるものであってもよいし、「単一CasガイドRNA発現ユニット」と「crRNA発現ユニット」と「tracrRNA発現ユニット」とを含むものであってもよい。

[0065] 本明細書において、前記C a sガイドRNA発現ユニットの個数は、「単一C a sガイドRNA発現ユニット」、「c r RNA発現ユニット」、「t r a c r RNA発現ユニット」のそれぞれについて1つと数える。即ち、「c r RNA発現ユニット」と「t r a c r RNA発現ユニット」とを1つずつ用いる場合の前記C a sガイドRNA発現ユニットの個数は2個となる。

[0066] 前記非単一C a sガイドRNAの態様では、「c r RNA発現ユニット」及び「t r a c r RNA発現ユニット」の個数は、両者が同一であってもよいし、異なってもよい。

両者の個数が異なる場合の例としては、前記「t r a c r RNA発現ユニット」を2個、前記「c r RNA発現ユニット」を6個とする態様；前記「t r a c r RNA発現ユニット」を4個、前記「c r RNA発現ユニット」を4個とする態様；前記「t r a c r RNA発現ユニット」を6個、前記「c r RNA発現ユニット」を2個とする態様；前記「t r a c r RNA発現ユニット」を4個、前記「c r RNA発現ユニット」を8個とする態様などが挙げられる。

[0067] 前記C a sガイドRNA発現ユニットのベクターゲノム上での配置としては、合計4個以上のC a sガイドRNA発現ユニットを2カ所以上の部位に分割して配置する限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0068] 前記C a sガイドRNA発現ユニットのベクターゲノム上での合計個数としては、4個以上であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、又は21個以上などが挙げられる。これらの中でも、合計6個以上が好ましく、合計8個以上がより好ましく、合計10個以上がさらに好ましく、合計12個以上が特に好ましい。

[0069] C a sガイドRNA発現ユニットを配置するベクター上の部位は、2カ所以上であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが

、アデノウイルスの必須領域の少なくとも一部を挟んだ2カ所以上の部位に分割して搭載されていることが好ましい。

[0070] 本明細書において、アデノウイルスの必須領域とは、初期遺伝子群のE1A領域、E1B領域、E2A領域、E2B領域、E4領域、後期遺伝子群のL1領域からL4領域までの各領域のことをいう。

また、「アデノウイルスの必須領域の少なくとも一部を挟んだ」とは、分割して搭載された前記CasガイドRNA発現ユニットの間に、上記したアデノウイルスの必須領域の少なくとも一部が存在していればよく、上記したアデノウイルスの必須領域のすべてが存在していてもよい。

[0071] 前記CasガイドRNA発現ユニットは、前記アデノウイルスベクターのE1領域（以下、「E1部位」と称することがある。）、E3領域（以下、「E3部位」と称することがある。）、及びE4領域（以下、「E4部位」と称することがある。）からなる群から選択される2カ所以上の部位に分割して搭載されていることが好ましい。

[0072] 前記アデノウイルスベクターでは、アデノウイルスのE1領域は欠失していることが好ましい。この場合、E1領域のDNAを有する293細胞で機能補完される。前記アデノウイルスベクターにおいて欠失しているE1領域のことを、「E1欠失領域」又は「E1欠失組込み部位」と称することがある。本明細書において、E1領域には、欠失しているE1領域のことも含まれる。なお、本明細書において、ある領域が欠失しているとは、その領域のすべてが欠失している場合、その領域の一部が欠失している場合のいずれもが含まれる。

[0073] アデノウイルスにおけるE3遺伝子群はウイルス複製に必須ではない。そのため、前記アデノウイルスベクターでは、E3領域は欠失していることが好ましい。前記アデノウイルスベクターにおいて欠失しているE3領域のことを、「E3欠失領域」又は「E3欠失組込み部位」と称することがある。本明細書において、E3領域には、欠失しているE3領域のことも含まれる。

[0074] 前記アデノウイルスベクターにおけるE4領域は、アデノウイルスのE4遺伝子群を有する領域である。前記E4領域は、遺伝子が欠失していてもよいし、欠失していなくてもよい。前記E4領域は、必ずしも欠失を伴わずに外来DNAの組み込みが可能な部位を含む領域である（以下、「E4組み込み部位」と称することがある。）。本明細書において、E4領域には、欠失しているE4領域のことも含まれる。

[0075] 1つの配置部位におけるCasガイドRNA発現ユニットの個数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、又は11個以上などが挙げられる。これらの中でも、2個以上が好ましく、4個以上がより好ましく、6個以上が特に好ましい。

[0076] 1つの配置部位におけるCasガイドRNA発現ユニットの個数の上限（CasガイドRNA発現ユニットの最多の連続数）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、6個が好ましく、8個がより好ましい。

1つの部位におけるCasガイドRNA発現ユニットの個数の下限（CasガイドRNA発現ユニットの最小の連続数）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、2個が好ましい。

[0077] なお、本明細書において、複数の数値の範囲が示された場合、それら複数の範囲の任意の下限値及び上限値の組み合わせからなる範囲も同様に意味する。

[0078] 前記CasガイドRNA発現ユニットを2カ所に分割して配置する場合の例（第1の配置部位における個数：第2の配置部位における個数）としては、1個：3個以上、2個：2個以上などが挙げられ、より具体的には、2個：2個、2個：4個、2個：6個、2個：8個、3個：3個、3個：6個、4個：4個、4個：6個、4個：8個、6個：6個、6個：8個、8個：8個などが挙げられる。

[0079] 前記CasガイドRNA発現ユニットを3カ所に分割して配置する場合の

例（第１の配置部位における個数：第２の配置部位における個数：第３の配置部位における個数）としては、１個：１個：２個以上が挙げられ、より具体的には、２個：２個：２個、２個：２個：４個、２個：２個：６個、２個：２個：８個、３個：３個：３個、３個：３個：６個、４個：４個：４個、４個：４個：６個、４個：４個：８個、６個：６個：６個、８個：８個：８個などが挙げられる。

[0080] ベクターゲノム上で合計４個以上のCasガイドRNA発現ユニットを２カ所以上の部位に分割して有することで、相同組換え欠失が生じることを抑制することができる。例えば、８個のCasガイドRNA発現ユニットを搭載する場合、４個ずつの２つのユニットに分割することで、それぞれのユニットの間の距離を十分に広く取ることができる。これにより、独立した２つのユニットとなり、相同組換え欠失が生じることを抑制することができると考えられる。

また、例えば、４個のCasガイドRNA発現ユニットをE１領域とE４領域にそれぞれ組み込んだ場合は、非常に距離が離れているにもかかわらず相同組み換えが起きたとしても、この間にあるウイルスゲノムの大半を占める配列はウイルス増殖に必要であるため、これを失ったウイルスゲノム分子は自立増殖できないと考えられる。すなわち相同組み換えが抑制されたのではなく、相同組み換え分子が増殖できないために、相同組換え欠失が生じることが抑制されたように見えるという可能性も考えられる。

[0081] 前記CasガイドRNA発現ユニットは、当該CasガイドRNAをコードするDNA以外に、プロモーターなどその発現を調節する発現調節領域等を含むことができる。前記プロモーターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、U6プロモーター、H1プロモーター、tRNAプロモーター、アデノウイルスVAプロモーターなどが挙げられる。前記プロモーターの中でも、後述する短縮U6プロモーター（配列番号８８）が好ましい。

[0082] 通常、ベクターに複数のガイドRNA発現ユニットを含ませる場合、これ

らは同じ転写方向になるように隣接してタンデムに配置される。

[0083] 前記C a sガイドRNAの標的としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒトパピローマウイルス（HPV）、B型肝炎ウイルス（HBV）などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0084] また、前記C a sガイドRNA発現ユニットは、1種類の遺伝子を標的とするものであってもよいし、2種類以上の遺伝子を標的とするものであってもよい。

[0085] 多くの癌において、細胞の癌化には2つ以上の異なる遺伝子変異が関与していることが明らかとなっており、ゲノム編集治療において2つ以上の遺伝子を同時に編集できる能力は、癌治療において極めて有益な結果をもたらすことが理解される。また、単一の遺伝子の複数の領域を欠失させることにより、より確実な遺伝子破壊を行うことも可能となる。

[0086] また、ウイルスは変異しやすいため、患者に感染しているウイルスのゲノムの塩基配列は患者によって異なる。患者に持続感染しているウイルスの場合は、一人の患者が持つウイルス集団のゲノムの塩基配列は同一ではなく、さまざまな変異を持つ集団であることが知られている。その結果、薬剤耐性を持つウイルスが選択的に増殖し、薬剤が効果を失う原因となっている。B型肝炎ウイルス（HBV）がその一例であるが、この現象は、HBVのみならず、他のウイルスあるいは細菌やマラリアなど、様々な病原体において観察され、特定の病原体に限定されない。

[0087] 従ってウイルスゲノムを標的とするベクターが多重にガイドRNAを発現する（多数の異なるガイドRNAを発現する）ことは、単に多数のウイルス必須部位を同時に破壊することにより治療効果を高めるだけでなく、（1）1つのベクター薬剤が変異ウイルスを持つ広範囲の患者のウイルスに効果をもつ広域薬剤となりうる、（2）一人の患者に持続感染している多様なウイルスのそれぞれを破壊するため残存ウイルスを減少させる、（3）ウイルスゲノム上の多数の部位を同時破壊することにより、ウイルスに変異により耐性を獲得する継代数を与えないため耐性ウイルスの出現を許さない、という

効果を奏すると理解される。

[0088] また、がんについても同様の効果が考えられる。すなわち、単にがん細胞の増殖を有利にする多数の細胞遺伝子を同時に破壊することにより治療効果を高めるだけでなく、（１）１つのベクター薬剤が異なるゲノム変異によりがん細胞化している異なる患者にも効果を持つことにより、広範囲の患者のがんに効果をもつ広域薬剤となりうる、（２）一人の患者のがんにおいても、異なるゲノム部位が変異し転移能を獲得したがん細胞や、逆に増殖が遅くなり薬剤抵抗性が増すがん細胞など、多様ながん細胞のそれぞれを破壊することができる可能性がある、（３）がん細胞のゲノム上の多数の変異部位を同時切断破壊することにより、がん細胞に変異により耐性を獲得する継代数を与えないため耐性がん細胞の出現を許さない、という効果を奏すると理解される。

[0089] また、前記ベクターは、遺伝性疾患の治療にも有用である。そのため、本発明は、本発明のベクターを含む医薬組成物にも関する。

前記遺伝性疾患としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、フェニルケトン尿症、オルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損症、カルバミルリン酸合成酵素（CPS）欠損症、メチルマロン酸血症、 α 1-アンチトリプシン欠損症などが挙げられる。

[0090] なお、後述するショートヘアピンRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクター、CasガイドRNA発現ユニットと、ショートヘアピンRNA発現ユニットとを有する組換えアデノウイルスベクターも同様の用途に好適に用いることができる。

[0091] ＜その他の構成＞

前記その他の構成としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、Casタンパク質発現ユニット、ドナーDNAユニットなどが挙げられる。

[0092] ＜＜Casタンパク質発現ユニット＞＞

前記Casタンパク質発現ユニットは、Casタンパク質をコードする遺

伝子を少なくとも含み、必要に応じて、プロモーター、ポリAなどのその他の構成を有する。

[0093] 前記Casタンパク質は、「CRISPR/Casシステム」を構成する、エフェクター分子として機能するタンパク質を及びその誘導体を意味する。例えば、「Casタンパク質」は、Cas9タンパク質、Cpf1タンパク質及びDNA切断活性を有するその変異体を意味する。一つの態様において、「Casタンパク質」はDNA2重鎖切断活性を有するCasヌクレアーゼである。一つの態様において、「Casタンパク質」はDNA2重鎖の片方の鎖のみを切断する活性を有するCasニッカーゼである。一つの態様において、CasニッカーゼはRuvCドメインに変異を有するCas9 (D10A) ニッカーゼ (Jinek et al., 2012, Science, 2012, Vol. 337, no 6096, pp. 816-821) であってもよい。

これらの中でも、Cas9ヌクレアーゼ、Cas9ニッカーゼが好ましく、Cas9ニッカーゼがより好ましい。

[0094] 前記プロモーターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、CBプロモーター (CB pro)、PGKプロモーター (PGK pro)、ヒトEF1 α プロモーター (「EFプロモーター」と称することがある。) などが挙げられる。これらの中でも、短縮されたEFプロモーター (配列番号87) (以下、「EFdプロモーター」と称することがある。) が好ましい。

[0095] 前記ポリAとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ウシ成長ホルモン由来のポリAなどが挙げられる。

[0096] Casタンパク質発現ユニットを配置する部位としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、E1領域、E3領域、E4領域などが挙げられる。これらの中でも、E4領域が好ましい。

前記Casタンパク質発現ユニットを配置する部位は、前記CasガイドRNA発現ユニットを配置する部位 (領域) と同じであってもよいし、異なる

っていてもよい。

[0097] <<ドナーDNAユニット>>

前記ドナーDNAユニットは、ノックインされるドナーDNA配列を少なくとも含み、必要に応じて、後述する左アーム配列、右アーム配列などのその他の構成を有する。

[0098] 前記ドナーDNA配列は、遺伝子をコードする配列であってもよいし、遺伝子をコードしない配列であってもよい。

[0099] 遺伝病治療などにおいて、異常遺伝子配列を正常遺伝子配列と置き換えるノックインが必要となるが、ノックインに用いるDNA断片は、異常配列の両側（上流及び下流）に、相同組換えに利用される正常塩基配列を有している。一般的にこれらの配列は左アーム配列（上流）及び右アーム配列（下流）と呼ばれている。

[0100] ドナーDNAユニットを配置する部位としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、E1領域、E3領域、E4領域などが挙げられる。

前記Casタンパク質発現ユニットを配置する部位は、前記CasガイドRNA発現ユニット及び前記Casタンパク質発現ユニットを配置する部位（領域）と同じであってもよいし、異なってもよい。

[0101] 前記CasガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターは、前記Casタンパク質発現ユニット及び前記ドナーDNAユニットの少なくともいずれかを更に搭載することにより、「一体型Casアデノウイルスベクター」（「オールインワン型Casアデノウイルスベクター」と称することもある。）とすることができる。

[0102] 「一体型Casアデノウイルスベクター」が含有する、CasガイドRNA発現ユニットと、Casタンパク質発現ユニットと、ドナーDNAユニットの数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

例えば、1コピーのCasタンパク質発現ユニットと共に、上記した4個

以上のC a sガイドRNA発現ユニットを含むことができる。一態様として、4個以上の単一ガイドRNA発現ユニットと、1個のC a sタンパク質発現ユニットを含む態様、2個以上のt r a c r RNA発現ユニットと、6個以上のc r RNA発現ユニットと、1個のC a sタンパク質発現ユニットを含む態様、4個以上のt r a c r RNA発現ユニットと、4個以上のc r RNA発現ユニットと、1個のC a sタンパク質発現ユニットを含む態様、6個以上のt r a c r RNA発現ユニットと、2個以上のc r RNA発現ユニットと、1個のC a sタンパク質発現ユニットを含む態様などが挙げられる。

[0103] また、前記ドナーDNAユニットを含む一体型C a s アデノウイルスベクターによれば、極めて高い効率で、当該ドナーDNA配列をゲノム上の特定の位置へ導入することができる。典型的には、当該一体型C a s ノックイン核酸ベクターはダブルニッキングを生じるための1組（2個）のC a s ガイドRNA発現ユニット、1つのドナーDNA配列及び1つのC a s タンパク質をコードする遺伝子から構成されるが、当該構成に限定されない。

[0104] 前記C a s ガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターの製造方法としては、特に制限はなく、公知の方法を目的に応じて適宜選択することができる。例えば、アデノウイルスゲノムDNAの一部を含むコスミドベクターに、前記C a s ガイドRNA発現ユニットと、必要に応じて前記その他の構成とを挿入した後、293細胞へトランスフェクションすることによって組換えアデノウイルスベクターを得る方法（完全長DNA導入法：Fukuda et al., Microbiol. Immunol., 2006, Vol. 50, pp. 463-454）により製造することができる。293細胞を用いた完全長DNA導入法を用いる場合、293細胞による培養期間としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、22日間、23日間、又は24日間以上継続されることが好ましい。

- [0105] 前記C a sガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターとして使用し得るアデノウイルスベクターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、上記した本発明の組換えアデノウイルスベクターを好適に用いることができる。
- [0106] 前記C a sガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターが、前記C a sタンパク質発現ユニットを有する場合、宿主細胞においてもC a sタンパク質のゲノム編集活性を生じ得るため、当該活性の生じにくい培養条件にて培養することが好ましい。また、当該C a sタンパク質の発現を抑制し得るような条件で培養することも望ましい。一態様において、当該培養細胞にC a sタンパク質の発現を抑制するs i RNAを発現するベクターを導入することで、C a sタンパク質の発現を抑制することができる。
- [0107] 前記C a sガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターは、前記C a sガイドRNA発現ユニットがダブルニッキングを誘導するように構成されたものであることが好ましい。
- [0108] 本発明において、C a sガイドRNA発現ユニットが「ダブルニッキングを誘導するように構成される」とは、少なくとも2個のC a sガイドRNA発現ユニットが、ゲノム上の近接する位置のセンス鎖及びアンチセンス鎖にそれぞれ一本鎖切断、すなわち「ニック」を誘導するように選択されており、それによりゲノムDNAの2本鎖が当該2つのニックの付近で切断されることを意味する。
- [0109] 本発明において、DNA上の2つの位置が「近接する位置」にあるとは、当該2つの位置の間に、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50塩基対が存在することを意味するが、これらに限定されない。

[0110] 前記C a sガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターは、少なくとも4つのダブルニッキングを誘導することで少なくとも4カ所のゲノム切断を起こすように構成されたものであることが好ましい。

[0111] 前記C a sガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターは、ゲノム上からノックダウンする配列の上流における近接した領域に、2つのダブルニッキングを誘導し、更に、該ノックダウンする配列の下流における近接した領域に、2つのダブルニッキングを誘導することで、該ノックダウンする配列をノックダウンするように設計されたものであることが好ましい。これにより、目的の配列を極めて安全かつ確実にノックダウンすることが可能となる。

[0112] 前記C a sガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターは、有効量を培養細胞に適用することでゲノム編集実験に用いることができる他、有効量をヒト以外の動物に投与することによるゲノム編集実験又は疾患治療、有効量をヒトに投与することによるゲノム編集疾患治療に適用することなどができる。

[0113] (ショートヘアピンRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクター)

本発明のショートヘアピンRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターは、少なくともベクターゲノム上で合計6個以上のショートヘアピンRNA発現ユニットを2カ所以上の部位に分割して有し、必要に応じて更にその他の構成を有する。

前記ショートヘアピンRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターは、動物細胞内で当該ショートヘアピンRNA発現ユニットを安定的に保持することができる。

[0114] <ショートヘアピンRNA発現ユニット>

前記ショートヘアピンRNA発現ユニットは、ショートヘアピンRNAを発現するためのDNA構成単位を意味する。

前記ショートヘアピンRNA発現ユニットは、ショートヘアピンRNAに

転写されるDNA核酸配列を含むものである。

[0115] 前記ショートヘアピンRNAとは、55～65塩基長のRNAである。前記ショートヘアピンRNAの構造は、21塩基の標的配列のセンス鎖と、9塩基のループ配列と、アンチセンス鎖と、終止ポリUとを有する構造である。前記ショートヘアピンRNAは、転写された後、ヘアピン構造を形成し、プロセッシングを受けてsiRNAとなるものである。

前記ループ配列及び終止ポリUの配列及び長さとしては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0116] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットのベクターゲノム上での配置としては、合計6個以上のショートヘアピンRNA発現ユニットを2カ所以上の部位に分割して配置する限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0117] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットのベクターゲノム上での合計個数としては、6個以上であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、又は21個以上などが挙げられる。これらの中でも、合計8個以上が好ましく、合計10個以上がより好ましく、合計12個以上がさらに好ましい。

[0118] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットを配置するベクター上の部位は、2カ所以上であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、アデノウイルスの必須領域の少なくとも一部を挟んだ2カ所以上の部位に分割して搭載されていることが好ましい。

[0119] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットは、前記アデノウイルスベクターのE1領域、E3領域、及びE4領域からなる群から選択される2カ所以上の部位に分割して搭載されていることが好ましい。

[0120] 1つの配置部位におけるショートヘアピンRNA発現ユニットの個数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、1

個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、又は11個以上などが挙げられる。これらの中でも、2個以上が好ましく、4個以上がより好ましく、6個以上が特に好ましい。

[0121] 1つの配置部位におけるショートヘアピンRNA発現ユニットの個数の上限（ショートヘアピンRNA発現ユニットの最多の連続数）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、4個が好ましい。

1つの部位におけるショートヘアピンRNA発現ユニットの個数の下限（ショートヘアピンRNA発現ユニットの最小の連続数）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、2個が好ましい。

[0122] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットを2カ所又は3カ所に分割して配置する場合の例としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、上記したCasガイドRNA発現ユニットと同様にして配置することができる。

[0123] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットは、上記したCasガイドRNA発現ユニットと同様に、前記ショートヘアピンRNAをコードするDNA以外に、プロモーターなどその発現を調節する発現調節領域等を含むことができる。

[0124] 通常、ベクターに複数のショートヘアピンRNA発現ユニットを含ませる場合、これらは同じ転写方向になるように隣接してタンデムに配置される。

[0125] 前記ショートヘアピンRNAをコードするDNAの配列としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0126] <その他の構成>

前記その他の構成としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ドナーDNAユニットなどが挙げられる。

[0127] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターの製造方法としては、特に制限はなく、公知の方法を目的に応じて適宜選択することができる。

[0128] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルス

ベクターとして使用し得るアデノウイルスベクターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、上記した本発明の組換えアデノウイルスベクターを好適に用いることができる。

[0129] (C a sガイドRNA発現ユニットと、ショートヘアピンRNA発現ユニットとを有する組換えアデノウイルスベクター)

本発明のC a sガイドRNA発現ユニットと、ショートヘアピンRNA発現ユニットとを有する組換えアデノウイルスベクターは、少なくともベクターゲノム上で、2個以上のC a sガイドRNA発現ユニットと、2個以上のショートヘアピンRNA発現ユニットとを有し、必要に応じて更にその他の構成を有する。

[0130] <C a sガイドRNA発現ユニット>

前記C a sガイドRNA発現ユニットは、上記したC a sガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターの項目に記載のC a sガイドRNA発現ユニットと同様である。

[0131] 前記C a sガイドRNA発現ユニットにおけるC a sガイドRNAの標的としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、セーフハーバー領域が好ましい。

[0132] 前記セーフハーバー領域とは、挿入された遺伝子が発現抑制を受けにくく、かつ欠損させても細胞に有害な影響を与えないことが知られている遺伝子領域のことをいう。

[0133] 前記セーフハーバー領域を標的とするC a sガイドRNAの配列としては、特に制限はなく、前記セーフハーバー領域の中から目的に応じて適宜選択することができる。

[0134] <ショートヘアピンRNA発現ユニット>

前記ショートヘアピンRNA発現ユニットは、上記したショートヘアピンRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターの項目に記載のショートヘアピンRNA発現ユニットと同様である。

[0135] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットにおけるショートヘアピンRN

Aの標的としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、Cypor mRNAが好ましい。

[0136] Cyporとは、NADPHからP450へ電子を伝達する酵素であるチトクロームP450レダクターゼである。

[0137] 前記Cypor mRNAを標的とするショートヘアピンRNAの配列としては、特に制限はなく、前記Cypor mRNAの中から目的に応じて適宜選択することができる。

[0138] 前記CasガイドRNA発現ユニットのベクターゲノム上での合計個数としては、2個以上であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、又は21個以上などが挙げられる。これらの中でも、合計2個以上が好ましく、合計4個以上がより好ましく、合計6個以上がさらに好ましく、合計8個以上が特に好ましい。

[0139] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットのベクターゲノム上での合計個数としては、2個以上であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、又は21個以上などが挙げられる。これらの中でも、合計2個以上が好ましく、合計4個以上がより好ましく、合計6個以上がさらに好ましく、合計8個以上が特に好ましい。

[0140] 前記CasガイドRNA発現ユニット及び前記ショートヘアピンRNA発現ユニットのベクターゲノム上での配置としては、2個以上のCasガイドRNA発現ユニットと、2個以上のショートヘアピンRNA発現ユニットとを有する限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、1カ所の部位にまとめて配置してもよいし、2カ所以上の部位に分割して配置してもよい。

[0141] 前記CasガイドRNA発現ユニット及び前記ショートヘアピンRNA発

現ユニットを配置するベクター上の部位としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記アデノウイルスベクターのE 1 領域、E 3 領域、及びE 4 領域からなる群から選択される1カ所以上の部位に配置することが好ましい。

[0142] 前記CasガイドRNA発現ユニット及び前記ショートヘアピンRNA発現ユニットを2カ所以上の部位に分割して配置する場合のベクター上の部位としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、アデノウイルスの必須領域の少なくとも一部を挟んだ2カ所以上の部位に分割して搭載されていることが好ましい。

[0143] 前記CasガイドRNA発現ユニット及び前記ショートヘアピンRNA発現ユニットを2カ所以上の部位に分割して配置する場合、前記CasガイドRNA発現ユニット及び前記ショートヘアピンRNA発現ユニットは、前記アデノウイルスベクターのE 1 領域、E 3 領域、及びE 4 領域からなる群から選択される2カ所以上の部位に分割して搭載されていることが好ましい。

[0144] 1つの配置部位におけるCasガイドRNA発現ユニット及びショートヘアピンRNA発現ユニットの合計個数としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、又は11個以上などが挙げられる。これらの中でも、合計2個以上が好ましく、合計4個以上がより好ましく、合計6個以上がさらに好ましく、合計8個以上が特に好ましい。

[0145] 1つの配置部位におけるCasガイドRNA発現ユニットの個数の上限（CasガイドRNA発現ユニットの最多の連続数）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、6個が好ましく、8個がより好ましい。

1つの部位におけるCasガイドRNA発現ユニットの個数の下限（CasガイドRNA発現ユニットの最小の連続数）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、2個が好ましい。

[0146] 1つの配置部位におけるショートヘアピンRNA発現ユニットの個数の上

限（ショートヘアピンRNA発現ユニットの最多の連続数）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、4個が好ましい。

1つの部位におけるショートヘアピンRNA発現ユニットの個数の下限（ショートヘアピンRNA発現ユニットの最小の連続数）としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、2個が好ましい。

[0147] 前記CasガイドRNA発現ユニット及び前記ショートヘアピンRNA発現ユニットを2カ所又は3カ所に分割して配置する場合の例としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、上記したCasガイドRNA発現ユニットと同様にして配置することができる。

[0148] <その他の構成>

前記その他の構成としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、上記したCasガイドRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクター、ショートヘアピンRNA発現ユニットを有する組換えアデノウイルスベクターの項目に記載したその他の成分と同様のものなどが挙げられる。

[0149] 前記CasガイドRNA発現ユニットと、ショートヘアピンRNA発現ユニットとを有する組換えアデノウイルスベクターの製造方法としては、特に制限はなく、公知の方法を目的に応じて適宜選択することができる。

[0150] 前記CasガイドRNA発現ユニットと、ショートヘアピンRNA発現ユニットとを有する組換えアデノウイルスベクターとして使用し得るアデノウイルスベクターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、上記した本発明の組換えアデノウイルスベクターを好適に用いることができる。

実施例

[0151] 以下、本発明の試験例等を説明するが、本発明は、これらの試験例等に何ら限定されるものではない。

[0152] （試験例1：HPV16標的ガイドRNAの選定）

本試験例の概要は、以下の通りである。

[1] E6E7遺伝子を含むLCRからE1領域の内、ダブルニッキング可能なガイドRNA (gRNA) 候補105個について検討した。図1にHPV16の遺伝子の構造を示す。

[2] 当初有望と考えた39個については試験管内における切断効率を調べた。

[3] 当初有望と考えた24個についてSiHa細胞内にレトロウイルスで発現させ、Cas9ニッカーゼを発現するアデノウイルス (CB-NC9) を感染させることで細胞増殖抑制効果を検討した。

[4] 上記[2] 及び[3]、並びにSNPの有無を参考に20組の有望なダブルニッキングgRNAを発現するレンチウイルスベクターを作製した。

[5] 上記4で作製したレンチウイルスをHPV16陽性子宮頸がん細胞株SiHaに単独感染あるいは重感染させることで、1～5組 (2～10個) のgRNAを発現するSiHa細胞を樹立した。

[6] 上記5で作製した細胞にアデノウイルス (CB-NC9) を感染させることで細胞増殖抑制効果を検討した。

[7] 上記6の結果の再現性をHPV16陽性中咽頭がん細胞株SCC90で確認すると共に、N5～N7 (後述参照) についてはSiHa細胞内のHPV16ゲノムにSNPがあるためSCC90でその優劣を評価した。方法は上記5と同じ方法を用いた。

[0153] [1]

E6E7遺伝子を含むLCRからE1領域の内、ダブルニッキング可能なガイドRNA (gRNA) 候補105個をリストアップした。これらについて、NCBIに登録されているHPV16のバリエーションの系統 (A-D) のサブ系統 (A1、A2、A3、A4、B1、B2、C、D1、D2、D3) の配列と、SiHaなどHPV16陽性がん細胞中のHPV16の配列を並べてSNP (single nucleotide polymorphism) の有無を調べた。

[0154] ＜ダブルニッキング切断＞

野生型 Cas 9 では、1 個の Cas 9 がオンターゲット部位（目的の標的的部位）、オフターゲット部位を切断する（図 2 の左上、右上）。

Cas 9 ニッカーゼによる切断では、オンターゲット部位（標的的部位）においては 2 つのニッカーゼが近接した表鎖と裏鎖にニックをいれて切断する（図 2 の左下）。一方オフターゲット部位では、1 つの Cas ニッカーゼがニックを入れるだけなので、ニックは直ちに修復され切断は起こらない（図 2 の右下）。そのため、ダブルニッキング切断は安全といえる。

[0155] [2] 及び [3]

上記でリストアップした 105 個の gRNA 候補のうち、下記のうちの 39 個の gRNA 候補について、試験管内における切断効率を調べた。具体的には、gRNA 配列を有する crRNA と、tracrRNA とを合成し、これらと基質 HPV 16 の DNA を混ぜ、Cas 9 蛋白を加え切断効率を調べた。結果を図 3 ～図 5 に示す。各図中、gRNA 候補の名称は「16__」を省略して記載した。

なお、下記の切断効率の結果は、2 回の試験の結果（1 回目、2 回目）について、○（切断効率：優）、△（切断効率：良）、×（切断効率：可）をそれぞれ記載した。

[0156] 上記でリストアップした 105 個の gRNA 候補のうち、下記のうちの 24 個の gRNA 候補について、シングル gRNA 発現レトロウイルス導入と野生型 Cas 9 による SiHa 細胞の増殖抑制活性を調べた。下記の増殖抑制活性の結果は、モック（mock）を 100% としたときの SiHa 細胞の増殖を示す。

[0157] ＜結果＞

＜＜gRNA 候補＞＞

(1) 16__AS57G

標的配列 : GCTTTTATACTAACCGGTTT (配列番号 30)

切断効率の結果 : △、×

増殖抑制活性 : 75%

SNP : - (なし、以下同様)

(2) 16__AS63g+

標的配列 : gATGTCTGCTTTTATACTAAC (

配列番号31)

切断効率の結果 : ○、△

増殖抑制活性 : 68%

SNP : -

(3) 16__S107g

標的配列 : gAAGAGAACTGCAATGTTTC (配

列番号54)

増殖抑制活性 : 86%

SNP : C/UM-SCC-47

(4) 16__S107g+

標的配列 : gAAGAGAACTGCAATGTTTC (

配列番号32)

切断効率の結果 : △、×

SNP : C/UM-SCC-47

(5) 16__S116g+

標的配列 : gTGCAATGTTTCAGGACCCAC (

配列番号33)

切断効率の結果 : ○、△

SNP : C/UM-SCC-47

[0158] (6) 16__AS434g+

標的配列 : gTGCTTTTCTTCAGGACACAG (

配列番号34)

切断効率の結果 : ○、△

SNP : D3, SiHa

(7) 16__AS443g+

標的配列 : gAGATGTCTTTGCTTTTCTTC (

配列番号2)

切断効率の結果 : O、×

増殖抑制活性 : 60%

SNP : SiHa

(8) 16__S484g+

標的配列 : gAGCAAAGATTCCATAATATA (

配列番号35)

切断効率の結果 : △、O

SNP : -

(9) 16__S485G

標的配列 : GCAAAGATTCCATAATATAA (配

列番号36)

切断効率の結果 : O、O

増殖抑制活性 : 76%

SNP : -

(10) 16__S486G+

標的配列 : GCAAAGATTCCATAATATAAG (

配列番号37)

切断効率の結果 : O、O

増殖抑制活性 : 20%

SNP : -

(11) 16__S490G

標的配列 : GATTCCATAATATAAGGGGT (配

列番号1)

切断効率の結果 : O、O

増殖抑制活性 : 16%

SNP : —

(12) 16__S493g

標的配列 : gCCATAATATAAGGGGTCTGG (配
列番号55)

増殖抑制活性 : 16%

SNP : —

(13) 16__S493g+

標的配列 : gTCCATAATATAAGGGGTCTGG (配
列番号38)

切断効率の結果 : ○、△

SNP : —

(14) 16__S498g+

標的配列 : gAATATAAGGGGTCTGGTGGAC (配
列番号39)

切断効率の結果 : ○、△

SNP : —

(15) 16__S498g

標的配列 : gATATAAGGGGTCTGGTGGAC (配
列番号56)

増殖抑制活性 : 12%

SNP : —

[0159] (16) 16__AS507G

標的配列 : GCAACAAGACATACATCGAC (配
列番号8)

切断効率の結果 : ○、△

増殖抑制活性 : 13%

SNP : —

(17) 16__S563g+

標的配列 : gAACCCAGCTGTAATCATGCA (

配列番号7)

切断効率の結果 : ○、○

増殖抑制活性 : 10%

SNP : -

(18) 16__S563g

標的配列 : gACCCAGCTGTAATCATGCA (配

列番号57)

増殖抑制活性 : 12%

SNP : -

[0160] (19) 16__AS616g+

標的配列 : gCAGTAGAGATCAGTTGTCTC (

配列番号58)

増殖抑制活性 : 25%

SNP : -

[0161] (20) 16__AS688G+

標的配列 : GCCGGTTCTGCTTGTCCAGC (配

列番号40)

切断効率の結果 : △、○

増殖抑制活性 : 75%

SNP : -

(21) 16__S697g

標的配列 : gCCGGTTCTGCTTGTCCAGC (配

列番号59)

増殖抑制活性 : 64%

SNP : -

(22) 16__AS706g+

標的配列 : g A T A T T G T A A T G G G C T C T G T C (配列番号 1 1)

増殖抑制活性 : 7 5 %

S N P : -

(2 3) 1 6 _ _ A S 7 0 6 g

標的配列 : g T A T T G T A A T G G G C T C T G T C (配列番号 6 0)

切断効率の結果 : ○、△

増殖抑制活性 : 2 6 %

S N P : -

(2 4) 1 6 _ _ A S 7 1 7 g +

標的配列 : g A A A A G G T T A C A A T A T T G T A A (配列番号 4)

切断効率の結果 : △、△

S N P : -

(2 5) 1 6 _ _ A S 7 1 7 g

標的配列 : g A A A G G T T A C A A T A T T G T A A (配列番号 6 1)

増殖抑制活性 : 2 6 %

S N P : D 2 , D 3 (た だ し 5 ' - 末 端 側)

(2 6) 1 6 _ _ S 7 5 3 G

標的配列 : G C A A G T G T G A C T C T A C G C T T (配列番号 3)

切断効率の結果 : △、△

増殖抑制活性 : 1 5 %

S N P : -

[0 1 6 2] (2 7) 1 6 _ _ A S 8 1 0 g

標的配列 : g T C C T A G T G T G C C C A T T A A C (配

列番号62)

増殖抑制活性 : 68%

SNP : -

(28) 16__AS840g+

標的配列 : gATGGTTTCTGAGAACAGATG (

配列番号10)

切断効率の結果 : △、△

SNP : A4/QG-U/SCC90/SKGIIIIb

(29) 16__AS841g+

標的配列 : gTATGGTTTCTGAGAACAGAT (

配列番号41)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : A4/QG-U/SCC90/SKGIIIIb

(30) 16__AS842g+

標的配列 : gTTATGGTTTCTGAGAACAGA (

配列番号42)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : A4/QG-U/SCC90/SKGIIIIb

[0163] (31) 16__AS859G

標的配列 : GGATCAGCCATGGTAGATTA (配

列番号13)

切断効率の結果 : △、△

増殖抑制活性 : 53%

SNP : -

[0164] (32) 16__AS869G

標的配列 : GGTACCTGCAGGATCAGCCA (配

列番号43)

切断効率の結果 : ×、×

SNP : -

(33) 16__AS880g

標的配列 : gCTTCCCCATTGGTACCTGC (配
列番号63)

増殖抑制活性 : 24%

SNP : -

(34) 16__S884G

標的配列 : GCTGATCCTGCAGGTACCAA (配
列番号9)

切断効率の結果 : ×、×

SNP : A4

(35) 16__S893G

標的配列 : GCAGGTACCAATGGGGAAGA (配
列番号12)

切断効率の結果 : ○、○

増殖抑制活性 : 48%

SNP : -

(36) 16__S908G

標的配列 : GAAGAGGGTACGGGATGTAA (配
列番号44)

切断効率の結果 : △、△

SNP : A4

[0165] (37) 16__AS1192g+

標的配列 : gATACATATAGCTTTTAATCT (配
列番号45)

切断効率の結果 : ×、×

SNP : B1, C, D, SiHa

(38) 16__S1230g+

標的配列 : g A A C A A A G T A G A G C T G C A A A A (配列番号 4 6)

切断効率の結果 : ○、△

S N P : D 1

[0166] (3 9) 1 6 _ _ A S 1 4 3 8 g +

標的配列 : g A C A T T T T A A A A T A T T T T G T A A G (配列番号 1 5)

切断効率の結果 : ○、○

S N P : -

(4 0) 1 6 _ _ S 1 4 7 1 g +

標的配列 : g A C T A A A A A C T A G T A A T G C A A (配列番号 1 4)

切断効率の結果 : ○、△

S N P : C

[0167] (4 1) 1 6 _ _ A S 1 5 4 3 G

標的配列 : G T T G A T T T T A T T A C T T T T T A A A (配列番号 6)

切断効率の結果 : ○、△

S N P : -

(4 2) 1 6 _ _ S 1 5 8 3 G

標的配列 : G A T T G G T G T A T T G C T G C A T T (配列番号 5)

切断効率の結果 : ○、×

S N P : -

[0168] (4 3) 1 6 _ _ A S 1 4 3 4 g +

標的配列 : G G A A G C T A C A A A A T G G G C C T G (配列番号 4 7)

切断効率の結果 : ○、△

SNP : A1, B2, C, CaSki

(44) 16__AS1741g+

標的配列 : gTTCGGTTGAAGCTACAAAAT (配列番号48)

切断効率の結果 : ○、△

SNP : B2, C

(45) 16__S7470g

標的配列 : gGAATTTCGGTTGCATGCTTT (配列番号49)

切断効率の結果 : ○、△

SNP : C

[0169] (46) 16__AS7668G

標的配列 : GGCCTAACAGCGGTATGTAA (配列番号50)

切断効率の結果 : △、△

SNP : B, D

(47) 16__S7739g+

標的配列 : gTAACTAACCTAATTGCATAT (配列番号51)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : A3, A4, D (D3は2カ所)

[0170] (48) 16__AS7774G

標的配列 : GACTAGGGTGACATTTAGTT (配列番号52)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : A4, B, C, D

(49) 16__S7804G+

標的配列 : GGTTTCATACATGAACGTGTGTA (

配列番号 53)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

[0171] [4]

上記 [2] 及び [3]、並びに SNP の有無を参考に 16 組の有望なダブルニッキング gRNA を発現するレンチウイルスベクター (2 つの gRNA 発現ユニットと 1 つの薬剤耐性遺伝子発現ユニットをもつレンチウイルスベクター) を下記のようにして作製した。

[0172] 2 つの gRNA 発現ユニットと 1 つの薬剤耐性遺伝子発現ユニットをレンチウイルスベクターに配置するため、3 つのエントリーベクターを作製した。

- 1) レンチウイルスベクター (CSII-RfA ベクター) (attR1-ccdB-attR2 デスティネーションベクター)
- 2) センス鎖 gRNA 発現カセットプラスミド (attL4-U6-gRNA-attL1 エントリーベクター)
- 3) アンチセンス鎖 gRNA 発現カセットプラスミド (attR4-r-U6-gRNA-attR3r エントリーベクター)
- 4) 薬剤耐性遺伝子発現カセットプラスミド (attL3-PGK-薬剤耐性遺伝子-attL2 エントリーベクター)

[0173] 1) レンチウイルスベクター (CSII-RfA ベクター) (attR1-ccdB-attR2 デスティネーションベクター) の作製

本実験に用いたレンチウイルスベクター (CSII-RfA ベクター) は、RIKEN BRC の三好浩之が開発した CSII-EF-RfA (RDB04387; https://dnaconda.riken.jp/search/RDB_clone/RDB04/RDB04387.html) の EF プロモーターを AgeI (nt2668 と 3760) で切断することにより除き、セルフライゲーションにより、CSII-RfA ベクターを作製した。

CSII-RfAベクターは、外来遺伝子挿入部位にRfA配列をもちGatewayシステム(ThermoFisher Scientific)のLR組み換え反応によりインサートを挿入できる。

[0174] 2) センス鎖gRNA発現カセットプラスミド(attL4-U6-gRNA-attL1エントリーベクター)の作製

<U6-gRNAエントリーベクター>

gRNA発現カセットは、gRNA-GFP-T2(Addgene #41820; Mali et al., Science 2013 339: 823-826)を改変して作製した。

U6プロモーターの3'端10塩基とgRNA配列までの6塩基の計16塩基(5'-tggaaggacgaaaca-3'(配列番号64))を突然変異により5'-atgagaccactctttc-3'(配列番号65)に置換した後、U6プロモーターからgRNAスカホールド配列をattB4配列とattB1配列を含むプライマーを用いPCRにより増幅し、BP組み換え反応(ThermoFisher Scientific)によりpDONR221-P1-P4(ThermoFisher Scientific)に挿入し、L1-U6-gRNA-GFP-T2-L4発現カセットプラスミドを作製した。U6-gRNA-GFP-T2の配列は、下記のとおりである。

gagggcctattttcccatgattccttcataatttgc
atatacgatacaaggctgttagagagataattag
aattaattttgactgtaaacacaaagataattagta
caaaatacgtgacgtagaaagtaataattttcttg
ggtagttttgcagtttttaaaattatgtttttaaaat
ggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatt
ttcgattttcttggctttatatatcttgATgaGaC
CacTCTTTCccggagcgcaccatcttcttccagtt
ttagagctagaaatagcaagttaaaataaggcta

g t c c g t t a t c a a c t t g a a a a a g t g g c a c c g a g t c
g g t g c t t t t t t t t (配列番号66)

配列番号66中、1～241番目の塩基は置換後（下線で示す）の「U6プロモーター」であり、250～269番目の塩基は「標的配列（GFP-T2）」であり、270～345番目の塩基は「gRNAスカホールド配列」であり、346～352番目の塩基は「t t t t t 転写終結シグナル」である。

L1-U6-gRNA-GFP-T2-L4発現カセットプラスミドを目的のgRNA配列をもつプライマーセットによるPCRとin fusion反応（TAKARA Bio）による突然変異により目的のgRNA配列を有するL4-U6-gRNA-L1カセットを有するエントリーベクタープラスミドを作製した。

in fusion反応は、PCRで得られた線状DNA（50～100 ng／8 μL）に5×In-Fusion HD Enzyme Premix（TAKARA In-Fusion HD Cloning Kit, cat #639648）を2 μL加え、50℃で15分インキュベートする。これにより、線状DNAの両端にある共通重複配列部分で整復され環状DNAが生成される。

[0175] <L4-U6-gRNA-L1エントリーベクター>

標的配列とプライマー結合配列からなる1組のプライマーセットによりattL4-attL1カセットを含むプラスミドを増幅し、in fusion反応（TAKARA Bio）により新たな標的配列部分でオーバーラップする配列で環状化し、新たな標的配列を含むattL4-attL1カセットプラスミドを得た。

一例として、L1-U6-S893G-L4カセットプラスミドにおけるattL4-attL1カセットの配列を下記に示す。

AAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGTGACCTG
TTCGTTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTCTT

ATAATGCCAACTTTGTATAGAAAAGTTGGGTGaa
ttcGAGGgcctatttcccatgattccttcataatt
tgcatatacgatacaaggctgttagagagataaat
tagaattaatTTgactgtaaacacaaagataatta
gtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttc
ttgggtagtttgcagttttaaaattatgtttttaa
aatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaag
tatttcgatttcttggctttatatatcttgatga
gaccactctttcccGCAGGTACCAATGGGGAAGA
gttttagagctagaaatagcaAGttaaaataagg
ctagtccgttatcaacttgaaaaagTGGCACCGA
GTCGGTGCTTTTTTTTaagcttAGCCTGCTTTTTTTG
TACAAAGTTGGCATTATAAAAAAGCATTGCTCAT
CAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCA
AAATAAAAATCATTATTTTG (配列番号67)

配列番号67中、1～96番目の塩基は「attL4」であり、106～336番目は「U6プロモーター」であり、337～354番目の塩基は「リバーズ(R)プライマー結合配列」であり、355～374番目の塩基は「gRNA標的配列」であり、375～395番目の塩基は「フォワード(F)プライマー結合配列」であり、396～450番目の塩基は「gRNAスカフォールド配列」であり、451～456番目の塩基は「転写終結シグナル」であり、463～562番目の塩基は「attL1」である。

カセットの配列はM13Fプライマー(5'-TGTA AACGACG GCCAGT-3' (配列番号68))ならびにM13Rプライマー(5'-CAGGA AACAGCTATGACC-3' (配列番号69))を用いたサンガーシーケンスにより正しいことを確認した。

[0176] 3) アンチセンス鎖gRNA発現カセットプラスミド(attR4r-U6-gRNA-attR3rエントリーベクター)の作製

標的配列とプライマー結合配列からなる1組のプライマーセットにより attR4 r-attR3 rカセットを含むプラスミドを増幅し、in-fusion反応 (TAKARA Bio) により新たな標的配列部分でオーバーラップする配列で環状化し、新たな標的配列を含む attR4 r-attR3 rカセットプラスミドを得た。in-fusion反応は、PCRで得られた線状DNA (50~100 ng/8 μ L) に5×In-Fusion HD Enzyme Premix (TAKARA In-Fusion HD Cloning Kit, cat#639648) を2 μ L加え、50℃で15分インキュベートする。これにより、線状DNAの両端にある共通重複配列部分で整復され環状DNAが生成される。

一例として、R4 r-U6-AS859G-R3 rカセットプラスミドにおける attR3 r-attR4 rカセットの配列を下記に示す。

```
CATAGTGACTGGATATGTTGTGTTTTACAGTATT  
ATGTAGTCTGTTTTTTTATGCAAAATCTAATTTTAA  
TATATTGATATTTATATCATTTTACGTTTCTCGT  
TCAACTTTATTATACAAAGTTGTgaattcGAGGg  
cctatttcccatgattccttcataatttgcatata  
cgatacaaggctgttagagagataattagaattta  
atttgactgtaaacacaaagataattagtacaaaa  
tacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtag  
tttgtagtttttaaaattatgtttttaaaatggact  
atcataatgcttacccgtaacttgaaagtatttcga  
tttcttggctttatataatcttgatgagaccactc  
tttcccGGATCAGCCATGGTAGATTAgtttttaga  
gctagaaatagcaAGttaaaataaggctagtccg  
ttatcaacttgaaaaagTGGCACCGAGTCGGTGC  
TTTTTTAagcttCAACTTTGTATAGAAAAGTTGA  
ACGAGAAACGTAAAATGATATAAATATCAATATA
```

TTAAATTAGATTTTGCATAAAAAACAGACTACAT
AATACTGTAAACACAACATATCCAGTCACTATG
(配列番号70)

配列番号70中、1～124番目の塩基は「attR3r」であり、132～362番目は「U6プロモーター」であり、363～380番目の塩基は「リバーズ(R)プライマー結合配列」であり、381～400番目の塩基は「gRNA標的配列」であり、382～421番目の塩基は「フォワード(F)プライマー結合配列」であり、422～476番目の塩基は「gRNAスカフォールド配列」であり、477～482番目の塩基は「転写終結シグナル」であり、488～612番目の塩基は「attR4r」である。

カセットの配列はM13Fプライマー(5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'(配列番号68))ならびにM13Rプライマー(5'-CAGGAACAGCTATGACC-3'(配列番号69))を用いたサンガーシーケンスにより正しいことを確認した。

[0177] 4) 薬剤耐性遺伝子発現カセットプラスミド(attL3-PGK-薬剤耐性遺伝子-attL2エントリーベクター)の作製

薬剤耐性遺伝子発現カセットをもつレトロウイルスベクター(pCMSCVneo、pCMSCV puro、pCLMSCVhyg'、pEF6-MYC-His-A、pCMSCV-EM7zeo)より、PGKプロモーターから薬剤耐性遺伝子配列までを、attB3配列を含むプライマーとattB2配列を含むプライマーを用いPCRで増幅し、pDONR221 P3-P2とゲートウェイ法(ThermoFisher Scientific)によりBP組み換え反応を行い、薬剤耐性遺伝子発現カセットを含むattL3-attL2カセットプラスミドを作製した。

attL3-attL2カセットの配列は、下記のとおりである。なお、下記配列では、薬剤耐性遺伝子の例として、ハイグロマイシン耐性遺伝子を記載している。

AAATAATGATTTTATTTTGACTGATAGTGACCTG

TTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTT
ATAATGCCAACTTTGTATAATAAAGTTGagatct
aat t c t a c c g g g t a g GGGAGGCGCTTTTTCCCAAG
GCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTG
GgCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTC
GCACACATTCCACATCCACCGGTAGgCGCCAACC
GGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTTCGCGCCACcT
TCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTcCCCCCcG
Ccccg c AGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAAT
GGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATG
GACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCC
TTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGcTCCTT
CGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGG
TCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCG
GGgCGGGCGCCCGAAGGTCCTCCgGAGGCCCGGC
ATTCTGCACGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCGCG
CTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCCGGGGCCTTTTCGA
CCTGCATCCCGCCACCATGAAAAAGCCTGAACTC
ACCGCGACGTCTGTGAGAAAGTTTCTGATCGAAA
AGTTGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTC
GGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTTCAGCTTCGAT
GTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAATA
GCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGT
TTATCGGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATT
CCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTCAGCGAGA
GCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGG
TGTCACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTG
CCCGCTGTTCTGCAGCCGGTCGCGGAGGCCATGG

ATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAG
CGGGTTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGT
CAATACACTACATGGCGTGATTTTCATATGCGCGA
TTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGT
GATGGACGACACCGTCAGTGCGTCCGTGCGCGCAG
GCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACT
GCCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTT
CGGCTCCAACAATGTCCTGACGGACAATGGCCGC
ATAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGAGGCGATGT
TCGGGGATTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCTT
CTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAG
CAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGC
TTGCAGGATCGCCGCGGCTCCGGGGCGTATATGCT
CCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTG
GTTGACGGCAATTTTCGATGATGCAGCTTGGGGCGC
AGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGC
CGGGACTGTCGGGGCGTACACAAATCGCCCCGCAGA
AGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAG
TACTCGCCGATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCAC
TCGTCCGAGGGCAAAGGAA t a a TACCCAGCTTTTC
TTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCT
TATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAG
TCAAAATAAAAATCATTATTTG (配列番号71)

配列番号71中、1～111番目の塩基は「attL3」であり、112～611番目は「PGKプロモーター」であり、629～1,654番目の塩基は「ハイグロマイシン耐性遺伝子(Hyg)」であり、1,655～1,755番目の塩基は「attL2配列」である。

[0178] ダブルニッキングgRNAを発現するレンチウイルスベクターの作製

ダブルニッキング gRNA を発現するレンチウイルスベクターの作製法として、「H1」（センス鎖：16__S893G、アンチセンス鎖：16__AS859G、後述参照）を例として、説明する。

HPV のセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセットとして「L1-U6-16__S893G-L4」、HPV のアンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセットとして「R4r-U6-16__AS859G-R3r」、及び薬剤耐性遺伝子発現カセットとして「L3-PGK-Hyg-L2」の 3 つをマルチサイトゲートウェイ LR 反応（ThermoFisher scientific 社）によりプロモーターレスレンチウイルスベクター（CSII-RfA）に組み換え導入し、2 つの gRNA と薬剤耐性遺伝子を発現するレンチウイルスベクター（H1：16S893G-AS859G）を作製した。

LR 反応ではデスティネーションベクターと 3 種類のエントリーベクター（上記 1）～4））を各 50～150 ng 混合し 8 μ L とし、LR クロナーゼ™ II 酵素ミックス（ThermoFisher Scientific、cat # 11791）を 2 μ L 加え、25℃で 1 時間インキュベーションする。次いで 1 μ L の Proteinase K 溶液を加え 37℃で 10 分間インキュベーションする。

これにより、（attL-遺伝子-attL）と attR サイトを持つデスティネーションベクターとの間の in vitro 組換え反応を触媒し、attB サイトを持つ発現クローンを生成する。

具体的には下記の反応により目的の発現ベクターが生成される。

$$\begin{aligned} & \text{attR1-ccdB-attR2} \times \text{attL4-U6-gRNA-} \\ & \text{attL1} \times \text{attR4r-U6-gRNA-attR3r} \times \text{attL3-PGK-薬剤耐性遺伝子-attL2} \rightarrow \text{attB1-gRNA-} \\ & \text{U6-attB4-gRNA-U6-attB3-PGK-薬剤耐性遺伝子-attB2（発現ベクター）} \end{aligned}$$

組み換えを起こす attR と attL の組合せは、attR1 と attL

1、attL4とattR4r、attR3rとattL3、attL2とattR2となる。

なお、薬剤耐性遺伝子の転写方向とgRNAの転写方向は逆向きになるよう配置されている。

[0179] 以下に、作製したHPV16を標的とする2つのgRNA発現ユニットと、1つの薬剤耐性遺伝子発現ユニットをもつレンチウイルスベクターを示す。

NCBIに登録されているHPV16のバリエーションの系統（A-D）のサブ系統（A1、A2、A3、A4、B1、B2、C、D1、D2、D3）の配列とSiHaなどHPV16陽性がん細胞中のHPV16の配列を並べて2つ以上のサブ系統で5'側18塩基のコア配列内にSNPを含むものを除外した。

[0180] 標的配列名の命名法は、以下のとおりである。

「16__」： HPV16を標的とすることを示す。

「S」： センス鎖を標的配列とすることを示す。

「AS」： アンチセンス鎖を標的配列とすることを示す。

「数字」： 推定切断端（5'ーオーバーハング端）のHPV16プロトタイプ配列（GenBank K02718.1）の位置を示す。

「G」： 20塩基を標的配列とし、5'端のGが標的配列と一致する。

「G+」： 21塩基を標的配列とし、5'端のGが標的配列と一致する。

「g」： 20塩基を標的配列とし、5'端のgは標的配列と一致しない。

「g+」： 21塩基を標的配列とし、5'端のgは標的配列と一致しない。

「gA+」： は22塩基を標的配列とし、5'端のgは標的配列と一致しない。

下記標的配列中の5' 端に小文字の「g」の記載がある場合、この「g」はU6 プロモーターからの転写開始のために付加したものである。

[0181] <薬剤耐性遺伝子がG418耐性遺伝子のベクター>

(1) N1

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S107gA+

標的配列 : gAAAAGAGAACTGCAATGTTTC

(配列番号73)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS57G

標的配列 : GCTTTTATACTAACCGGTTT (配

列番号30)

(2) N2

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S107g+

標的配列 : gAAAGAGAACTGCAATGTTTC (

配列番号32)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS57G

標的配列 : GCTTTTATACTAACCGGTTT (配

列番号30)

(3) N3

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S116g+

標的配列 : gTGCAATGTTTTCAGGACCCAC (

配列番号33)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS57G

標的配列 : GCTTTTATACTAACCGGTTT (配
列番号30)

(4) N4

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S107g+

標的配列 : gAAAGAGAACTGCAATGTTTC (配
列番号32)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS63g+

標的配列 : gATGTCTGCTTTTATACTAAC (配
列番号31)

(5) N5

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S490G

標的配列 : GATTCCATAATATAAGGGGT (配
列番号1)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS443g+

標的配列 : gAGATGTCTTTGCTTTTCTTC (配
列番号2)

(6) N6

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S485G

標的配列 : GCAAAGATTCCATAATATAA (配
列番号36)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS443g+

標的配列 : gAGATGTCTTTGCTTTTCTTC (

配列番号 2)

(7) N 7

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ S 4 8 6 G

標的配列 : G C A A A G A T T C C A T A A T A T A A G (

配列番号 7 2)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ A S 4 4 3 g +

標的配列 : g A G A T G T C T T T G C T T T T C T T C (

配列番号 2)

(8) N 8

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ S 5 6 3 g +

標的配列 : g A A C C C A G C T G T A A T C A T G C A (

配列番号 7)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ A S 5 0 7 G

標的配列 : G C A A C A A G A C A T A C A T C G A C (配

列番号 8)

[0182] <薬剤耐性遺伝子が B s d S 耐性遺伝子のベクター>

(9) B 1

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ S 5 6 3 g +

標的配列 : g A A C C C A G C T G T A A T C A T G C A (

配列番号 7)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ A S 5 0 7 G

標的配列 : G C A A C A A G A C A T A C A T C G A C (配

列番号 8)

(10) B2

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S563g

標的配列 : gACCCAGCTGTAATCATGCA (配

列番号 57)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS507G

標的配列 : GCAACAAGACATACATCGAC (配

列番号 8)

[0183] <薬剤耐性遺伝子がピューロマイシン耐性遺伝子のベクター>

(11) P1

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S753G

標的配列 : GCAAGTGTGACTCTACGCTT (配

列番号 3)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS706g+

標的配列 : gATATTGTAATGGGCTCTGTC (

配列番号 11)

(12) P2

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S753G

標的配列 : GCAAGTGTGACTCTACGCTT (配

列番号 3)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS706g

標的配列 : gTATTGTAATGGGCTCTGTC (配

列番号 60)

(13) P3

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S753G

標的配列 : GCAAGTGTGACTCTACGCTT (配

列番号 3)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS717g+

標的配列 : gAAAAGGTTACAATATTGTAA (

配列番号 4)

[0184] <薬剤耐性遺伝子がハイグロマイシン B 耐性遺伝子のベクター>

(14) H1

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S893G

標的配列 : GCAGGTACCAATGGGGAAGA (配

列番号 12)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS859G

標的配列 : GGATCAGCCATGGTAGATTA (配

列番号 13)

(15) H2

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S884G

標的配列 : GCTGATCCTGCAGGTACCAA (配

列番号 9)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS840g+

標的配列 : gATGGTTTCTGAGAACAGATG (

配列番号 10)

(16) H3

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S1471g+

標的配列 : gACTAAAACTAGTAATGCAA (

配列番号 14)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS1438g+

標的配列 : gACATTTTAAAATATTTGTAAG (

配列番号 15)

(17) H4

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S1583G

標的配列 : GATTGGTGTATTGCTGCATT (配

列番号 5)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS1543G

標的配列 : GTTGATTTATTACTTTTAAA (配

列番号 6)

[0185] <薬剤耐性遺伝子がゼオシン耐性遺伝子のベクター>

(18) Z1

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S1471g+

標的配列 : gACTAAAACTAGTAATGCAA (

配列番号 14)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS1438g+

標的配列 : gACATTTTAAAATATTTGTAAG (

配列番号 15)

(19) Z2

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S1583G

標的配列 : GATTGGTGTATTGCTGCATT (配

列番号 5)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS1543G

標的配列 : GTTGATTTATTACTTTTAAA (配

列番号 6)

(20) Z3

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S563g+

標的配列 : gAACCCAGCTGTAATCATGCA (

配列番号 7)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS507G

標的配列 : GCAACAAGACATACATCGAC (配

列番号 8)

[0186] [5] 及び「6」

<HPV16 (+) 子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキング gRNA の検討>

上記で作製したレンチウイルスを HPV16 陽性子宮頸がん細胞株 SiHa に感染後、G418 (neo) 耐性ベクターは 1 mg/mL の G418 で、BsdS 耐性ベクターは 10 µg/mL のブラストサイジン S で、Puro 耐性ベクターは 1 µg/mL のピューロマイシンで、HygB 耐性ベクターは 400 µg/mL のハイグロマイシン B で、Zeo 耐性ベクターは 1 mg/mL のゼオシンでそれぞれ被感染細胞を選択した。

樹立した細胞に、同様に薬剤耐性の異なるレンチウイルスを感染後薬剤選択し、HPV16に対するダブルニッキングgRNAペアを1組2個から4組8個（一部5組10個）発現するSiHa細胞を樹立した。

[0187] 各細胞を96ウェルプレートに1,000個/ウェルとなるように12ウェルに播種し、翌日Cas9ニッカーゼ（Cas9D10A）を発現するアデノウイルスベクターをMOI=0からMOI=1,000の4段階でトリPLICATEとなるよう感染し、MOI=0でモック感染したウェルがコンフルエントになった10日から14日後にメタノール固定し、Acid Red法（J Natl Cancer Inst. 1990 Jul 4; 82(13):1107-12）で相対残存細胞数を定量した。各条件の3ウェルずつの残存細胞数の平均と標準誤差を算出し、モックのウェルを100とした相対残存細胞数（「% growth」）をグラフ化した。結果を図6～14に示す。各図中、横軸は、使用したgRNAペア又はペアの組合せを示す。例えば、「N1」は上記したN1の1ペアのgRNAを用いた場合、「B1Z2」は上記したB1のペアのgRNAと、Z2のペアのgRNAとの組合せ（2ペアの組合せ）を用いた場合、「H1B1P1」は上記したH1のペアのgRNAと、B1のペアのgRNAと、P1のペアのgRNAとの組合せ（3ペアの組合せ）を用いた場合、「H1B1P3Z1」は上記したH1のペアのgRNAと、B1のペアのgRNAと、P3のペアのgRNAと、Z1のペアのgRNAとの組合せ（4ペアの組合せ）を用いた場合を表す。

[0188] gRNAを0～4組（8個）導入したSiHa細胞を96ウェルプレートに1,000個/ウェルとなるように各12ウェルに播種した。翌日Cas9ニッカーゼ（Cas9D10A）を発現するアデノウイルスベクターをMOI=0、250、500、1,000の4段階でトリPLICATEとなるよう感染し、MOI=0でモック感染したウェルがコンフルエントになった10日から14日後にメタノール固定し、Acid Red法で相対残存細胞数を定量した。図15に、Acid Redで染色した96ウェルプレート

を示す。

[0189] [7]

上記[6]の結果の再現性をHPV16陽性中咽頭がん細胞株SCC90で確認すると共に、N5～N7についてはSiHa細胞内のHPV16ゲノムにSNPがあるためSCC90でその優劣を評価した。方法は上記[5]と同じ方法を用いた。

[0190] 図6～10の結果から、gRNAペアとしては、N3、N5、N6、N7、B1、P1、P3、H1、Z1、Z2が好ましいことが確認された。

また、gRNAペアの組合せとしては、N5とP3との組合せ、N5とZ2との組合せ、B1とH2との組合せ、B1とZ2との組合せ、P1とH1との組合せ、P1とZ2との組合せ、N5とP3とH1との組合せ、N5とP3とZ1との組合せ、B1とP1とH1との組合せ、B1とP3とH1との組合せ、B1とH2とZ1との組合せ、P3とH1とZ1との組合せ、P3とH2とZ1との組合せが好ましいことが確認された。

これらの中でも、H1又はH2と、B1と、P1又はP3との組合せが好ましく、H2は日本人に多いサブ系統A4にSNPがあること、P3はサブ系統D2、D3の5'端にSNPがあることから、H1と、B1と、P1との組合せがより好ましい。

更に、上記3組の組合せに、4組目として、Z1もしくはZ2、又はN3もしくはN5を用いることも好ましく、これらの中でも、SNPのないZ2がより好ましい。

[0191] また、図11の結果から、gRNAペアとしては、B1、B2、P1、P2、P3、H1、H2、H1が好ましいことが確認された。この中でサブ系統にSNPのないB1、B2、P1、P2、H1がより好ましい。

また、gRNAペアの2組の組合せとしては、図12～14の結果から、B1とZ1との組合せ、H1とP3との組合せ、H1とP1との組合せ、H2とB1との組合せ、H2とP1との組合せ、N5とP3との組合せ、B1とZ1との組合せ、P1とZ2との組合せ、P1とZ1との組合せ、H1と

B 1 との組合せ、H 1 と N 1 との組合せ、H 1 と B 2 との組合せ、H 1 と P 2 との組合せ、H 1 と P 3 との組合せ、N 1 と P 3 との組合せ、B 1 と P 1 との組合せ、B 1 と H 3 との組合せ、N 5 と P 3 との組合せ、N 3 と P 3 との組合せ、N 3 と H 3 との組合せ、N 3 と H 4 との組合せ、B 1 と H 4 (H 4 は Z 2 と同じ g R N A ペアをもつ) との組合せが好ましいことが確認された。

この中でも、H 2 は日本人に多いサブ系統 A 4 に S N P があること、N 5 には日本人に多いサブ系統 A 5 に S N P があること、P 3 にはサブ系統 D 2、D 3 の 5' 端に S N P があること、N 1、N 3、Z 1、H 3 にはサブ系統 C に S N P があることから、H 1 と P 1 との組合せ、H 1 と P 2 との組合せ、H 1 と B 1 との組合せ、H 1 と B 2 との組合せ、B 1 と P 1 との組合せ、B 1 と Z 2 との組合せ、P 1 と Z 2 との組合せがより好ましい。

g R N A ペアの 3 組の組合せとしては、H 1 と P 1 と B 1 との組合せ、H 1 と P 1 と B 2 との組合せ、H 1 と P 2 と B 1 との組合せ、H 1 と P 2 と B 2 との組合せが好ましい。

g R N A ペアの 4 組の組合せとしては、前記 g R N A ペアの 3 組の組合せに Z 2 を加えた、H 1 と P 1 と B 1 と Z 2 との組合せ、H 1 と P 1 と B 2 と Z 2 との組合せ、H 1 と P 2 と B 1 と Z 2 との組合せ、H 1 と P 2 と B 2 と Z 2 との組合せが好ましい。

[0192] (試験例 2 : H P V 1 8 標的ガイド R N A の選定)

本試験例の概要は、以下の通りである。

[1] E 6 E 7 遺伝子を含む L C R から E 1 領域の内、ダブルニッキング可能な g R N A 候補 8 3 個について検討した。図 1 6 に H P V 1 8 の遺伝子の構造を示す。

[2] 当初有望と考えた 1 9 個については試験管内における切断効率を調べた。

[3] 上記 [2] と、S N P の有無を参考に 1 4 組の有望なダブルニッキング g R N A を発現するレンチウイルスベクターを作製した。

[4] 上記[3]で作製したレンチウイルスをHPV18陽性子宮頸がん細胞株HeLaに単独感染あるいは重感染させることで、1～4組(2～8個)のgRNAを発現するHeLa細胞を樹立した。

[5] 上記[4]で作製した細胞にアデノウイルス(CB-NC9)を感染させることで細胞増殖抑制効果を検討した。

[0193] [1]

E6E7遺伝子を含むLCRからE1領域の内、ダブルニッキング可能なgRNA候補83個をリストアップした。これらについて、NCBIに登録されているHPV18のバリエーションの系統(A-D)の配列と、HPV18陽性がん細胞HeLa中のHPV18の配列を並べてSNPの有無を調べた。

[0194] [2]

上記でリストアップした83個のgRNA候補のうち、下記の19個のgRNA候補について、試験管内における切断効率を調べた。具体的には、上記したgRNA配列を有するcrRNAと、tracrRNAとを合成し、これらと基質HPV18のDNAを混ぜ、Cas9蛋白を加え切断効率を調べた。なお、切断効率が良いと違いが分かりにくいので、切断効率を意図的に下げた。

基質となる切断用DNAは、HPV18ゲノムを以下のプライマーで増幅した2.3kbの断片を用いた。

[プライマー]

HPV18-E6u70L1d17-F-34hnt :

g g t t g c g c c c t a g t g a g t a a c a a c t g t a t t t g t
g (配列番号74)

HPV18-E7d84Xba10-R-32hnt :

c c c c a t t t a c a g t c t a g a c a t t g a a t a t g g g c (配列番号75)

[0195] 結果を図17～20に示す。各図中、gRNA候補の名称は「18__」に

おける「__」を省略して記載した。

なお、下記の切断効率の結果は、2回の試験の結果（1回目、2回目）について、○（切断効率：優）、△（切断効率：良）、×（切断効率：可）をそれぞれ記載した。

[0196] <結果>

[gRNA候補]

(1) 18__AS49G+

標的配列 : GTTTTTCGGTCCCGACCGTTTT (

配列番号17)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

(2) 18__AS65g+

標的配列 : gTCTTTTATATACACCGTTTT (

配列番号20)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

(3) 18__S125G+

標的配列 : GCGCGCTTTGAGGATCCAACA (

配列番号16)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

[0197] (4) 18__AS153G+

標的配列 : GTTCAGTTCCGTGCACAGATC (

配列番号29)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

(5) 18__S216G+

標的配列 : GTGTATATTGCAAGACAGTAT (

配列番号 2 8)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

[0198] (6) 1 8__A S 2 9 1 g +

標的配列 : g C A T T T T A T G G C A T G C A G C A T G (

配列番号 2 2)

切断効率の結果 : △、△

SNP : -

(7) 1 8__S 3 5 8 g

標的配列 : g A T T A T T C A G A C T C T G T G T A (配

列番号 2 1)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

(8) 1 8__S 3 5 8 g +

標的配列 : g C A T T A T T C A G A C T C T G T G T A (

配列番号 7 6)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

[0199] (9) 1 8__A S 6 4 4 G +

標的配列 : G T C A A C C G G A A T T T C A T T T T G (

配列番号 7 7)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

(10) 1 8__A S 6 4 5 G

標的配列 : G T C A A C C G G A A T T T C A T T T T (配

列番号 2 7)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

(11) 18__AS646G

標的配列 : GGTCAACCGGAATTTTCATTT (配
列番号19)

切断効率の結果 : △、○

SNP : -

(12) 18__S689g+

標的配列 : gCGAGCAATTAAGCGACTCAG (配
列番号18)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

(13) 18__S711G

標的配列 : GAAGAAAACGATGAAATAGA (配
列番号78)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

[0200] (14) 18__AS841g+

標的配列 : gACAGCTGCTGGAATGCTCGA (配
列番号26)

切断効率の結果 : ×、△

SNP : -

(15) 18__AS873g+

標的配列 : gCCACGGACACACAAAGGACA (配
列番号24)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

(16) 18__AS874g+

標的配列 : gACCACGGACACACAAAGGAC (配
列番号79)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

(17) 18__AS879g+

標的配列 : gTGCACACCACGGACACACAA (配列番号80)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

(18) 18__S883g+

標的配列 : gCCCTGTCCTTTGTGTGTCCG (配列番号25)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

(19) 18__S911g+

標的配列 : gATCCCAGCAGTAAGCAACAA (配列番号23)

切断効率の結果 : ○、○

SNP : -

[0201] 図17～18の結果から、E6の5'側については、アンチセンス側の2つと対になるセンス側18__S125G+の切断効率が低かった。E6の前半については、18__AS291g+以外はどれもまずまずの切断効率であった。18__S358gと18__S358g+の間に違いはなかった。この切断効率で選ぶとすると、18__AS153G+と18__S216G+が良いことがわかった。

図19～20の結果から、E7の5'側については、アンチセンス側の18__AS646Gが、1回目で切断効率が低く、2回目でも少し効率が低かった。E7の3'側については、18__AS841g以外はどれもまずまずの切断効率であった。この中から選ぶとすると、アンチセンス側はブレのない18__AS873g、センス側は18__S883g+が良いことがわかった。

た。

[0202] [3]

上記[2]と、SNPの有無を参考に14組の有望なダブルニッキングgRNAを発現するレンチウイルスベクター（2つのgRNA発現ユニットと1つの薬剤耐性遺伝子発現ユニットをもつレンチウイルスベクター）を試験例1と同様にして、作製した。

[0203] 作製したHPV18を標的とする2つのgRNA発現ユニットと、1つの薬剤耐性遺伝子発現ユニットをもつレンチウイルスベクターを下記に示す。

原則として、標的配列を20塩基とした際、5'端の配列がGであれば20塩基とし、Gでない場合には5'端にgを付加し21塩基とした。例外的に18__S358gは標的配列を20塩基とした際、5'端の配列Cをgに置換し20塩基のままとした。

[0204] 標的配列名の命名法は、以下のとおりである。

「18__」： HPV18を標的とすることを示す。

「S」： センス鎖を標的配列とすることを示す。

「AS」： アンチセンス鎖を標的配列とすることを示す。

「数字」： 推定切断端（5'ーオーバーハング端）のHPV18プロトタイプ配列（GenBank X05015.1）の位置を示す。

「G」： 20塩基を標的配列とし、5'端のGが標的配列と一致する。

「G+」： 21塩基を標的配列とし、5'端のGが標的配列と一致する。

「g」： 20塩基を標的配列とし、5'端のgは標的配列と一致しない。

「g+」： 21塩基を標的配列とし、5'端のgは標的配列と一致しない。

下記標的配列中の5'端に小文字の「g」の記載がある場合、この「g」はU6プロモーターからの転写開始のために付加したものである。

[0205] <薬剤耐性遺伝子がG 4 1 8 耐性遺伝子のもの>

(1) N 1

- ・ センス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ S 1 2 5 G +

標的配列 : G C G C G C T T T G A G G A T C C A A C A (

配列番号 1 6)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ A S 4 9 G +

標的配列 : G T T T T C G G T C C C G A C C G T T T T (

配列番号 1 7)

(2) N 2

- ・ センス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ S 1 2 5 G +

標的配列 : G C G C G C T T T G A G G A T C C A A C A (

配列番号 1 6)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ A S 6 5 g +

標的配列 : g T C T T T T A T A T A C A C C G T T T T (

配列番号 2 0)

[0206] <薬剤耐性遺伝子がハイグロマイシン B 耐性遺伝子のベクター>

(3) H 1

- ・ センス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ S 2 1 6 G +

標的配列 : G T G T A T A T T G C A A G A C A G T A T (

配列番号 2 8)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ A S 1 5 3 G +

標的配列 : G T T C A G T T C C G T G C A C A G A T C (

配列番号 2 9)

(4) H 2

- ・ センス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ S 3 5 8 g

標的配列 : g A T T A T T C A G A C T C T G T G T A (配

列番号 2 1)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ A S 2 9 1 g +

標的配列 : g C A T T T A T G G C A T G C A G C A T G (

配列番号 2 2)

[0207] <薬剤耐性遺伝子がゼオシン耐性遺伝子のベクター>

(5) Z 1

- ・ センス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ S 3 5 8 g

標的配列 : g A T T A T T C A G A C T C T G T G T A (配

列番号 2 1)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ A S 2 9 1 g +

標的配列 : g C A T T T A T G G C A T G C A G C A T G (

配列番号 2 2)

[0208] <薬剤耐性遺伝子がピユーロマイシン耐性遺伝子のベクター>

(6) P 1

- ・ センス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ S 6 8 9 g +

標的配列 : g C G A G C A A T T A A G C G A C T C A G (

配列番号 1 8)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする g R N A 発現カセット

1 8 __ A S 6 4 4 G +

標的配列 : GTCAACCGGAATTTTCATTTTG (配列番号 77)

(7) P2

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__S689g+

標的配列 : gCGAGCAATTAAGCGACTCAG (配列番号 18)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__AS645G

標的配列 : GTCAACCGGAATTTTCATTTT (配列番号 27)

(8) P3

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__S689g+

標的配列 : gCGAGCAATTAAGCGACTCAG (配列番号 18)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__AS646G

標的配列 : GGTCAACCGGAATTTTCATTTT (配列番号 19)

(9) P4

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__S711G

標的配列 : GAAGAAAACGATGAAATAGA (配列番号 78)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__AS644G+

標的配列 : GTCAACCGGAATTTTCATTTTG (

配列番号 77)

(10) P5

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__S711G

標的配列 : GAAGAAAACGATGAAATAGA (配

列番号 78)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__AS645G

標的配列 : GTCAACCGGAATTTTCATTTT (配

列番号 27)

(11) P6

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__S711G

標的配列 : GAAGAAAACGATGAAATAGA (配

列番号 78)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__AS646G

標的配列 : GGTCAACCGGAATTTTCATTTT (配

列番号 19)

[0209] <薬剤耐性遺伝子が BsdS 耐性遺伝子のベクター>

(12) B1

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__S883g+

標的配列 : gCCCTGTCCTTTGTGTGTCCG (

配列番号 25)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__AS841g+

標的配列 : gACAGCTGCTGGAATGCTCGA (

配列番号 26)

(13) B2

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__S911g+

標的配列 : gATCCCAGCAGTAAGCAACAA (

配列番号 23)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__AS873g+

標的配列 : gCCACGGACACACAAAGGACA (

配列番号 24)

(14) B3

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__S911g+

標的配列 : gATCCCAGCAGTAAGCAACAA (

配列番号 23)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__AS874g+

標的配列 : gACCACGGACACACAAAGGAC (

配列番号 79)

(15) B4

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__S911g+

標的配列 : gATCCCAGCAGTAAGCAACAA (

配列番号 23)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

18__AS879g+

標的配列 : gTGCACACCACGGACACACAA (

配列番号 80)

[0210] [4] 及び [5]

＜HPV18（+）子宮頸がん細胞を用いたダブルニッキングgRNAの検討＞

上記で作製したレンチウイルスをHPV18陽性子宮頸がん細胞株HeLaに感染後、G418（neo）耐性ベクターは800 μ g/mLのG418で、BsdS耐性ベクターは10 μ g/mLのブラストサイジンSで、Puro耐性ベクターは1 μ g/mLのピューロマイシンで、HygB耐性ベクターは250 μ g/mLのハイグロマイシンBで、Zeo耐性ベクターは1mg/mLのゼオシンでそれぞれ被感染細胞を選択した。

樹立した細胞に、同様に薬剤耐性の異なるレンチウイルスを感染後薬剤選択し、HPV18に対するダブルニッキングgRNAペアを1組2個から4組8個発現するHeLa細胞を樹立した。

[0211] 各細胞を96ウェルプレートに1,000個/ウェルとなるように12ウェルに播種し、翌日Cas9ニッカーゼ（Cas9D10A）を発現するアデノウイルスベクターをMOI=0からMOI=1,000の4段階でトリPLICATEとなるよう感染し、MOI=0でモック感染したウェルがコントロールになった10日から14日後にメタノール固定し、Acid Red法で相対残存細胞数を定量した。各条件の3ウェルずつの残存細胞数の平均と標準誤差を算出し、モックのウェルを100とした相対残存細胞数をグラフ化した。結果を図21～24に示す。

[0212] 以上の結果から、gRNAペアとしては、単独ではH1が最も効果が高く、次いで、P3、N1（N2）、P2、B1、H2（Z1）の効果が高かった。

N1、N2は単独で同程度に効果があり、B1やP3との組合せも良好な結果であった。

P1～P6の中では、P1～P3がP4～P6よりも優れていた。P1～P3の中では、P1はやや効率が低かった。P2、P3の切断部位は同じで効果もほぼ同じであった。

B 1 ～ B 4 の中では、B 1、B 2 が好ましく、B 1 がより好ましい結果となった。

H 2 (Z 1) は単独での効果はやや低いものの、H 1 との組合せでは強い相乗効果を示した。

g R N A ペアの 2 組の組合せでは、N 1 と P 3 との組合せ、N 2 と P 3 との組合せ、N 2 と H 2 との組合せ、B 2 と H 2 との組合せの効果が高かった。また、g R N A ペアの 3 組の組合せでは、N 1 と B 1 と P 2 との組合せ、N 1 と H 1 と Z 1 との組合せ、N 2 と B 1 と P 2 との組合せ、N 2 と B 1 と P 3 との組合せ、B 1 と P 2 と H 2 との組合せ、B 1 と P 3 と H 2 との組合せの効果が高かった。

g R N A ペアの 4 組の組合せとしては、(i) H 1 と、(i i) P 2 又は P 3、N 1 又は N 2、B 1、及び Z 1 からなる群から選択される 3 種との組合せが好ましい。

[0213] (試験例 3)

[実験に用いた 8 重ガイド R N A 発現ユニット搭載アデノウイルスベクターの構造]

本実験に用いたアデノウイルスベクター (A d e x ベクター) は、M i y a k e S, S a i t o I e t a l (P N A S, 93:1320-1324, 1996) に記載されているものを用いた。具体的には、E 1 領域に塩基位置 455～3, 328 の欠失 (欠失長 2, 874 塩基) 及び E 3 領域に塩基位置 28, 593-30, 470 の欠失 (欠失長 1, 878 塩基) の欠失を持つ。このアデノウイルスベクターを基にして、後述の<L 4 ポリ A 配列を回復した L 4 / E 3 欠失の延長>の項目に記載したように、L 4 / E 3 領域の欠失範囲を拡大し、ベクター容量を増加させた。

[0214] なお、世界でよく用いられているベクター (B e t t A J e t a l ., P N A S, 91:8802-8806, 1994) の欠失は、E 1 領域で塩基位置 342～3, 528 (欠失長 3, 187 塩基) 及び E 3 領域に塩基位置 28, 133～30, 818 (欠失長 2, 686 塩基) である

。アデノウイルスゲノムが粒子にパッケージングされるときに使われる領域は塩基位置194～358であり、Bett A J et al. では、本発明で用いている配列より148塩基短い。この相違により、機能配列はA1からE7まで7個あるが（Grable M and Hearing P, J Virol, 66:723-731, 1992）、Bett et al. のベクターはこのうちA5、A6、A7配列を欠失している。これに対し、本発明で用いられているMiyake S et al. のベクターは7個の機能配列を全て保持しているという構造上の違いがある。

[0215] 図25～27は、実験に用いた8重ガイドRNA発現ユニット搭載アデノウイルスベクターの構造を説明した模式図である。

本実験に用いたアデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムの全長を含むコスミドベクターに目的遺伝子を挿入後、293細胞へトランスフェクションすることによって組換えアデノウイルスベクターを得る方法（完全長DNA導入法：Fukuda H, Saito I et al., Microbiol Immunol, 50:643-654, 2006）により作製された。まずベクターゲノム全長をもつコスミドを96穴プレートの293細胞へトランスフェクションを行い、2週間後にウイルスクローンを分離した。これを293細胞に感染させウイルスを継代・増幅することにより2次から5次までの継代ウイルスストック、及び精製ウイルスストックを調製した。この5次ウイルス及び精製ウイルスをSiHa細胞等に感染することにより、染色体上にあるHPV DNAが含むE6、E7遺伝子を破壊する実験を行った。

[0216] 図25は、CBプロモーター（CB pro）からCas9ニッケアゼを発現するアデノウイルスベクターの構造を示す。このベクターでは、ウイルスゲノムの左端近くのE1クローン化部位に、Cas9ニッケアゼをCBプロモーターから発現するCas9ニッケアゼ発現ユニット、E4部位に、8重ガイドRNAを短縮U6プロモーターから発現する8重ガイドRNA発現ユニット（8gRNA）を持つ。

図26は、PGKプロモーター（PGK pro）からCas9ニッカーゼを発現するアデノウイルスベクターの構造を示す。このベクターでは、E4部位の末端に、Cas9ニッカーゼをPGKプロモーターから発現するCas9ニッカーゼ発現ユニット、E4部位のCas9ニッカーゼ発現ユニットよりも内側に、8重ガイドRNAを短縮U6プロモーターから発現する8重ガイドRNA発現ユニット（8gRNA）を持つ。

図27は、EFプロモーター（EFd pro）からCas9ニッカーゼを発現するベクターの構造を示す。このベクターでは、E1クローン化部位に、Cas9ニッカーゼをEFプロモーターから発現するCas9ニッカーゼ発現ユニット、Cas9ニッカーゼ発現ユニットよりも内側に、4重ガイドRNAを短縮U6プロモーターから発現する4重ガイドRNA発現ユニット（4gRNA）、E4部位に、E1部位に搭載した4重ガイドRNAとは異なる4重ガイドRNAを短縮U6プロモーターから発現する4重ガイドRNA発現ユニット（4gRNA）を持つ。すなわち8重ガイドRNA発現ユニットはE1部位とE4部位に2分割された形で組み込まれている。

全てのベクターにおいてCas9ニッカーゼ発現ユニットは外向きに、また全てのガイドRNA発現ユニットは左向きに組み込まれた構造を持つ。

[0217] プロモーター、多重ガイドユニットの挿入位置はE1領域が一般的である。E3領域で用いると周辺のアデノウイルス遺伝子の影響を受けるので好ましくないため本発明では用いていない（Suzuki M, Saito I et al., Gene Ther, 1-9, 2015）。

E4領域はE1領域と同様にベクターゲノムの末端にあり、E4側しかアデノウイルス遺伝子の影響を受けない利点がある（つまりE3部位では両側あるいは内部の影響を受ける）。E4挿入部位は本発明者の一人である齋藤により開発され（上述した、Miyake S, Saito I et al., PNAS, 93:1320-1324, 1996）、世界で他には使われていない独自のものである。

また3つのプロモーターの転写方向は少なくともE1領域については外向

きが免疫反応をほとんど惹起しないため (Nakai M, Saito I, et al., Hum Gene Ther, 18:925-936, 2007)、CB、PGK、EFdプロモーターをすべて外向きで用いた。また多重ガイドRNAの挿入位置と方向は、同じU6プロモーターで2重ユニットで転写されたshRNAがE4部位、内向きの効率がよいことを報告しているため (Pei Z, Saito I et al., Sci Rep, 3:3575, 2013)、同じ部位と方向で用いた。

[0218] 図26のPGKプロモーターを発現するベクターではE1部位には外来DNAが組み込まれておらず、E4部位には8重ガイドRNA発現ユニット及びCas9ニッカーゼ発現ユニットという大きな外来DNAが組み込まれている。この構造はRCA (replication-competent adenovirus) の生成を低減させることを目的としている (Suzuki T et al., Virus Res, 158:154-160, 2011)。RCAは野生型ウイルスであり、293細胞の染色体上に存在しベクターでは欠失しているE1遺伝子とベクター上で残存する配列との相同組み換えにより生成する。しかし図26のベクターでは、RCAがE1遺伝子を獲得するとE1遺伝子のサイズだけウイルスゲノムが伸長することを利用してRCAの生成を低減させている。具体的にはベクターゲノムをアデノウイルスゲノムのパッケージング可能サイズの上限近くとすることにより、生成したRCAゲノムがこのサイズを超えてしまうように設計されている。

[0219] <L4ポリA配列を回復したL4/E3欠失の延長>

図28は、アデノウイルスのL4/E3領域に関連する配列として、アデノウイルス5型の位置付けで第27801番塩基～第28200番塩基の配列 (配列番号81) と、12.4K遺伝子のタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号82) を記載した。

GATCAATTTATTCTAACTTTGACGCGGTAAAGG

ACTCGGCGGACGGCTACGACTGAATGTTAAGTGG
AGAGGCAGAGCAACTGCGCCTGAAACACCTGGTC
CACTGTCGCCGCCACAAGTGCTTTGCCCGCGACT
CCGGTGAGTTTTTGCTACTTTGAATTGCCCGAGGA
TCATATCGAGGGCCCCGGCGCACGGCGTCCGGCTT
ACCGCCCAGGGAGAGCTTGCCCGTAGCCTGATTC
GGGAGTTTACCCAGCGCCCCCTGCTAGTTGAGCG
GGACAGGGGACCCTGTGTTCTCACTGTGATTTGC
AACTGTCCTAACCTTGGATTACATCAAGATCTTT
GTTGCCATCTCTGTGCTGAGTATAATAAATACAG
AAATTAAAATATACTGGGGCTCCTAT (配列番号81)
MLSGEAEQLRLKHLVHCRRHKCFARDSGEFCYFE
LPEDHIEGPAHGVRLTAQGELARSLIREFTQRPL
LVERDRGPCVLTVICNCPNLGLHQDLCCHLCAEY
NKYRN (配列番号82)

[0220] アデノウイルス粒子へのパッケージングできる長さの上限は約37.7 kb (約105%)と報告されている(Bett AJ et al., J Virol, 67:5911-5921, 1993)。もし本来の完全長DNA導入法で用いられるバックボーンをそのまま使ってCBプロモーター及びHPV遺伝子を標的とした8個のガイドユニットを持つベクター(図25)を作製しようとしても、パッケージングサイズを大幅に超過するため作製できない。また、もしBett et al.のベクターのL4/E3欠失を持ち(図28の最下段、Ax3dB)、かつE1欠失は完全なパッケージング領域を保持したベクターを作製しようとしても、ベクターサイズは38.1 kbとなり、依然として上限を越えているためベクターを得ることはできない。

[0221] そこで発明者はL4/E3欠失をBett et al.のベクターよりも拡張した新規ベクターの開発を試みてこれに成功した(図28)。Bet

t e t a l. の L 4 / E 3 欠失では、欠失の 5' 端は L 4 ポリ A 配列の上流にありこれを欠失し（図 28 最下段、3 d B 及び L 4 ポリ A 配列）、一方で機能未知の 1 2. 4 K 遺伝子を開始コドンから終始コドン直前（図 28 最下段）までのほぼ全長を温存している。発明者はベクターの L 4 必須遺伝子群のポリ A 配列に何らかの機能があると考え、この周辺部分を含む 6 2 塩基の配列を飛び地として回復し、代わりに機能未知の 1 2. 4 K 遺伝子（アミノ酸を示す）のほぼ全長にあたる 2 7 3 塩基を、ポリ A 回復配列まで欠失させた（3 d P；中間欠失の 5' 端と回復ポリ A 配列の 3' 端に位置する）。その結果 L 4 / E 3 欠失は、B e t t e t a l. の L 4 / E 3 欠失と比べて、差し引き 2 1 1 塩基延長された。この欠失に用いたリバースプライマー配列（配列番号 8 3）を以下に示す。下線はプライマーの 5' 端として付加した B g l l l 配列である。

G C G A G A T C T T A G G A G C C C C A G T A T A T T T T A A T T T
C T G T A T T T A T T A T A C T C A G C A C A G A G A T G G C A A C
A A A T T A A C A T T C A G T C G T A G C C G T C C G C C G A G（配
列番号 8 3）

[0222] この欠失の拡張と L 4 ポリ A 回復の影響を調べるため、3 d P 欠失を持ち C B プロモーターから C a s 9 ニッカーゼを発現するベクター（A x 3 d P - C B N C 9）、及び同じ構造で 3 d B 欠失をもつベクター（A x 3 d B - C B N C 9）を作製した。A x 3 d P - C B N C 9、A x 3 d B - C B N C 9 の力価はそれぞれ 5.02×10^9 、 6.40×10^9 （単位 T C I D 5 0， $n = 3$ ）でほぼ同じであった。すなわち A x 3 d P - C B N C 9 は A x 3 d B - C B N C 9 よりも 2 2 1 塩基広い欠失を持ちながら力価はほぼ同じに保たれた。

[0223] C B プロモーターから C a s 9 ニッカーゼを発現し 8 個のガイドユニットを持つ A x 3 d P - H P V 8 g - C B N C 9（図 2 5）は、このカセットベクター A x 3 d P - C B N C 9 に 8 個のガイドユニットを組み込むことで作製された。このベクターのサイズは 3 7. 9 k b となり、上限とされる約 3

7. 7 k bを上回った。従ってこの結果は、報告された上限が37. 7 k bであるという記載が常に正しいとは限らない可能性を示している。P G Kプロモーター及びE F dプロモーターをもつベクター（図26、図27）はA x 3 d P - C B N C 9を基本としてC a s 9ニッカーゼを発現するユニットのプロモーターの種類及びその位置を変えることで作製された。

[0224] 上記したC a s 9ニッカーゼをC Bプロモーターから発現するC a s 9ニッカーゼ発現ユニットの配列（配列番号84）は、<https://www.addgene.org/42335/sequences/>でpX335にある。配列番号84中、1番目～805番目はC Bプロモーター、806番目～5,026番目はC a s ニッカーゼ、5,027番目～5,249番目はポリA（ウシ成長ホルモン由来）である。

[0225] 上記したC a s 9ニッカーゼをP G Kプロモーターから発現するC a s 9ニッカーゼ発現ユニットでは、配列番号84におけるC Bプロモーターを下記配列のP G Kプロモーター（配列番号85）とし、ポリAを下記配列のポリA（トリβ-グロビン由来）（配列番号86）とした以外は、同様の構成とした。

```
ATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGG
CAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGG
GCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCG
CACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCG
GCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTTCGCGCCACCTT
CTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCCGC
CCCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATG
GAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGG
ACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCTT
TTGGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTC
GCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGT
CCGGGGGGCGGGCTCAGGGGGCGGGCTCAGGGGGCGG
```

GGCGGGCGCCCGAAGGTCCTCCGGAGGCCCGGGCA
TTCTGCACGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCGCGC
TGTTCTCCTCTTCCCTCATCTCCGGGGCCTTTTCGAC
CTGCA (配列番号85)

CAATTCACTCCTCAGGTGCAGGCTGCCTATCAGA
AGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCA
CAAATACCACTGAGATCTTTTTTCCCTCTGCCAAA
AATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATC
TGACTTCTGGCTAATAAAGGAAA (配列番号86)

[0226] 上記したCas9ニッカーゼをヒトEF1 α プロモーター（「EFプロモーター」と称することがある。）から発現するCas9ニッカーゼ発現ユニットでは、配列番号84におけるCBプロモーターを下記配列の短縮されたEFプロモーター（配列番号87）（EFdプロモーター）とした以外は、同様の構成とした。

TGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGA
AGTTGGGGGGAGGGGTCTGGCAATTGAACCGGTGC
CTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGT
GATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTTCCCGAGG
GTGGGGGAGAAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGC
CGTGAAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGGCCGCC
AGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCCCTC
TGGTGCCCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCC
GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTCTGGCACCA
GTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGGCC
CTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGGCG
CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAA
AGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTGCTT
CATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAG

GCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACG
 TCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGA
 TGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA
 AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCC
 TTGGAATTTGCCCTTTTTTGAGTTTGGATCTTGGT
 TCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT
 TTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA (配列番号 87)

[0227] 上記した多重ガイドRNA発現ユニットに用いた短縮U6プロモーターの配列 (配列番号 88) は、下記の通りである。

CAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATG
 ATTCCTTCATATTTGCATATACTGTACGTACAAA
 ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGT
 ATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAA
 AGGACGAGGATCC (配列番号 88)

[0228] (試験例 4)

[HPV16陽性がん細胞に対する一体型アデノウイルスベクターの効果]

上記試験例 2 の結果から、4 組 8 個の gRNA として好ましい態様の下記の gRNA 発現カセット (Set 2) を搭載した一体型アデノウイルスベクター (Set 2-PGK-NC9) を調製した。なお、アデノウイルスベクターには、図 26 に記載のものを用いた。

(1) N7

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S486G

標的配列 : GCAAAGATTCCATAATATAAG (配列番号 72)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS443g+

標的配列 : gAGATGTCTTTGCTTTTCTTC (

配列番号 2)

(2) B 1

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ S 5 6 3 g +

標的配列 : g A A C C C A G C T G T A A T C A T G C A (

配列番号 7)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ A S 5 0 7 G

標的配列 : G C A A C A A G A C A T A C A T C G A C (配

列番号 8)

(3) P 1

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ S 7 5 3 G

標的配列 : G C A A G T G T G A C T C T A C G C T T (配

列番号 3)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ A S 7 0 6 g +

標的配列 : g A T A T T G T A A T G G G C T C T G T C (

配列番号 1 1)

(4) H 1

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ S 8 9 3 G

標的配列 : G C A G G T A C C A A T G G G G A A G A (配

列番号 1 2)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

1 6 __ A S 8 5 9 G

標的配列 : G G A T C A G C C A T G G T A G A T T A (配

列番号 1 3)

[0229] 上記した一体型アデノウイルスベクター（S e t 2－P G K－N C 9）を以下の細胞株に感染させ増殖抑制効果を調べた。

- ・ H P V 1 6 陽性子宮頸がん細胞株

5株 : S i H a、C a S k i、S K B I I I b、Q G－H、Q G－U

- ・ H P V 1 6 陽性中咽頭がん細胞株

4株 : S C C 9 0、V U 1 4 7 T、U M－S C C－4 7、U M－S C C－1 0 4

- ・ 子宮頸部由来正常上皮細胞

2株 : H C K 1 T、H F F 2 T

[0230] 増殖抑制効果は、下記のようにして試験した。

各細胞を96ウェルプレートに1,000個／ウェルとなるように12ウェルに播種し、翌日一体型アデノウイルスベクター（S e t 2－P G K－N C 9）をM O I＝0からM O I＝1,500の7段階でトリPLICATEとなるよう感染し、M O I＝0でモック感染したウェルがコンフルエントになった10日から14日後にメタノール固定し、A c i d R e d法で相対残存細胞数を定量した。各条件の3ウェルずつの残存細胞数の平均と標準誤差を算出し、モックのウェルを100とした相対残存細胞数をグラフ化した。代表例として、H P V 1 6 陽性がん細胞株S i H a、S C C 9 0と、正常子宮頸部上皮細胞株H C K 1 Tの結果を図29に示す。

[0231] 試験の結果、S e t 2－P G K－N C 9により、すべてのH P V 1 6 陽性細胞株の増殖が顕著に抑制された。また、E 6 E 7 発現やH P V ゲノムコピー数の低下も認められた。そして、正常上皮細胞に対する細胞毒性はほとんどないことも確認された。

[0232] （試験例5）

[C B－N C 9 アデノウイルスベクターと、S e t 2（N 7 H 1 B 1 P 1）アデノウイルスベクターとを共感染した場合のH P V 1 6 ゲノムの欠失]

C B－N C 9（又はC B－C a s 9）を搭載したアデノウイルスベクター

と、ガイドRNAとしてSet 2 (N7H1B1P1、試験例4参照)を搭載したアデノウイルスベクターとをSiHa細胞にMOI=500で感染させ、3日後にゲノムDNAを回収した。標的配列より広い領域を以下のプライマーを用いPCRで増幅し、ナノポアシーケンサーで解析した。アガロースゲル電気泳動の結果(図30)と一致して、大部分の配列は大きな欠損を有しておりE6E7の遺伝子発現ができない状態になっていることが確認された。

<プライマー>

- ・ 4816__HPV16-141F
caggagcgacccagaaagtacc (配列番号89)
- ・ 4814__HPV16-1135R
tcactaagtggactacccaa (配列番号90)

[0233] (試験例6)

[Set 2-PGK-NC9とSet 2-EFd-NC9の性能比較]

試験例4と同様にして、4組8個のgRNA (Set 2)を搭載した一体型アデノウイルスベクター (Set 2-PGK-NC9)を調製した。

また、アデノウイルスベクターとして図27に記載のものを用い、4組8個のgRNA (Set 2)を搭載した一体型アデノウイルスベクター (Set 2-EFd-NC9)を調製した。なお、gRNAは、E1と、E4に分けてそれぞれ4個配置した。

1,000個/ウェルで96ウェルに播種したSiHa細胞に、Set 2-PGK-NC9又はSet 2-EFd-NC9アデノウイルスベクターをMOI=0、2、4、8、16、32、63、128、256、512、1,024、又は2,048で感染し、11日後に固定し、Acid Red法で相対残存細胞数を定量し、グラフ化した(図31)。値はトリプリケートの平均と標準誤差を示す。

また、グラフから求めたIC50とIC90の値は、下記のとおりであり、約4~6.5倍ほどSet 2-EFd-NC9の活性が高いことが確認

された。

- ・ S e t 2 - E F d - N C 9
I C 5 0 . . . 4 0
I C 9 0 . . . 2 5 6
- ・ S e t 2 - P G K - N C 9
I C 5 0 . . . 2 5 6
I C 9 0 . . . 1 , 0 2 4

[0234] (試験例 7)

[H P V 1 6 陽性がん細胞に対する一体型ベクター (S e t 2 - P G K - N C 9) の効果]

試験例 4 と同様にして、4 組 8 個の g R N A (S e t 2) を搭載した一体型アデノウイルスベクター (S e t 2 - P G K - N C 9) を調製した。この一体型アデノウイルスベクターを以下の細胞株に感染させ増殖抑制効果を調べた。

- ・ H P V 1 6 陽性子宮頸がん細胞株
S i H a、S K G I I I b
- ・ H P V 1 6 陽性中咽頭がん細胞株
U M - S C C - 1 0 4、V U 1 4 7 T
- ・ 子宮頸部由来正常上皮細胞
H C K 1

[0235] 増殖抑制効果は、下記のようにして試験した。

各細胞を 9 6 ウェルプレートに 1, 0 0 0 個／ウェルとなるように 1 2 ウェルに播種し、翌日一体型アデノウイルスベクター (S e t 2 - P G K - N C 9) を M O I = 0 から M O I = 1, 5 0 0 の 7 段階でトリPLICATEとなるよう感染し、M O I = 0 でモック感染したウェルがコンフルエントになった 1 0 日から 1 4 日後にメタノール固定し、A c i d R e d 法で相対残存細胞数を定量した。各条件の 3 ウェルずつの残存細胞数の平均と標準誤差を算出し、モックのウェルを 1 0 0 とした相対残存細胞数をグラフ化した。結

果を図32に示す。

[0236] (試験例8)

[HPV16陽性がん細胞に対する一体型ベクター (Set A-EF d-NC9) の効果]

4組8個のgRNA (P1B1H1Z1、下記参照、なお、gRNAは、E1と、E4に分けてそれぞれ4個配置した。) を搭載した以外は、試験例6と同様にして、一体型アデノウイルスベクター (Set A-EF d-NC9) を調製した。この一体型アデノウイルスベクターを以下の細胞株に感染させ増殖抑制効果を調べた。

(1) P1

- ・ センス鎖を標的配列とするgRNA発現カセット

16__S753G

標的配列 : GCAAGTGTGACTCTACGCTT (配列番号3)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とするgRNA発現カセット

16__AS706g+

標的配列 : gATATTGTAATGGGCTCTGTC (配列番号11)

(2) B1

- ・ センス鎖を標的配列とするgRNA発現カセット

16__S563g+

標的配列 : gAACCAGCTGTAATCATGCA (配列番号7)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とするgRNA発現カセット

16__AS507G

標的配列 : GCAACAAGACATACATCGAC (配列番号8)

(3) H1

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S893G

標的配列 : GCAGGTACCAATGGGGAAGA (配列番号 12)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS859G

標的配列 : GGATCAGCCATGGTAGATTA (配列番号 13)

(4) Z1

- ・ センス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__S1471g+

標的配列 : gACTAAAACTAGTAATGCAA (配列番号 14)

- ・ アンチセンス鎖を標的配列とする gRNA 発現カセット

16__AS1438g+

標的配列 : gACATTTTAAAATATTTGTAAG (配列番号 15)

[0237] <細胞株>

- ・ HPV16 陽性子宮頸がん細胞株

SiHa、SKGIIIb

- ・ HPV16 陽性中咽頭がん細胞株

UM-SCC-104、VU147T

- ・ 子宮頸部由来正常上皮細胞

HCK1

[0238] 増殖抑制効果は、下記のようにして試験した。

各細胞を 96 ウェルプレートに 1,000 個/ウェルとなるように 12 ウェルに播種し、翌日一体型アデノウイルスベクター (Set A-EFdn-NC9) を MOI=0 から MOI=1,500 の 7 段階でトリPLICATEと

なるよう感染し、 $MOI = 0$ でモック感染したウェルがコンフルエントになった10日から14日後にメタノール固定し、*Acid Red*法で相対残存細胞数を定量した。各条件の3ウェルずつの残存細胞数の平均と標準誤差を算出し、モックのウェルを100とした相対残存細胞数をグラフ化した。結果を図33に示す。

[0239] (試験例9)

[オフターゲット候補配列の選択と検出]

8個のガイドRNAについてオフターゲット切断の可能性が高いと思われる12個のオフターゲット配列#1～#12を選んだ。PAM側の12塩基(シード配列)が完全一致し、残りの8塩基のうちミスマッチが4塩基以下のものを*CRISPR Direct*により選択した。そのうちY染色体配列の配列とCTリッチな1カ所を除き、10カ所のオフターゲット効果をアンプリコンシーケンシングにより検出を試みた。

<PCRに用いた配列>

- ・ #1 (ガイドRNA : 16__AS443g+)

\$1F

TCATAGAGTTCTCTCTTAATTCTTTC (配列番号

91)

\$1R

TAAACTGGAGTTACCATTTATGTAAAAG (配列番号

92)

- ・ #2 (ガイドRNA : 16__AS443g+)

\$2F

ATCTGCAAACGCAGTCAGACCTTCATC (配列番号

93)

\$2R

TTGAAAAGTCACTGTAGTTGCCAGTGG (配列番号

94)

- ・ #3 (ガイドRNA : 16__S486G+)
\$3F
ACAGCAAAAAGCAGCAGACTAAAC (配列番号95)
)
\$3R
GCGAAGTTGCAATGCCATCTTTC (配列番号96)
- ・ #4 (ガイドRNA : 16__S486G+)
\$4F
GTTGGCTCACAGGACATCACTTAC (配列番号97)
)
\$4R
TAAAATGATACAGCCATTCTGGAAAAC (配列番号98)
- ・ #5 (ガイドRNA : 16__AS563g+ (gAACCCAGCTGTAATCATGCATGG (配列番号99)))
\$5F
CACACAAATGTTTCATTTTACACAAATG (配列番号100)
\$5R
CTGGCTTCTTTTACTCAGCATAGC (配列番号101)
- ・ #6 (ガイドRNA : 16__AS706g+)
\$6F
TGAGAGCTTGAGTATAAGAGTGCTTAC (配列番号102)
\$6R
GTTAGACGTGACTAATGTAAAATGG (配列番号103)

・ #7 (ガイドRNA : 16__AS706g+)

\$7F

CTCTTCAGGCCTGTGCCCTCTGCAAC (配列番号
104)

\$7R

ACGGACATAGCCTGACCCAGGCTGG (配列番号1
05)

・ #8 (ガイドRNA : 16__AS859G)

\$8F

GGGAATAGGGAAAACCTCATTGCTAAAAT (配列
番号106)

\$8R

CAGCCACAGTTATGGTTTCTACTTGG (配列番号
107)

・ #9 (ガイドRNA : 16__S893G)

\$9F

AAGATAAATGTTTCCTATGCAAGTTTAC (配列
番号108)

\$9R

TAATGGTCATTATTAATGAGAGCTGTTC (配列
番号109)

・ #10 (ガイドRNA : 16__S893G)

\$10F

GCAAATATTAATCAGGCTCTGACCATG (配列番
号110)

\$10R

CCTCTCTAAGTTCCAAAGTCTTGAAC (配列番号
111)

[0240] その結果、C a s 9 使用時には \$ 3 で 4 2 %、\$ 9 で 0. 0 0 5 % のオフターゲット変異が検出された。一方、C a s 9 ニッカーゼ使用時には \$ 3 におけるオフターゲット変異は C a s 9 使用時の 1 / 1, 0 0 0 以下であり、\$ 9 ではオフターゲット変異は検出されなかった。なお、\$ 1、\$ 2、\$ 4 ~ 6、\$ 7、\$ 8、\$ 1 0 では、C a s 9 及び C a s 9 ニッカーゼのどちらもオフターゲット変異は検出されなかった。

[0241] (試験例 1 0 : アデノウイルスベクターゲノム上の 8 個連続及び 1 2 個連続のガイド RNA 発現ユニットの安定性)

8 個連続及び 1 2 個連続のガイド RNA 発現ユニットを E 4 部位に組み組んだベクター (図 3 4 ~ 3 5 (A x g 8 H B V - D R 2、A x g 1 2 H B V - D R 2 - D R 1) ; K a t o Y e t a l. , I n t J M o l S c i, 2 2 : 1 0 5 7 0, 2 0 2 1) 各 6 クローンの初代継代ストックを 2 9 3 細胞に感染し、細胞全ゲノム DNA を B s p E I で切断し電気泳動を行った。アデノウイルスゲノムは細胞あたり数千万コピーに増幅するため、ウイルス DNA を分離することなくウイルスゲノム由来のバンドを見ることができる。結果を図 3 6 ~ 3 7 に示す。8 個連続ユニットの場合 (図 3 6) はクローン 1、4 及び 6 でユニットが欠失あるいは増幅により生じたバンド (星印) が明らかに認められた。一方、クローン 2、3 及び 5 では、ユニットが欠失あるいは増幅により生じたバンドは認められず、8 連続ユニットに対応するバンド (四角で示す) はこの段階ではほぼ安定と考えられた。1 2 個連続ユニットの場合 (図 3 7) は 6 クローン中 4 クローンで欠失あるいは増幅による濃いバンドが見られた。クローン 2 及び 6 では欠失等による明らかなバンドは認められなかった。

なお、ガイド RNA 発現ユニットの構成は、下記のとおりとした。

U 6 プロモーター-標的塩基-ガイド RNA 土台

U 6 プロモーターの配列は、下記のとおりとした。

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

TTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAA
CACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGA
AAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTTAA
AATTATGTTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTAC
CGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTA
TATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (配列番号 112)

ガイドRNA土台の配列は、下記のとおりとした。

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG
GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCG
AGTCGGTGCTTTTTTTTG (配列番号 113)

標的塩基の配列は、下記のとおりとした。

・ 8個連続のガイドRNA発現ユニット

- (1) GAAGCGAAGTGCACACGGTC (配列番号 114)
- (2) GAGGTGAAGCGAAGTGCACA (配列番号 115)
- (3) GGTTTCCATGCGACGTGCAG (配列番号 116)
- (4) GACCTGGTGGGCGTTTCACGG (配列番号 117)
- (5) GTCCTTATATAAGAGGACTCT (配列番号 118)
- (6) GACCTTGGGCAAGACCTGGT (配列番号 119)
- (7) GTCCTCTTATATAAGACCTT (配列番号 120)
- (8) GATGTCAACGACCGACCTTG (配列番号 121)

)

- ・ 12個連続のガイドRNA発現ユニット

8個連続のガイドRNA発現ユニットの後に、下記の標的塩基を含むガイドRNA発現ユニットを配置した。

(9) GCAGAGGTGAAAAAGTTGCA (配列番号122

)

(10) GACATGAACATGAGATGATT (配列番号12

3)

(11) GCTGTGCCTTGGGTGGCTTT (配列番号12

4)

(12) GAAGCTCCAAATTCTTTATA (配列番号12

5)

[0242] そこで8連続ユニット及び12連続ユニットで比較的安定と思われるクローン5及びクローン6をそれぞれ選択し、ウイルスストックを293細胞に感染して第3継代ストック(3rd)及び第4継代ストック(4th)を調製し同じ方法で検討した(図38～39)。12連続ユニットが完全に保たれているベクターのゲノムからは5.5kbのDNAが生じるが、ユニットが欠失しているベクターのゲノムからはこのDNAは生じない。従ってユニットが欠失したベクターが含まれているストックは5.5kbのバンドの濃さが減少する。図39の12gRNAsの3rd及び4thのレーンでは5.5kbのバンドの濃さはその下の「A」で示すアデノゲノムバックボーン由来のバンドに比べて3分の1以下に減少しており、大多数のベクターでは12個のユニットは欠失のため保たれていないことが示された。この結果によりこのベクターを実験に用いることは断念した。一方8連続ユニットの場合(図38の8gRNAs)は8個の完全ユニットを示すバンドは3.8kbであるが、濃さは保たれているものの定量的結果本来の濃さよりやや薄くなっていた。従って8連続ユニットの場合も少し欠失が起こったことが示された。なお4連続の場合は意図的に選択したクローン以外では欠失が検出さ

れていない (Kato Y et al., Int J Mol Sci, 22:10570, 2021)。

[0243] (試験例 11: ガイド RNA 発現ユニットが 10 個連続の場合の安定性)

ガイド RNA 発現ユニットが 10 個連続のベクター (図 40) の場合を同様に検討した。切断する酵素は Sma I を用いた。10 個連続のバンドは 4.3 kb であり、その下にあるベクターバックボーン由来のバンド (「A」で示す) と濃さを比較することにより欠失が検出できる (図 41)。6 クローンのうちクローン 3 及び 4 以外では 4.3 kb のバンドはその下のバンドより上にあるにもかかわらず薄くなっており、欠失が起きていることが示された。比較的安定と思われたクローン 4 を選択し、第 3 継代ストック及び第 4 継代ストックを調製し同様の実験を行ったところ (図 42) バンドの太さがやや減少していた。10 個連続では欠失が起こることが示された。

なお、ガイド RNA 発現ユニットの構成は、下記のとおりとした。

U6 プロモーター-標的塩基-ガイド RNA 土台

U6 プロモーターの配列は、3' 端を GGATCC (BamHI、配列番号 156) とした以外は、配列番号 112 と同様とした。

ガイド RNA 土台の配列は、試験例 10 と同様に、配列番号 113 とした。

標的塩基の配列は、下記のとおりとした。

(1) GGCGCCTCCTGAGCACACGG (配列番号 126)

(2) GTGATCTGCGATGGCTGCAA (配列番号 127)

(3) GAAGAAGCTCGAAACTGGAA (配列番号 128)

(4) gAGTTGAAGAGCTGCTTACTA (配列番号 129)

(5) GTGGGGCTTCATCAACGACA (配列番号 130)

)

(6) GAGCAAAACGACTAGCTGCC (配列番号 1 3 1

)

(7) GGGCAAAGTAACCCACATGA (配列番号 1 3 2

)

(8) gCAACAAATCAGCTAAACAGC (配列番号 1 3

3)

(9) GTTCAGACACGATGCCCAAC (配列番号 1 3 4

)

(10) GCAGCTCAAGCTGAACTCCAG (配列番号 1

3 5)

[0244] (試験例 1 2 : ガイドRNA発現ユニット 1 0 個を 2 個と 8 個に分割して組み込んだベクターによる 5 遺伝子の同時ノックアウト)

試験例 1 1 における 1 0 個のガイドRNA発現ユニットのうち 2 個 (配列番号 1 3 4、配列番号 1 3 5) を E 1 部位、8 個 (配列番号 1 2 6 ~ 配列番号 1 3 3) を E 4 部位に組み込んだベクターを作製し (図 4 3)、1 0 連続の場合と同様に検討した。8 連続ユニットを含む 4. 3 k b のバンドは 6 クローン全てにおいてその下のバンドと比較してやや濃さが減少していた (図 4 4)。減少が少ないと思われるクローン 2 及び 5 のうち前者を選択し、第 3 継代ストック及び第 4 継代ストックを調製し同様の実験を行ったところ (図 4 5)、バンドの太さがやや減少していた。従って 1 0 個のユニットを 2 個と 8 個に分けて組み込んだ場合は、少なくとも 8 個連続の組み込み部分では少し欠失が起こっていた。この結果は試験例 1 0 の結果と矛盾しない。

[0245] (試験例 1 3 : ガイドRNA発現ユニット 1 0 個を 2 個と 8 個に分割したベクターによる 5 遺伝子の同時ノックアウト)

試験例 1 2 で用いた 1 0 個のガイドRNAが実際に遺伝子をノックアウトできる活性を持つかどうかを検討した。1 0 個のガイドRNAは 2 個ずつが組になり、5 遺伝子 (p 6 2、NBR 1、OPTN、TAX1BP1、ND

P 5 2) のダブルニッキング切断を行うように設計されている。試験例 1 2 で用いた 2 個及び 8 個に分割したユニットを持つベクターを、C B プロモーターにより C a s 9 を発現するベクター (A x C B C a s 9) 又は C a s 9 ニッカーゼを発現するベクター (A x C B N C 9) (N a k a n i s h i T e t a l. , S c i R e p, 1 1 : 3 9 6 1) と混合し、H e p G 2 細胞に共感染を行い、3 日後に全細胞 D N A を抽出した。感染条件は両ベクターとも感染重複度 (m u l t i p l i c i t y o f i n f e c t i o n, M O I) 3 0 又は 6 0 で行った。次いでそれぞれの標的遺伝子について、切断部位を含む断片を P C R で増幅し、T 7 E 1 アッセイにより標的遺伝子に起こった挿入／欠失 (インデル (i n d e l)) を検出した。図 4 6 ~ 5 5 中、1stと 2ndは 2 回の独立した実験の結果であることを示す。

[0246] C a s 9 発現ベクターとの共感染では、C a s 9 により約 1 0 0 塩基程度に近接した 2 カ所の同時切断によりその間が欠失する場合と、個々のガイド R N A によりインデルが生成する場合の両方が起こる。T 7 E 1 アッセイによる効率は 3 2 % ~ 6 1 % であり、5 遺伝子の同時ノックアウトが確認された。

C a s 9 ニッカーゼ発現ベクターとの共感染では、4 遺伝子で 3 0 % ~ 5 5 % の効率で同時ノックアウトが確認された。ダブルニッキング切断では両方のガイド R N A が働いた場合のみで欠失が起きるため、この実験で 8 個のガイド R N A の活性が確認された。1 つの遺伝子 (N D P 5 2) では、C a s 9 では 4 0 % の効率が検出されたが、C a s 9 ニッカーゼでは切断が検出されなかった。このことから 2 つのガイド R N A のうち 1 つだけが活性を示したと考えられた。従ってこのベクターは本条件においてガイド R N A 1 0 個のうち 9 個の同時発現を行ったことが示唆された。

[0247] (試験例 1 4 : ガイド R N A 発現ユニット 1 2 個を 6 個 2 組に分割して組み込んだ場合の安定性)

1 2 個のガイド R N A 発現ユニットの 6 個を E 1 部位、別の 6 個を E 4 部

位に組み込んだベクターを作製し（図5 6）、2個と8個の場合と同様に2継代ストックを検討し、欠失が見られないクローンを選択して3継代ストック、第4継代ストック、及び第5継代ストックを調製し、B s p E I 及びN g o M I Vで切断した結果を図5 7及び5 8に示す。N g o M I V切断（図5 8）において、E 4部位の6個のユニットを含む2. 7 k bのバンドはその下のベクターバックボーン由来のバンドよりも3レーンともやや濃く、欠失が起きていないことが示された。またE 1部位については、B s p E I切断（図5 7）においてこの6個のユニットを含む6. 8 k bのバンドは、もし欠失がなければその下にあるバックボーン由来の4. 4 k bの1. 55倍の濃さになるはずである。実際の6. 8 k bのバンドの濃さは1. 55倍に比して十分に濃く、欠失は起きていても少ないと考えられた。しかし、第5継代ストック（レーン5 t h）ではよく見ると6. 8 k bの濃いバンドの下に階段状の薄いバンドがあり、1ユニットが約4 0 0塩基であることからユニットがいくつか欠失したDNAがわずかに存在することが示唆された。以上の結果からこのベクター上の1 2個のユニットの欠失は非常に少なく、第4及び第5継代ストックでも極めて安定に保たれていることが明らかとなった。

なお、ガイドRNA発現ユニットの構成は、配置位置及び標的塩基の配列を下記とした以外は、試験例1 1と同様の構成とした。

・ E 4 部位

- (1) g T C A G A G C G G C G C T T C T C G A A（配列番号1 3 6）
- (2) G A A G A T C C G A A A G A A T A C C（配列番号1 3 7）
- (3) G T A C T T C C T C T T G T C C A G A T C（配列番号1 3 8）
- (4) g C T A G T G C C C T C T G A C C T T A C（配列番号1 3 9）

(5) g T G A G C C A C A G T G A T A T C A G (配列番号 1 4 0)
)

(6) G A T C C A G C T T C C T T C T G A A A (配列番号 1 4 1)
)

・ E 1 部位

(1) g T G T A G C G C T C G A T G A T C A C C (配列番号 1 4 2)
)

(2) g T G A G A A G C A G C T G C C C G T C C (配列番号 1 4 3)
)

(3) G A T G C T G C T C T C G A A T A A G T (配列番号 1 4 4)
)

(4) G C A T C C A A C C A A A A T C C C G G T (配列番号 1 4 5)
)

(5) g T T T T G T T G G G G A A C T T T G C C (配列番号 1 4 6)
)

(6) g A A A T C C C G G T A A G A C A C C A C (配列番号 1 4 7)
)

[0248] 既に述べたように、12個のユニットを連続して持つベクターの第4継代ストックの5.5 kbのバンド(試験例10の図39の12 gRNAs、4 t h)の濃さは3分の1以下に減少しており、第4継代ストックで既に欠失ベクターの方がはるかに多く、実験に用いることができなかった。この12個のユニットを連続して持つベクターの結果を考えると、12個のガイドRNAユニットを6連続ずつ2カ所に分割して組み込むとほとんど欠失しないということは驚くべき結果であり、多重ガイドユニットの欠失問題は少なくともこの実験系において解決されたといえる。

[0249] 試験例12において、多重ガイドユニットを2分割してもその1つが8連続の場合は少し欠失していた。この結果と考え合わせると、ベクターゲノム上では連続ユニットが欠失しないのは少なくとも6個までであるということ

が示唆された。

[0250] (試験例 15 : EF1 α プロモーターを用いた一体型ベクターにおける 8 連続ガイド RNA ユニットの安定性)

HPV DNA を標的とする一体型ベクターでは 8 連続ガイド RNA 発現ユニットに加えて CB プロモーター又は PGK プロモーターから Cas9 ニックアーゼを発現するユニットが組み込まれている。そして Cas9 ニックアーゼを CB プロモーターから発現させた場合には少し欠失が起こり、PGK プロモーターを用いた場合には欠失があまり起こらないという結果であった。本試験例では Cas9 ニックアーゼ発現プロモーターとして上記した短縮された EF プロモーター (配列番号 87) (EFd プロモーター) から Cas9 ニックアーゼを発現するユニット (EFdNC9) を持つ一体型ベクターを製作して用いた (図 59)。

なお、ガイド RNA 発現ユニットの構成は、配置位置及び標的塩基の配列を下記とした以外は、試験例 11 と同様の構成とした。

・ E4 部位

(1) GCAACAAGACATACATCGAC (配列番号 148)

(2) gAACCCAGCTGTAATCATGCA (配列番号 149)

(3) GAAAAGGTTACAATATTGTA (配列番号 150)

(4) GCAAGTGTGACTCTACGCTT (配列番号 151)

・ E1 部位

(1) GGATCAGCCATGGTAGATTA (配列番号 152)

(2) GCAGGTACCAATGGGGAAGA (配列番号 153)

(3) g A C T A A A A A C T A G T A A T G C A A (配列番号 1 5 4)

(4) g A C A T T T T A A A A T A T T T T G T A A G (配列番号 1 5 5)

[0251] 初代ベクターストックを用いた検討 (図 6 0) では、8 重ユニットを含む 2. 6 k b のバンドの濃さをそのすぐ下のゲノムバックボーン由来のバンドの濃さとの比較により、クローン 1、5、6 では濃さの減少はほぼ見られなかったが、他の 3 クローンでは減少し欠失が認められた。そこでクローン 5 を選択し、第 3、第 4 及び第 5 継代ストックを調製し検討したところ、特に第 5 継代ストックにおいてバンドの濃さは半分以下に減少していた (図 6 1、レーン 5 t h)。

[0252] (試験例 1 6 : E F 1 α プロモーターを用いた一体型ベクターにおいて 8 個のガイド RNA 発現ユニットを 4 個 2 組に分割して組み込んだ場合の安定性)

8 個のガイド RNA ユニットのうち 4 個をニッカーゼ発現ユニットとともに E 1 部位へ、他の 4 個を E 4 部位に組み込んだベクターを作製し (図 6 2)、初代ストックを用いた検討を行った (図 6 3)。試験例 1 5 では 8 個のユニットは連続して 1 カ所に組み込まれているため制限酵素切断で 1 本のバンドに含まれているが、この試験例 1 6 では 4 個ずつ 2 カ所に組み込まれているため 2 つの異なるバンドに含まれている。B s p E I による切断で E 4 部位の 4 ユニットを含む 1. 9 k b のバンドはその下のバックボーン由来のバンドの濃さとの比較により 6 クローン全てにおいてほぼ減少を認めなかった。クローン 1 を選択して第 3、第 4 及び第 5 継代ストックを調製し検討したところ減少がほとんど見られなかった (図 6 4)。E 1 についても 4 ユニットを持つ 4. 7 k b のバンドとバックボーン由来の 4. 4 k b のバンドの濃さの比較から、欠失はほとんどないと考えられた。試験例 1 5 の図 6 1 のレーン 5 t h においてバンドの濃さは半分以下であったことを考えると驚くべき結果である。従って一体型においても、8 個のユニットを 4 個 2 組に分

割して組み込むことにより欠失を大幅に減少させることが可能であった。

[0253] (試験例 17 : 8 個のショートヘアピン RNA (shRNA) 発現ユニットを 4 個 2 組に分割して組み込んだ場合の安定性)

shRNA は 21 塩基のセンスストランド、約 9 塩基のループ、21 塩基のアンチセンスストランド及び転写終始ポリ U からなる約 60 塩基の RNA で、細胞の核内でプロセスされて単独のアンチセンス RNA となり、mRNA や RNA ウイルスゲノムと対合することにより発現抑制あるいは RNA ウイルスの増殖阻止を行う。アデノウイルスベクターゲノムに組み込まれた発現ユニットは 4 個まで報告があるが、ガイド RNA と異なり 21 基のパリンドロームによる強固な 2 次構造のため、4 個を超える多重ユニットを持つアデノベクターが作製可能であるかどうかは不明であった。

[0254] 8 個の shRNA 発現ユニットの 4 個を E1 部位、別の 4 個を E4 部位に組み込んだベクターを作製し (図 65)、多重ガイド RNA の場合と同様に 2 継代ストックを検討した (図 66)。8 ガイド RNA の場合は分割した 4 ユニットの欠失が見られることはほとんどないが、少なくともこの shRNA については 6 クローン中 4 クローンにおいて、BspEI 切断により E1 部位由来の 5.8 kb のバンドの上下に 4 ユニットで欠失あるいは重複による星印で示すバンドが見られた。この結果は shRNA の場合は多重ユニットが不安定な場合があることを示している。

[0255] この 6 クローンのうち欠失が見られないクローン 5 を選択して 3 継代ストック、第 4 継代ストック、及び第 5 継代ストックを調製し SmaI で切断した結果を図 67 に示す。E1 部位由来の 2.4 kb、E4 部位由来の 2.1 kb のどちらのバンドも近傍のバックボーン由来のバンドと比較して、濃さの減少は見られなかった。従って多重 shRNA ユニット 2 分割法を用いれば第 5 継代ストックでも多重ユニットは極めて安定に保たれていることが明らかとなった。

[0256] (試験例 18 : 8 個のガイド RNA 発現ユニットを 4 個 2 組に分割して組み込んだ一体型ベクターによる in vivo 増殖抑制効果の検討)

SCC90細胞はHPV DNAを染色体上に約300コピーもつヒト舌がん由来の細胞であり、HPVのE6及びE7の遺伝子の発現によりヌードマウスに腫瘍を形成する。

本試験例では、3匹のヌードマウスにSCC90細胞のゼノグラフト（種が異なる細胞のシート）を4カ所に移植した。次いでHPVのE6及びE7遺伝子を標的とする上記試験例8に記載の一体型アデノウイルスベクター（Set A-E F d N C 9）を21日目から1日ごとに3回、27日目から4回、33日間から5回の腫瘍内投与を行なった（図69中の下向き矢印）。1回のベクター投与量はそれぞれ合計 6×10^{10} p f u、 8×10^{10} p f u、 1×10^{11} p f uとした。

なお、用いたガイドRNAの標的塩基配列は配列番号148から配列番号155である。

[0257] 41日目のマウスを図68に示す。ベクターの代わりにPBSを投与したコントロールマウス（図68中、「PBS」）と比較して3匹（図68中、「AdV-1」、「AdV-2」、「AdV-3」）とも明らかに腫瘍のサイズが縮小し、顕著な腫瘍増殖抑制効果を認めた。また腫瘍の大きさを経時的に測定した結果を図69に示す。図69中、○は「AdV-1」、△は「AdV-2」、□は「AdV-3」、■は「PBS」の結果を表す。38日目、41日目においてベクターを投与したマウスの腫瘍サイズは有意に縮小していた。以上から、8個のガイドRNA発現ユニットを4個2組に分割して安定に持つベクターの顕著な腫瘍増殖抑制効果が示された。

[0258] （試験例19：8個のガイドRNA発現ユニットを6個と2個に分割して持つフェニルケトン尿症モデルマウスの治療実験に用いたベクターの構造）

フェニルケトン尿症（phenylketonuria, PKU）の白人における発生頻度は9,000人に1人であり、その患者数は欧米だけで15万人である。変異酵素はフェニルアラニン水酸化酵素であり、モデルマウスではフェニルアラニンがセリンに変異した「TIC」→「TCC」の1塩基変異である。また代謝異常疾患の遺伝病では、疾患により異なるが一般的

に酵素活性が正常の 1 / 10 でも日常生活に支障がない場合が多いため、ノックイン効率が 10 % なら実質治癒、5 % なら症状改善が期待される。従って本研究でもノックイン効率 5 % を目標とした。

[0259] 実験には図 70 ~ 71 に示す構造の 2 種類のノックインベクター、すなわち「g (6 + 2) ベクター」(図 70) 及び「DN (3 + 1) ベクター」(図 71) を作製して用いた(「DN」はダブルニッキングを行う 2 個のガイド RNA を示す)。2 つのベクターは共通して 4 kb の大きなドナー DNA を有し、置換すべき正常アミノ酸配列を中央部位に持つ。またどちらも 8 個のガイド RNA 発現ユニットを、E4 部位に 6 個、E1 部位に 2 個に分割して保持する。なお、これらのベクターには、E4 部位及び E1 部位に搭載するガイド RNA 発現ユニットの数を変え、Cas9 ニッカーゼ発現ユニットを搭載しなかった以外は、図 27 に記載のアデノウイルスベクターを同じものを使用した。

[0260] 「g (6 + 2) ベクター」は、本来の Cas9 を発現するベクター「AxCas9」との共感染により、ダブルニッキングを用いずに 1 箇所を高効率に切断し、ノックイン置換を行う。E4 部位にはドナー DNA と共に、後述の 5 種類のガイド RNA (ガイド a ~ e) の中で最も効率が高かったガイド d を 6 個全ての発現ユニットで用いた。従って 6 個の発現ユニット(「6 ガイド」)の塩基配列は同じである。

[0261] またドナー DNA の端を切断するとノックイン効率が上がるということが知られている (Irion U et al., Development, vol. 141: 4827-4830, 2014)。そこで、「g (6 + 2) ベクター」及び「DN (3 + 1) ベクター」は E1 部位にこの切断を行う 2 個のガイド RNA を発現する 2 つのユニットを持ち、図 70 ~ 71 の縦の矢印で示す位置でドナー DNA の左端を切断する。2 つのガイド RNA はオーバーラップしており、その標的塩基配列を以下に示す。

末端切断 1 : g A A C G G C G T C A A T T G C A T G C A (配列番号 157)

末端切断 2 : g C G T C A A T T G C A T G C A A G G T C (配列番号 1 5 8)

[0262] 「DN (3 + 1) ベクター」が有する 8 個のガイド RNA 発現ユニットのうち、2 個は E 1 部位にあり、ドナー DNA の左端をダブルニッキングで切断するガイド (末端切断 b 及び末端切断 t) である。6 個は E 4 部位にあり、2 個 1 組でダブルニッキング切断を行う 3 組のペアからなる。この 3 組は、図 7 2 に示すように変異塩基近傍を標的として複数切断する (変異部位を右端に示す)。このベクターは Cas 9 ニッカーゼを発現するベクター「A × NC 9」と共感染で使用する。ダブルニッキングに用いるペアのガイド RNA の 5' 端間の長さをオフセットと呼び、3 組のダブルニッキングはオフセット長の違いにより、「ダブルニッキング 1」、「ダブルニッキング 2」、「ダブルニッキング 0」と呼ぶ。またガイド RNA をガイド a ~ e と呼ぶ (図 7 2)。

[0263] なお、図 7 2 に記載した正常配列は、マウスのフェニルアラニン水酸化酵素をコードする遺伝子の第 4 8, 4 2 4 ~ 4 8, 5 0 0 番目の塩基配列である (下記配列番号 1 7 8)。

T T C C G C C T C C G T C C T G T T G C T G G C T T A C T G T C G T
C T C G A G A T T T C T T G G G T G G C C T G G C C T T C C G A G T
C T T C C A C T G (配列番号 1 7 8)

また、図 7 2 に記載の制限酵素 (A v r I I、S t u I) 部位を含む配列は、「C C T A G G A G G C C T A G」 (配列番号 1 7 9) である。

[0264] 以上のガイド RNA の標的塩基配列を以下に示す。なお「ガイド d」は「ダブルニッキング 2」の表鎖であるが、「g (6 + 2) ベクター」で単独切断を行う 6 個のガイド RNA と同一である。

ガイド a : G T A A G C C A G C A A C A G G A C G G (配列番号 1 5 9)

ガイド b : G A C G A C A G T A A G C C A G C A A C (配列番号 1 6 0)

ガイドc : gCTGTCGTCTCGAGATTTCTT (配列番号161)

ガイドd : gTCGTCTCGAGATTTCTTGGG (配列番号162)

ガイドe : gTCGAGATTTCTTGGGTGGCC (配列番号163)

末端切断b : gCTTTATCATCCACATGCCTG (配列番号164)

末端切断t : gCAAATAAATGTTTCTGTCAA (配列番号165)

[0265] (試験例20: PKUマウス治療実験に用いた8個のガイドRNA発現ユニットを6個と2個に分割して持つガイドRNA発現ユニットの安定性)

「g(6+2)ベクター」について、第3次、第4次、第5次及び*in vivo*実験用精製ストック(以下、「purify」と称することがある。)を少量ずつ293細胞に感染し、感染細胞DNAを調製してClaIとNruIで同時切断した結果を図73に示す。E1部位由来の1.3kbのバンドはバックボーン由来のバンドと比較して濃さの減少は認められなかったが、E4部位に組み込まれた6個のユニットを含む5.3kbのバンドは減少が認められた。この減少は「g(6+2)ベクター」と「DN(3+1)ベクター」に特異的であり、他の20個近くの構築物では見られていない。原因は明らかではないが、「g(6+2)ベクター」、「DN(3+1)ベクター」に特異的であることから、後述のドナーDNA下流領域DNAにある異常構造が強固な2次構造を引き起こして6重ガイドユニットのゲノム複製を阻害していることが考えられた。6重ユニットの位置がこのドナーDNA下流領域の異常構造の位置と極めて近接していることがこの原因を示唆している。

[0266] (試験例21: PKU治療用ノックインベクターの*in vitro*における変異位置の上流及び下流でのノックイン効率の検討)

実験の概略を図 7 4 に示す。「P K U マウス変異 P A H 配列」における「m」は P K U 変異を持つ細胞株上の配列であり、図 7 2 に記載の正常マウス塩基配列に P K U 変異（T→C）の 1 塩基を四角内に加えたものとなる。もしノックイン効率を *i n v i t r o* で検討するための細胞株としてマウス由来細胞を用いると、本体の宿主がヒト細胞であるアデノベクターの導入効率が低いだけでなく、将来の *e x v i v o* 治療モデルとのノックイン効率の比較を行うためにはヒト細胞である必要がある。そこでその細胞株として、モデルマウスの組織から P K U 変異を中央に持ちドナー DNA 断片より上流下流とも少し広い 4 k b 超の断片を P C R 法により調製し（「P K U マウス変異 P A H 配列」における黒太線）、その断片を染色体に有するヒト H e p G 2 細胞株（P A H / H e p G 2 細胞株）を作製した。P A H は遺伝子名である。

[0267] また図 7 4 中段（「ドナー DNA」）に治療用ベクターが保持するドナー DNA を黒太線で示す。もしドナー断片としてマウスの正常断片又は上記の P A H / H e p G 2 に組み込んだ DNA で変異 1 塩基を正常化したものをドナー DNA として用いると、P K U モデルマウスの配列と標的 1 塩基しか違わないため、ノックイン効率を調べるのが容易ではない。また正常断片を用いると、多重ガイド RNA の標的配列がドナー DNA を切断してしまうという問題がある。そこでドナー DNA は P K U 変異塩基が正常塩基であるだけでなく、ドナー配列の中に 4 塩基の人工変異を持つように設計した（図 7 4 における「ドナー DNA」及び「修復配列」の中央四角内の「4 n」、及び図 7 2 右下（「ドナーにおける変化」の C、A、A、A の 4 塩基）。図 7 5 に、その人工変異から P K U 変異（最後の塩基 c）までを四角文字で示す。

図 7 5 中、上段から順に、P K U マウスのアミノ酸配列（配列番号 1 8 0）、P K U マウスの塩基配列（配列番号 1 8 1）、ドナーの塩基配列（配列番号 1 8 2）、ドナーのアミノ酸配列（配列番号 1 8 3）を表す。なお、A v r I I、S t u I は、各制限酵素部位を表す。

P K U マウスのアミノ酸配列 : F L G G L A F R V S（配列番号 1 8 0

)

PKUマウスの塩基配列 : TTCTTGGGTGGCCTGGCCTT
CCGAGTCTcC (配列番号181)

ドナーの塩基配列 : TTCCTAGGAGGCCTAGCCTTCCG
AGTCTTC (配列番号182)

ドナーのアミノ酸配列 : FLGGLAFRVF (配列番号183)

[0268] この人工変異はアミノ配列を変えずにAvrIIとStuIの切断配列を有することで、ノックインによる修復に成功した細胞DNAはこの制限酵素部位を持つことになり、その検出を容易にする。またこの4塩基はドナーDNAだけにある特異的配列であるためマウスゲノムとの相補性を持たず、ドナーDNAだけを検出するPCRプライマーの設計を可能とする。さらに、4塩基のうち3塩基(C、A、A)は治療用ガイドRNAであるガイドc、d、eの20塩基の標的配列と重なるため、これらのガイドRNAがドナーDNAを切断することを防いでいる。

[0269] PAH/HepG2細胞株に、「g(6+2)ベクター」又は「DN(3+1)ベクター」と、「Cas9発現ベクター」又は「Cas9ニッカーゼ発現ベクター」とをそれぞれMOI 10で感染し、3日後に全細胞DNAを抽出して、PCRでの検討をドナーの4塩基変異の上流及び下流に分けて行なった。上流及び下流の結果はそれぞれLアーム領域及びRアーム領域での相同組換えによるノックイン効率を示唆する。用いたPCRプライマーの塩基配列を以下に示す。上流リバースプライマー及び下流フォワードプライマーは下線で示した4塩基のドナーDNA特異的人工塩基配列を保持しており、マウスDNAと対合しない。従ってこのPCRは正常化される前のマウスDNA配列を検出せず、目的の正常化されたドナー配列だけを検出する。

上流プライマー140F : ACAATATGAACCAACAAGTACCTCC (配列番号166)

上流プライマー115R : CGGAAGGCTAGGCCCCCCTAG (配列番号167)

下流プライマー 113F : GAGATTTTCCTAGGAGGCCTA
(配列番号 168)

下流プライマー 143R : CCATGATCCCAGCTAGCCAT
CTGTG (配列番号 169)

[0270] PCRの結果を図76に示す。「g(6+2)ベクター」、「DN(3+1)ベクター」とも上流領域と下流領域とでノックインによるバンドが検出された(上流領域の*印はマウスゲノム由来の非特異的なバンドである)。ベクター同士の比較では、「DN(3+1)ベクター」によるバンドは上流下流ともに「g(6+2)ベクター」より薄く(バンドの左右の比較)、この実験においては3カ所のダブルニッキング切断よりもガイドdの6ガイドRNAによる切断の相加効果の方が、効率が高いことが示唆された。従ってこの後の検討は「g(6+2)ベクター」のみで行うことにした。

[0271] 意外なことに、「g(6+2)ベクター」でも「DN(3+1)ベクター」でも上流領域のノックイン効率と下流領域のノックイン効率に差があり(バンドの上下の比較)、下流の効率は上流の効率の半分以下あるいはさらに低いことが示された。この実験は定量実験ではないが、上流ノックインを行なった分子のかなりの部分が、Rアーム領域内で起きたリアレンジのため、下流プライマーの位置まで到達できていないことが示唆された。実際に、Rアーム領域では制限酵素切断ができない、次の実験で下流プライマー143Rが働かない、あるいは別の実験で一本鎖DNAの存在が示唆されるなど、異常な立体構造が示されており、下流領域のノックイン効率の低下を来している可能性が考えられた。

[0272] (試験例22:変異塩基位置の上流下流領域全体のin vitroにおけるノックイン効率の検討)

変異位置の上流と下流を合わせた全体のノックイン効率を検討するために、PAH/HepG2細胞に、「g(6+2)ベクター」と「Cas9発現ベクター」をそれぞれMOI=10となるように感染し、全細胞DNAを抽出した。そしてドナー配列の両外側にプライマーを設定したPCRを行い、

その全長PCR断片（4 kb超）を図72で示したS t u Iで切断して泳動することによりノックイン効率の定量を行なった。S t u I（A G G C C T（配列番号184））は図74下段のプライマー115 R及びプライマー113 Rの配列の中に含まれており、全長PCR断片をこの位置で切断する。また下流側のプライマー143 Rはこの実験では働かなかったため、その外側にプライマー193 Rを設定し使用した（図74下段）。その結果を図77に示す。またプライマー193 Rの塩基配列を以下に示す。

下流プライマー193 R : C A C A G G A C A G C C T C A T A G C T T G T C C（配列番号170）

[0273] S t u Iはノックインにより導入される。S t u Iにより全長DNAが切断されて生ずる2本のバンド（矢印）の濃さは、切断されないバンド（上方の濃いバンド）と比較して、ノックイン効率は約2.9%（n=3）であった。また非相同性阻害剤あるいは相同組換え促進剤であるバニリン、L755507、SCR7を用いたところ、わずかに効率が上昇した（図78～80）。さらに、「g（6+2）ベクター」と「C a s 9発現ベクター」の量比を変えて実験を行った結果、1：3の比率で約3.3%、1：9では約3.6%の効率でノックインが起きていることが示唆された（図81）。この結果からi n v i v oの実験においてはベクターの比率を1：3としてバニリンを用いることにした。

[0274]（試験例23：PKU治療用ノックインベクターのi n v i v oにおけるノックイン効率及び血中フェニルアラニン量の低下）

PKUモデルマウスの新生仔に、図82に示すタイムコースにより「g（6+2）ベクター」及び「C a s 9発現ベクター」を出生時に顔面静脈投与、8週目に尾静脈投与を行い、13週目に肝臓を回収した（n=4）。ベクターの投与量は出生時に 4×10^8 p f u／マウス、8週目に 4×10^8 p f u／マウスであり、8週目以降は100 mg／k gのバニリンの持続投与を追加した。

[0275] 投与後6週目（初回投与のみ）及び13週目にシグマ社のキットを用いて

血中フェニルアラニン濃度を測定した（図83、図84）。6週目では血中フェニルアラニン濃度がコントロールマウスよりわずかに低下し、13週目では最大で約30%低下した。この結果から2回投与の有用性が示唆された。しかしc57BL/6マウスの毛色はPKUではメラニンの低下により灰色であるが、全行程を通じて毛色の変化は見られなかった。

[0276] 13週目の肝臓から全DNAを調製し、PCR法で変異位置の上流及び下流でのノックイン効率検討を行なった結果を図85に示す。用いたプライマーは*in vitro*の実験の図76と同一である。その結果は*in vitro*の結果と同様に確かにノックインが起きていること、また下流PCRにおいて上流PCRよりも効率が低いことが示唆され、*in vitro*の結果が再現された（図85中の星印は非相同組換えによるバンドである。さらに上流及び下流領域全体のノックイン効率を、図77で用いたプライマーによるPCR及びS_{tu}Iで検討した結果（図86）、ドナー領域全体を修復するノックインの効率は約1%であった。一方同じプライマーを用いたT7E1アッセイでミスマッチを検出した結果（図87）、約30%の効率で挿入欠失（*indel*）が形成されており、ガイドRNAとCas9による切断効率はかなり高いことが示唆された。従ってノックイン効率が低いのは切断効率以外が原因である可能性が示唆された。

[0277] 以上より現在のノックイン効率は*in vitro*において3.6%、*in vivo*において1%であったが、血中フェニルアラニン濃度は約30%減少した。症状改善の目安が5%とするとまだ1回投与での治療レベルに達していないが、本研究では変異の下流領域に異常な2次構造があると考えられたため、他のケースを検討する必要があると考えられた。

[0278] （試験例24：PKU治療用のcDNAノックインベクターの作製）

一般的な点変異修復とcDNAノックインの比較を図88に示す。点変異修復では1つの変異塩基だけを正常化するが（図88上段）、1つの疾患でも変異塩基は極めて多種類存在し、点変異塩基の種類の数だけベクターを作製する必要がある。一方cDNAノックイン法では変異塩基部位はそのまま

にして（図88下段）、大きな治療用遺伝子発現ユニットを持つドナーDNAを、安全とされるセーフハーバー領域（マウスRosa26領域）に組み込むため（図88中央）、1疾患1ベクターが実現する。またcDNAを入れ代えるだけで多くの遺伝病の治療ベクターを次々に作製することが可能である。

[0279] 本試験例では、cDNAノックインベクターとしてPah遺伝子発現ユニット又はGFP発現ユニットを搭載する「Pah（2+2）」又は「GFP（2+2）」の2つのベクターを作製して用いた。その構造を図89に示す。これらのベクターには、搭載する発現ユニットを変え、Cas9ニッケアゼ発現ユニットを搭載しなかった以外は、図27に記載のアデノウイルスベクターを同じものを使用した。

これらのベクターの使用はCas9発現ベクターとの共感染で用いる。ドナーDNAのサイズは、ヒトPah発現ユニットを用いた場合は6.8kb、GFP遺伝子発現ユニットを用いた場合は6.2kbであり、このサイズはAAVベクターの組み込み可能なサイズ（4.7kb）をはるかに超えている。このドナーDNAは、1.7kbの右アームDNAと1.9kbの左アームDNA（図89左中央）に挟まれたPah正常遺伝子発現ユニット（2.3kb）又はGFP発現ユニット（1.8kb）（図89左上段）、及びマウスCypor遺伝子を標的とする2個のshRNA発現ユニット（図89左中段の2個のダイヤ（◇））からなる。これらは、ベクターのE1部位に組み込んだ。両アームの長さの合計は3.6kbと非常に大きく、これまでのベクターでは既に述べた点変異修復実験（合計4kb）以外に類を見ない。またノックインで組み込まれるユニットの長さはそれぞれ2.3kbと1.8kbであるが、このような長大なDNAを組み込むノックインは非常に難しいことが予想された。なおCypor遺伝子（cytochrome p450 reductase）を標的とするshRNAはアセトアミノフェンを介したin vivo選択法に用いられるものを用いた（Tiyaboonthai A, Grompe M et al., Nat

Commun, 13:7391, 2022)。

[0280] またノックインのためのセーフハーバー領域を標的とする2個のガイドRNA発現ユニットがベクターのE4部位に組み込まれている(図89右側の2個の四角)。また同じ標的配列(20塩基)がドナーDNAの右末端に組み込まれており、ドナーDNAがこの位置で切断されることにより(図89中央のはさみ)、ノックイン効率が上昇する。ガイドRNAの標的塩基配列を以下に示す。

セーフハーバー領域及びドナーDNA末端を標的とするガイドRNA :
GACTGGAGTTGCAGATCACG (配列番号171)。

[0281] (試験例25: E1部位に組み込まれた2個のshRNA発現ユニット、及びE4部位に組み込まれた2個のガイドRNA発現ユニットの安定性)

本ベクターは2個のshRNA発現ユニットと2個のガイドRNA発現ユニットの合計4個のU6プロモーター発現ユニットを持つが、ベクターゲノム上でこれらのユニットが欠失なく維持されるかを試験例11の図41と同様の方法で検討した(図90(「Pah(2+2)」ベクター)及び図91(「GFP(2+2)」ベクター))。その結果どちらのベクターでも6クローンすべてにおいてユニットの脱落は検出されず、4個のユニットは安定に維持されていた。

[0282] (試験例26: 2重Cypor shRNAのノックダウン効率の検討)

図89に示すように本ベクターは複数のshRNA発現ユニットと複数のガイドRNA発現ユニットの両方を搭載するノックダウン/ノックインベクター(KD/KI多重ユニットベクター)である。shRNA発現ユニットとガイドRNA発現ユニットをそれぞれ複数有する構造のベクターはこれまで報告がない。一般論として、遺伝子発現を阻止するには遺伝子DNAをノックアウトすると同時にmRNAのノックダウンも行うことができれば、発現阻止を異なる機構で同時に行うことにより相加あるいは相乗効果が期待できる。特にガイドRNAにより遺伝子のノックアウトあるいはノックインを行いながら、Cypor shRNAの同時発現によりゲノム編集が行われ

た細胞を選択的に増殖させるという組み合わせを1つのベクターが行うことができれば、効率の高いゲノム編集が期待できる。AAVベクターではサイズ制限のためこれを行うことが難しい。またユニットの安定性を保つには多重ユニットはE1部位とE4部位の2カ所に分割されて組み込まれていることが望ましい。本ベクターは2ユニットずつ組み込まれた構造でこれを満たしている。

[0283] 本ベクターで発現する多重ガイドRNAが活性を有することはノックインを生ずることから明らかである。これと同時に発現する2個のshRNAが、標的のCypor mRNAの発現をノックダウンする活性を検討するため、Hepa1-6細胞に、「Pah(2+2)ベクター」、「GFP(2+2)ベクター」、又は発現ユニットを持たない「1w1ベクター」をCas9発現ベクターと共にそれぞれMOI=30で感染し、3日後に全細胞RNAを抽出した。このRNAの2μgを用いてランダムプライマー法でcDNAを調製し、発現しているCypor mRNAを定量した。その結果を図92に示す。検出されたCypor mRNAの量は、コントロールの「1w1ベクター」を感染した場合と比較して、「Pah(2+2)ベクター」は4%、「GFP(2+2)ベクター」は3%に減少していた。このとき、同じcDNAに存在しているマウスTFRC遺伝子のmRNAを定量したところ、「Pah(2+2)ベクター」はコントロールの99%、「GFP(2+2)ベクター」はコントロールの80%であり大きな差は見られなかった。以上の結果からCypor shRNAのノックダウン効率は、「Pah(2+2)ベクター」と「GFP(2+2)ベクター」でそれぞれ約96%、約97%であり、非常に高いことが示唆された。この高い効率の理由の1つは、それぞれのmRNA標的に対して2個のshRNAを同時発現しているためその相加効果が考えられる。

[0284] 本実験で用いたshRNA、及び検出に用いたプライマーの標的塩基配列を以下に示す。また、shRNAの配列の下線部分は、shRNA標的21塩基の表鎖及び裏鎖を示す。なお、shRNAの配列中、表鎖と裏鎖の間の

下線を付していない部分は、ループ配列であり、末端の7つのAは終止ポリUをコードする配列である。

Cypor shRNA 1 :

GAAGAAGTGTCTCTATTTCAGCTTCAAGAACGCTG
AATAGAGACACTTCTTCAAAAAAAAA (配列番号172)

Cypor shRNA 2 :

GAACATTATTGTATTCTATGGTTCAAGAACCCAT
AGAATACAATAATGTTCAAAAAAAAA (配列番号173)

Cypor mRNA検出プライマー268-F :

GGGACTCTCACGAAGACACCAGTGC (配列番号174)

Cypor mRNA検出プライマー269-R :

CCACGTGATCTCCAGATTTCATACCTG (配列番号175)

TFRC mRNA検出プライマー270-F :

ATGATGGATCAAGCCAGATCAGC (配列番号176)

TFRC mRNA検出プライマー271-R :

TGTATGTATTCTGGCTCAGCTGC (配列番号177)

[0285] (試験例27: cDNAノックインベクターのノックイン効率)

図93はノックイン前のセーフハーバー領域(Rosa26領域)のマウスゲノム(図93上段)、ノックインベクター上のドナーDNA(図93中段)及びノックイン後のマウスゲノム上のドナーDNA(図93下段)の構造を示す図である。

[0286] cDNAノックイン法の効率を調べるため、マウス肝臓由来細胞株であるHepa1-6に、「Pah(2+2)ベクター」又は「GFP(2+2)ベクター」をCas9発現ベクター「AxCBCas9」と共にそれぞれMOI 100で感染し、3日後に全細胞DNAを抽出し、図93に示す277Fプライマー及び279Rプライマーを用いて35サイクルのPCRを行った。これらのプライマーはドナーDNA配列の外に位置しており、「P

a h (2 + 2) ベクター」でノックインが行われた場合は6.9 kb、「GFP (2 + 2) ベクター」でノックインが行われた場合は6.4 kb、ノックインが行われなかった場合は3.8 kbのバンドを生ずる。その結果を図94に示す。

[0287] 「P a h (2 + 2) ベクター」では、ドナーDNA全長を含む6.9 kbのバンドが明瞭に見られ、ノックインが行われなかった場合の3.8 kbのバンドと濃さを比較することにより、ノックイン効率は約7%と推定された(図94中の「P a h (2 + 2) + C a s 9」)。また、「GFP (2 + 2) ベクター」でもドナーDNA全長を含む6.4 kbのバンドが見られ、同様の比較によりノックイン効率は約4%と推定された(図94中の「GFP (2 + 2) + C a s 9」)。この効率はドナーDNAの長さが2.3 kb又は1.8 kbと長大であることを考えると驚くべき高さである。

[0288] この6.9 kb及び6.4 kbのバンドがほぼドナーDNAからなるかを検討するため、このPCR DNAをB a m H Iで切断した結果を図95に示す。B a m H I切断によりこのバンドは完全に消失し、得られたバンドのサイズはドナーDNAと予想されるものと一致した。この結果により、i n v i t r oにおいて約7%と約4%の効率でcDNAノックインに成功していることが確認された。

[0289] 既に述べたようにP a h遺伝子を点変異修復するi n v i t r oノックイン実験では最も高い効率は3%台であるが、アームの長さの合計はP a h遺伝子領域の点変異修復で約4 kb、本実験のマウスセーフハーバー領域のノックインでは約3.6 kbであり、むしろ本実験の方がやや短い。この高い効率は、ドナーDNAの末端を切断する方法による効果だけでは説明が難しい。むしろ点変異修復の実験では標的変異部位下流にある異常な2次構造を生じる配列による効率の低下のためという可能性が高いと考えられた。実際に本実験の発現ユニット挿入部位の上流及び下流DNAのノックイン効率を別々に検討し比較した結果は、予想通り両方で差はほとんど見られなかった。この結果は、本ベクターは点変異修復ノックインにおいても一般的には

高い効率が得られる可能性を残している。

[0290] 本出願は、2023年2月2日出願した日本国特許出願2023-014899号に基づく優先権を主張するものであり、日本国特許出願2023-014899号の全内容を本出願に援用する。

請求の範囲

[請求項1]

C a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、C a s 9 ニッカーゼ又はそれをコードする核酸分子とを含み、

前記C a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子が、下記（1）～（33）から選択されるC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペア又はペアの組合せを含むことを特徴とするヒトパピローマウイルス（HPV）陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物：

（1） 配列番号1で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号2で表される配列若しくは配列番号2で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号4で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

（2） 配列番号1で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号2で表される配列若しくは配列番号2で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号5で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号6で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

（3） 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするC a s ガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 9 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 1 0 で表される配列若しくは配列番号 1 0 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(4) 配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 5 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 6 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(5) 配列番号 3 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 1 1 で表される配列若しくは配列番号 1 1 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 1 2 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 1 3 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(6) 配列番号 3 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 1 1 で表される配列若しくは配列番号 1 1 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 5 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 6 で表される配列を標的とする C a s ガイド R N A 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(7) 配列番号1で表される配列を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号2で表される配列若しくは配列番号2で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号4で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(8) 配列番号1で表される配列を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号2で表される配列若しくは配列番号2で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号4で表される配列若しくは配列番号4で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号14で表される配列若しくは配列番号14で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号15で表される配列若しくは配列番号15で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(9) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするC a sガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするC

a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 3 で表される配列を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 1 1 で表される配列若しくは配列番号 1 1 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 1 2 で表される配列を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 1 3 で表される配列を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(1 0) 配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 3 で表される配列を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 4 で表される配列若しくは配列番号 4 で表される配列の第 2 ～ 2 0 番目の塩基を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 1 2 で表される配列を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 1 3 で表される配列を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(1 1) 配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 9 で表される配列を標的とする C a s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 1 0 で表される配列若しくは配列番号 1 0 で表される配列の第 3 ～ 2 1 番目の塩基を標的とする C a

s ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 14 で表される配列若しくは配列番号 14 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 15 で表される配列若しくは配列番号 15 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(12) 配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 4 で表される配列若しくは配列番号 4 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 12 で表される配列を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 13 で表される配列を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 14 で表される配列若しくは配列番号 14 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 15 で表される配列若しくは配列番号 15 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(13) 配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 4 で表される配列若しくは配列番号 4 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 9 で表される配列を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 10 で表される配列若しくは配列番号 10 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 14 で表される配列若しくは配列番号 14 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイドRNA 又はそれを

コードする核酸分子と、配列番号 15 で表される配列若しくは配列番号 15 で表される配列の第 3～21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(14) 配列番号 16 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 17 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3～21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 19 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(15) 配列番号 16 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 20 で表される配列若しくは配列番号 20 で表される配列の第 3～21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3～21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 19 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(16) 配列番号 16 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 20 で表される配列若しくは配列番号 20 で表される配列の第 3～21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 21 で表される配列若しくは配列番号 21 で表される配列の第 2～20 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 22 で表される配列若しくは配列番号 22 で表される配列の第 3～21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(17) 配列番号23で表される配列若しくは配列番号23で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号24で表される配列若しくは配列番号24で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号21で表される配列若しくは配列番号21で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号22で表される配列若しくは配列番号22で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(18) 配列番号16で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号17で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号25で表される配列若しくは配列番号25で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号26で表される配列若しくは配列番号26で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号18で表される配列若しくは配列番号18で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号27で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(19) 配列番号16で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号17で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号28で表される配列を標的とするCasガイドRNA又は

それをコードする核酸分子と、配列番号 29 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 21 で表される配列若しくは配列番号 21 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 22 で表される配列若しくは配列番号 22 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(20) 配列番号 16 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 20 で表される配列若しくは配列番号 20 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 25 で表される配列若しくは配列番号 25 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 26 で表される配列若しくは配列番号 26 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 18 で表される配列若しくは配列番号 18 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 27 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(21) 配列番号 16 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 20 で表される配列若しくは配列番号 20 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 25 で表される配列若しくは配列番号 25 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 26 で表される配列若しくは配列番号 26 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガ

イドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号18で表される配列若しくは配列番号18で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号19で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(22) 配列番号25で表される配列若しくは配列番号25で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号26で表される配列若しくは配列番号26で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号18で表される配列若しくは配列番号18で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号27で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号21で表される配列若しくは配列番号21で表される配列の第2～20番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号22で表される配列若しくは配列番号22で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(23) 配列番号25で表される配列若しくは配列番号25で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号26で表される配列若しくは配列番号26で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号18で表される配列若しくは配列番号18で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号19で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 21 で表される配列若しくは配列番号 21 で表される配列の第 2 ～ 20 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 22 で表される配列若しくは配列番号 22 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(24) 配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペア；

(25) 配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 11 で表される配列若しくは配列番号 11 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペア；

(26) 配列番号 12 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 13 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペア；

(27) 配列番号 12 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 13 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 11 で表される配列若しくは配列番号 11 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(28) 配列番号 12 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 13 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペア

アと、

配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(29) 配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 11 で表される配列若しくは配列番号 11 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(30) 配列番号 7 で表される配列若しくは配列番号 7 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 8 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 5 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 6 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ；

(31) 配列番号 3 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 11 で表される配列若しくは配列番号 11 で表される配列の第 3 ～ 21 番目の塩基を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号 5 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子と、配列番号 6 で表される配列を標的とする Cas ガイド RNA 又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

;

(32) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ;

(33) 配列番号7で表される配列若しくは配列番号7で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号8で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号3で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号11で表される配列若しくは配列番号11で表される配列の第3～21番目の塩基を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号12で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号13で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアと、

配列番号5で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、配列番号6で表される配列を標的とするCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペアとの組合せ

。

- [請求項2] 前記C a s ガイドRNAをコードする核酸分子及び前記C a s 9 ニッカーゼをコードする核酸分子が、核酸ベクターに搭載されている請求項1に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物。
- [請求項3] 前記核酸ベクターが、組換えアデノウイルスベクター又は組換えレンチウイルスベクターである請求項2に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物。
- [請求項4] 前記組換えアデノウイルスベクターが、L4／E3領域において、12.4K遺伝子配列を欠失し、かつL4ポリA領域配列を有する組換えアデノウイルスベクターである請求項3に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物。
- [請求項5] ベクターゲノム上で合計4個以上のC a s ガイドRNAをコードする核酸分子を2カ所以上の部位に分割して有する請求項4に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物。
- [請求項6] ベクターゲノム上で合計6個以上のC a s ガイドRNAをコードする核酸分子を2カ所以上の部位に分割して有する請求項5に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物。
- [請求項7] ベクターゲノム上で合計8個以上のC a s ガイドRNAをコードする核酸分子を2カ所以上の部位に分割して有する請求項5に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物。
- [請求項8] C a s ガイドRNAをコードする核酸分子の最多の連続数が6個である請求項5に記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物。
- [請求項9] 前記C a s 9 ニッカーゼをコードする核酸分子が、配列番号87で表される短縮されたEFプロモーターの下流に位置する請求項2から3のいずれかに記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物。
- [請求項10] 前記C a s 9 ニッカーゼをコードする核酸分子と、前記C a s 9 ニ

ッカーゼをコードする核酸分子とを同一ベクター上に有する請求項2から3のいずれかに記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物。

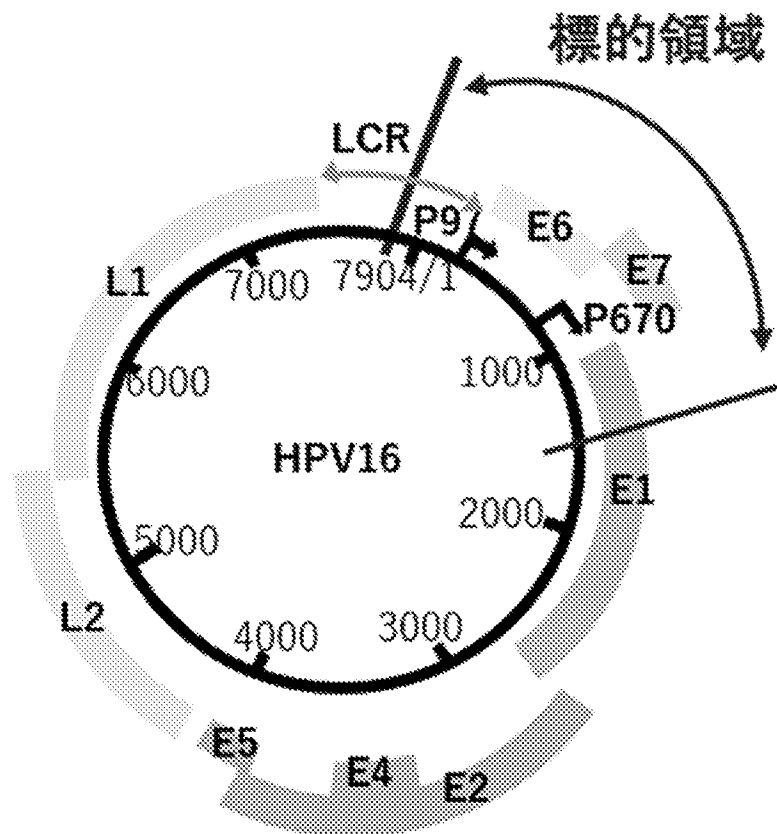
- [請求項11] 前記核酸ベクターが組換えアデノウイルスベクターであり、
前記Cas9ニッカーゼをコードする核酸分子が、前記アデノウイルスベクターのE4領域に搭載されている請求項4から5のいずれかに記載のHPV陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物。
- [請求項12] L4／E3領域において、12.4K遺伝子配列を欠失し、かつL4ポリA領域配列を有することを特徴とする組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項13] L4／E3領域において、アデノウイルス5型の位置付けで、第27, 864番塩基～第28, 137番塩基、及び第28, 200番塩基以降が欠失している請求項12に記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項14] ベクターゲノム上で合計4個以上のCasガイドRNA発現ユニットを2カ所以上の部位に分割して有することを特徴とする組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項15] 前記CasガイドRNA発現ユニットが、アデノウイルスの必須領域の少なくとも一部を挟んだ2カ所以上の部位に分割して搭載されている請求項14に記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項16] 前記CasガイドRNA発現ユニットが、前記アデノウイルスベクターのE1領域、E3領域、及びE4領域からなる群から選択される2カ所以上の部位に分割して搭載されている請求項14に記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項17] ベクターゲノム上で合計6個以上のCasガイドRNA発現ユニットを有する請求項14から16のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクター。

- [請求項18] ベクターゲノム上で合計8個以上のC a sガイドRNA発現ユニットを有する請求項14から16のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項19] C a sガイドRNA発現ユニットの最多の連続数が6個である請求項14から16のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項20] C a sタンパク質発現ユニットを有する請求項14から16のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項21] 組換えアデノウイルスベクターが請求項12から13のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである請求項14から16のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項22] ヒトパピローマウイルス（HPV）を標的とするC a sガイドRNA発現ユニットを有する請求項14から16のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項23] ベクターゲノム上で合計6個以上のショートヘアピンRNA発現ユニットを2カ所以上の部位に分割して有することを特徴とする組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項24] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットが、アデノウイルスの必須領域の少なくとも一部を挟んだ2カ所以上の部位に分割して搭載されている請求項23に記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項25] 前記ショートヘアピンRNA発現ユニットが、前記アデノウイルスベクターのE1領域、E3領域、及びE4領域からなる群から選択される2カ所以上の部位に分割して搭載されている請求項23に記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項26] ベクターゲノム上で合計8個以上のショートヘアピンRNA発現ユニットを有する請求項23から25のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項27] ショートヘアピンRNA発現ユニットの最多の連続数が4個である請求項23から25のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクター。

一。

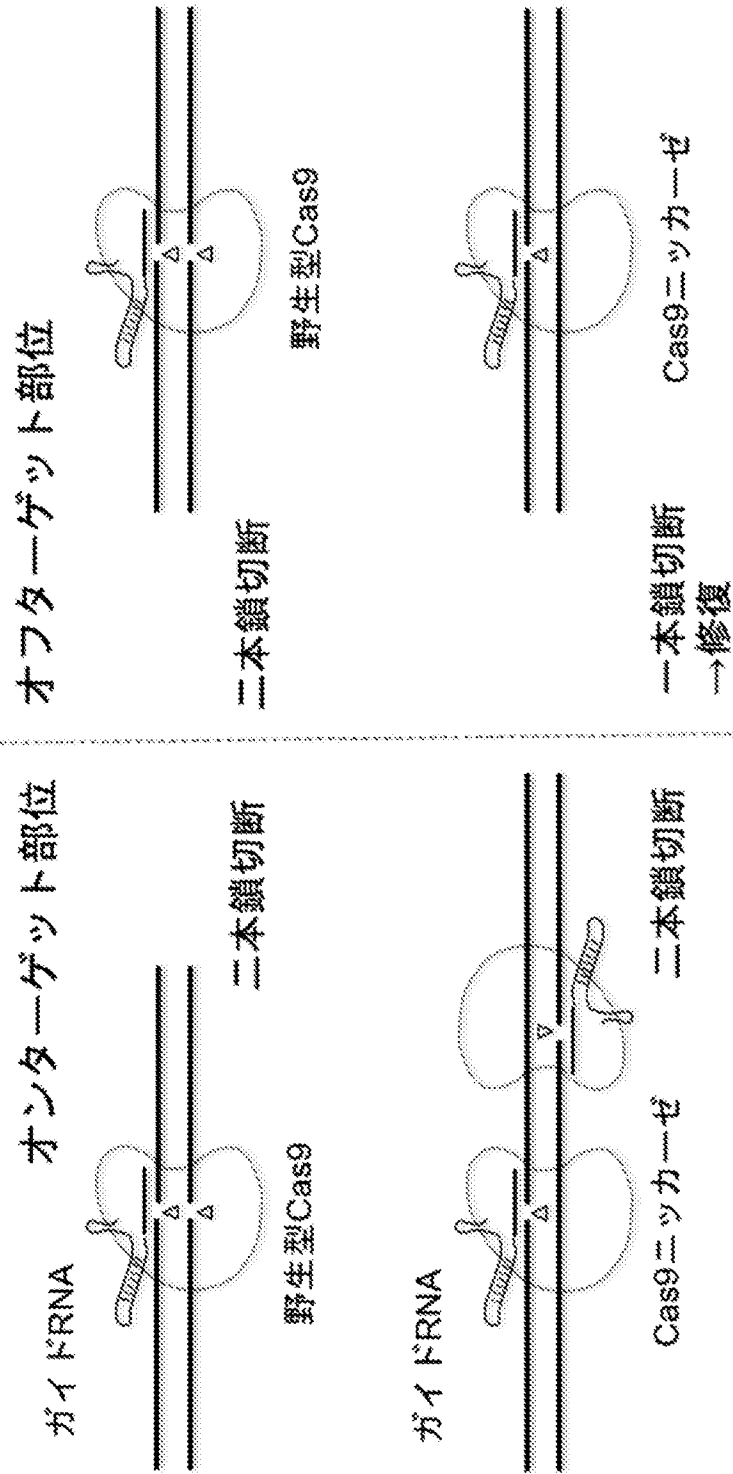
- [請求項28] 組換えアデノウイルスベクターが請求項12から13のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである請求項23から25のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項29] ベクターゲノム上で、2個以上のCasガイドRNA発現ユニットと、2個以上のショートヘアピンRNA発現ユニットとを有することを特徴とする組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項30] CasガイドRNAの標的がセーフハーバー領域であり、ショートヘアピンRNAの標的がCypor mRNAである請求項29に記載の組換えアデノウイルスベクター。
- [請求項31] 組換えアデノウイルスベクターが請求項12から13のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクターである請求項29から30のいずれかに記載の組換えアデノウイルスベクター。

[図1]

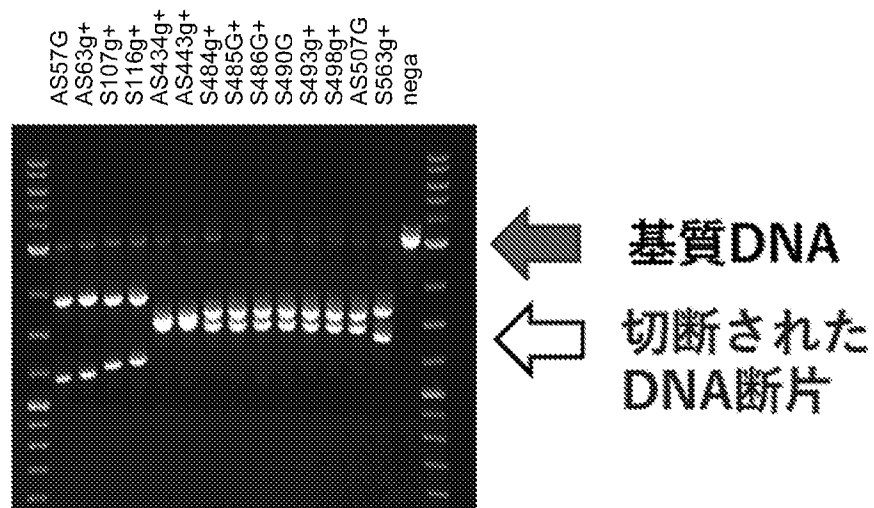


[図2]

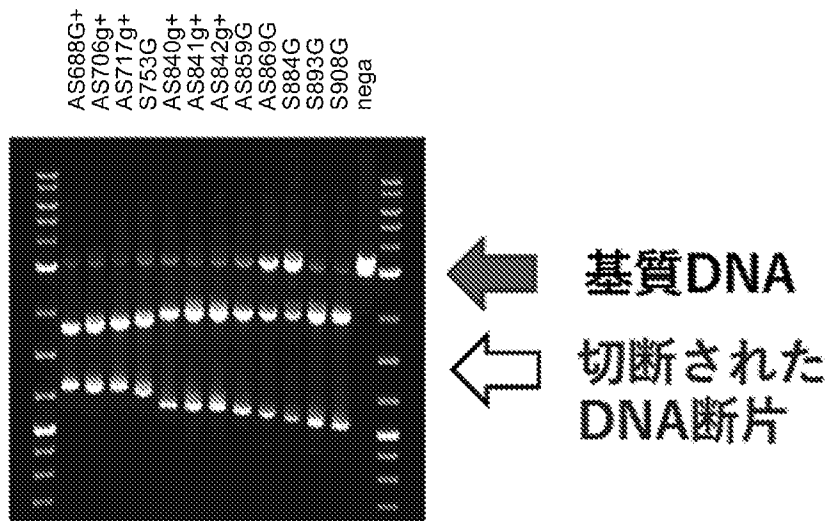
ダブルニッキング切断



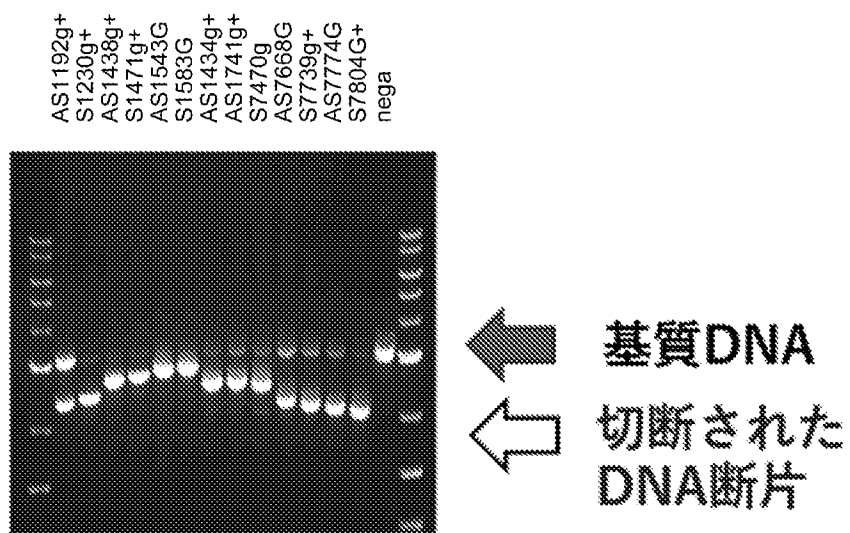
[図3]



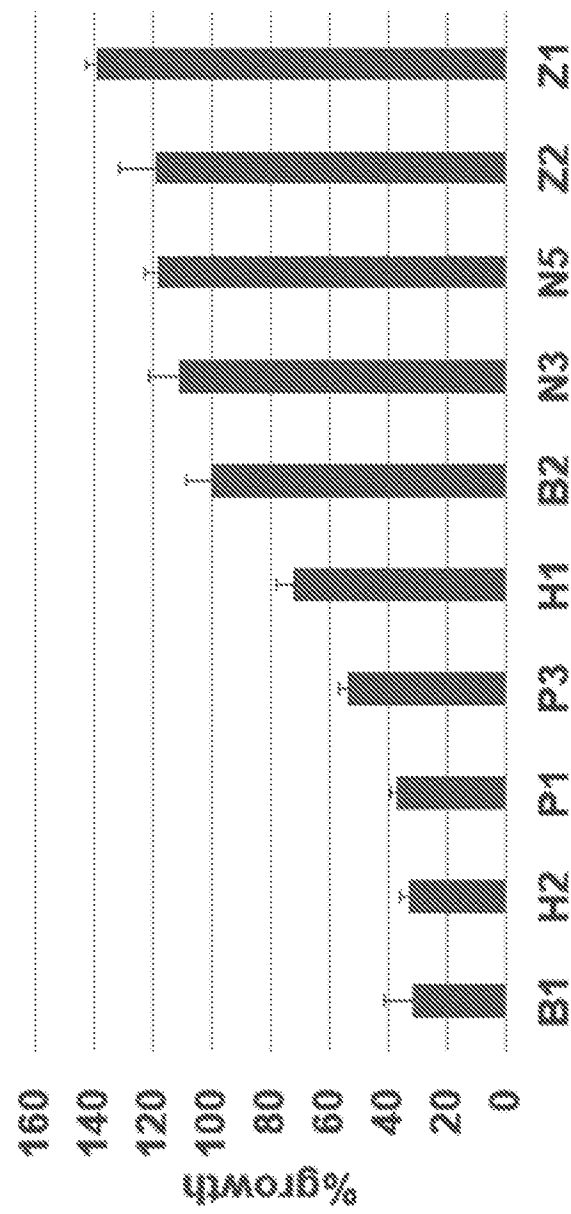
[図4]



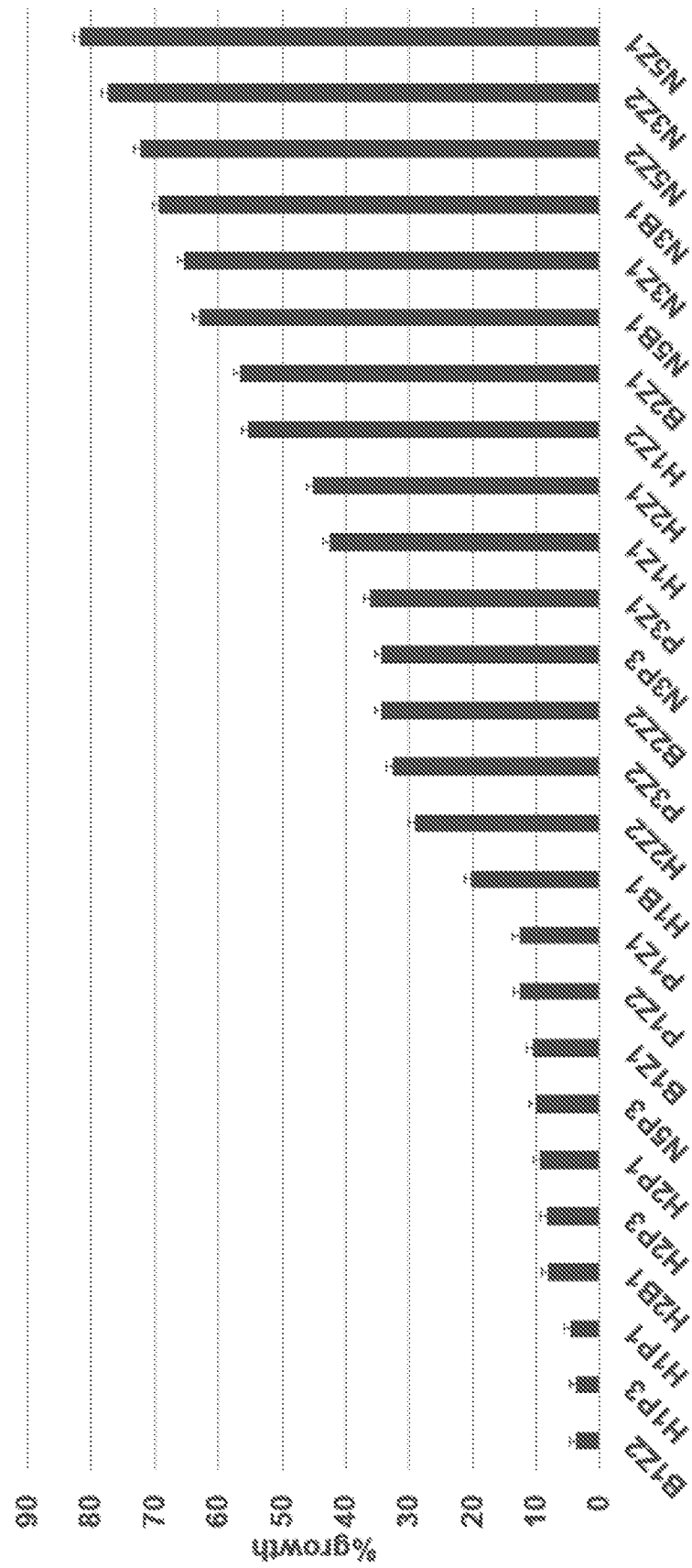
[図5]



[図6]



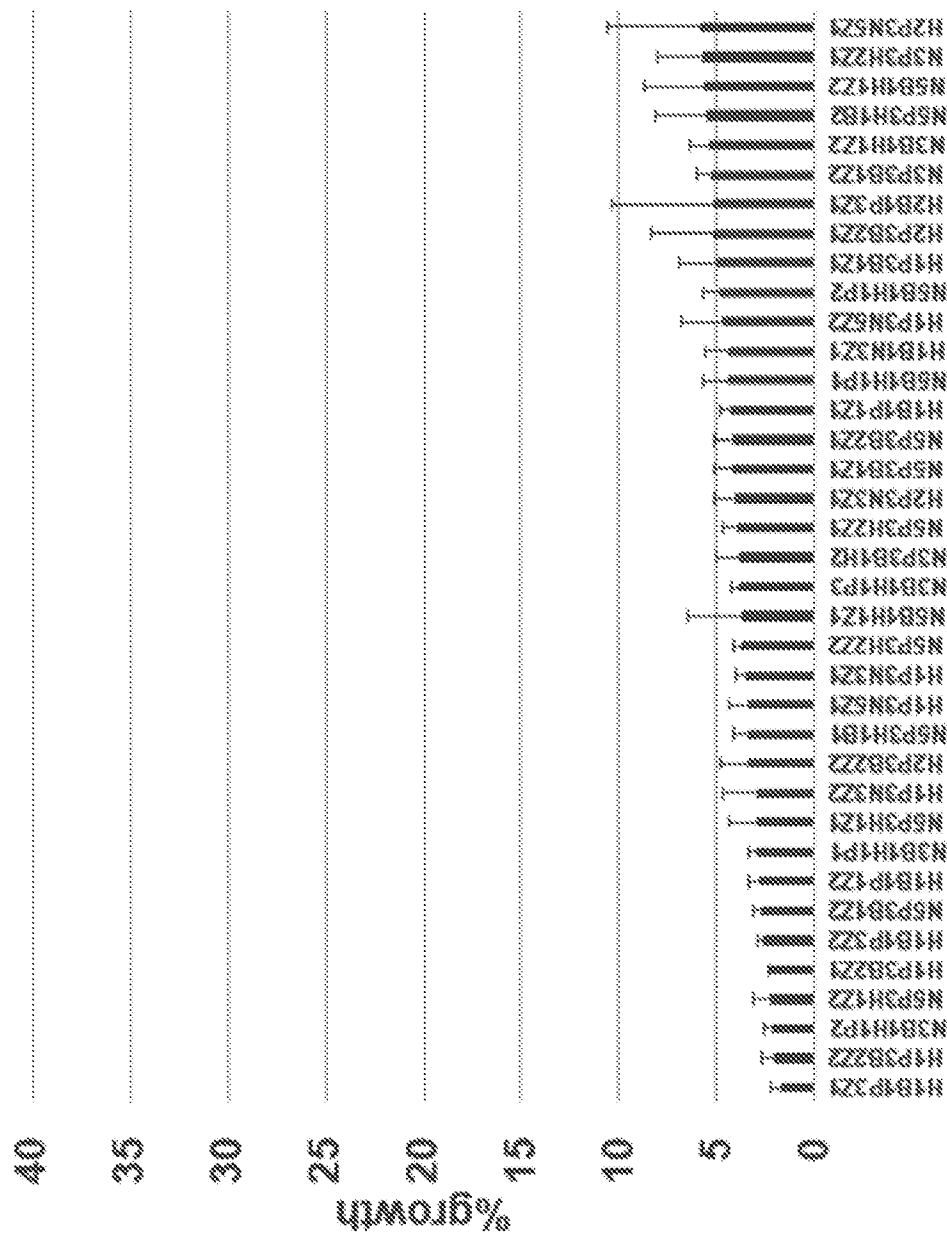
[図7]



A horizontal bar chart showing the percentage growth for 48 different genotypes. The y-axis is labeled '%growth' and ranges from 0 to 70. The x-axis lists the genotypes. Error bars are present for each bar.

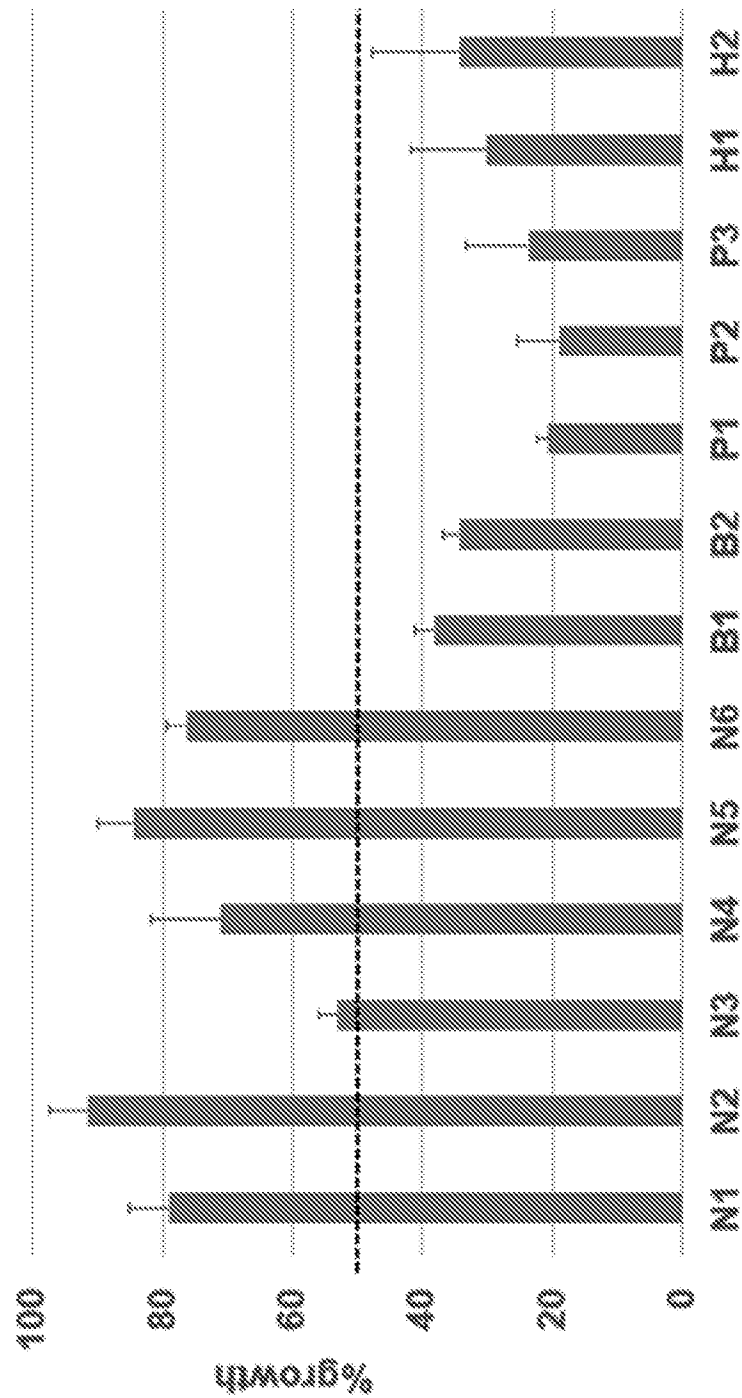
Genotype	%growth (approx.)
H1B1P1	1
H2P3N6	1
H2B1Z2	1
H2P3Z1	1
H2P3Z2	1
H2P3B1	1
H2P3B2	1
H2P3B3	1
H1P3N3	1
H1B1P3	1
H1P1Z2	1
H1P1Z1	1
H5P3B2	1
N3B1H1	1
N3P3H2	1
N3B1H1	1
N3B1H1	1
N3P3Z1	1
H1P3N6	1
N3P3B2	1
H2B1P1	1
H1P3N3	1
H1B1P3	1
H1P1Z2	1
N5P3Z2	1
H1P1Z1	1
N5P3B2	1
N3B1H1	1
N3P3H2	1
N3B1H1	1
N3P3H1	1
H1B1N5	1
N3B1Z1	1
H2B1P3	1
H2B1N3	1
N3P3H1	1
H1B1N5	1
N5B1H2	1
N5B1Z1	1
N5B1Z2	1

[図9]

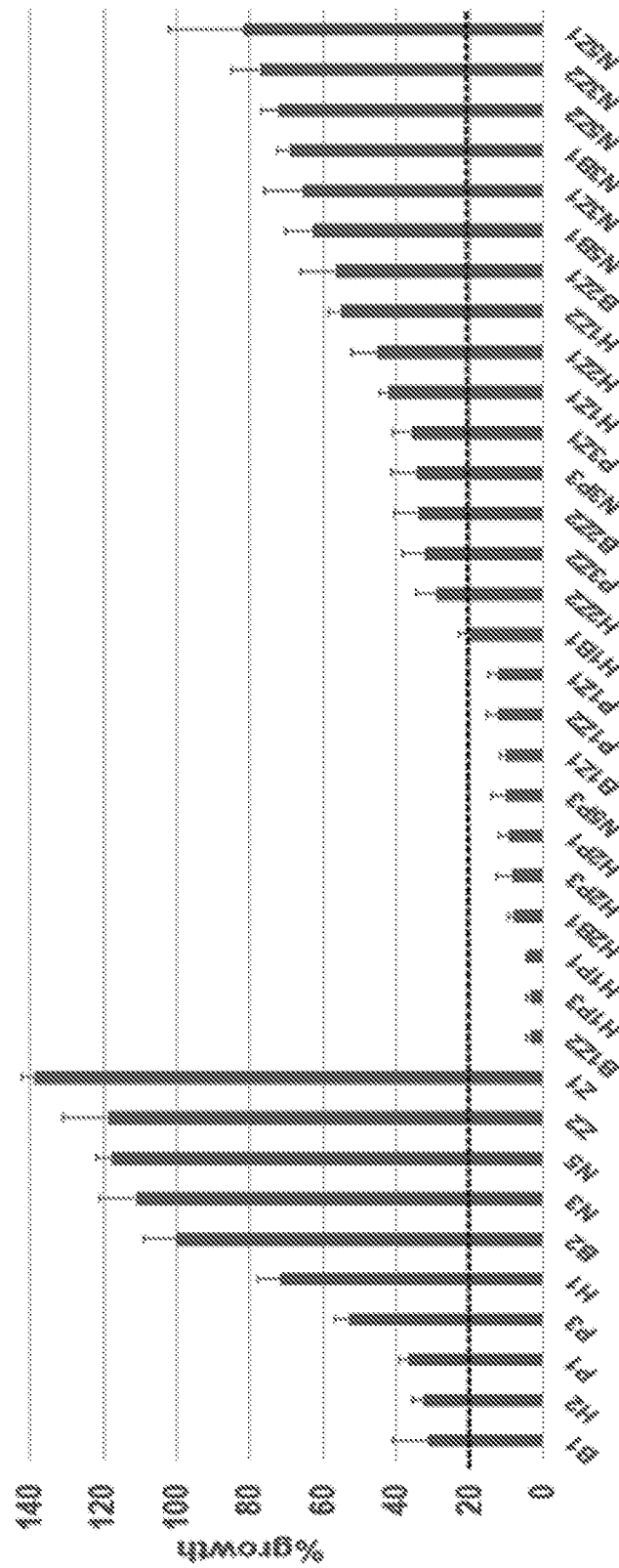


[illegible]

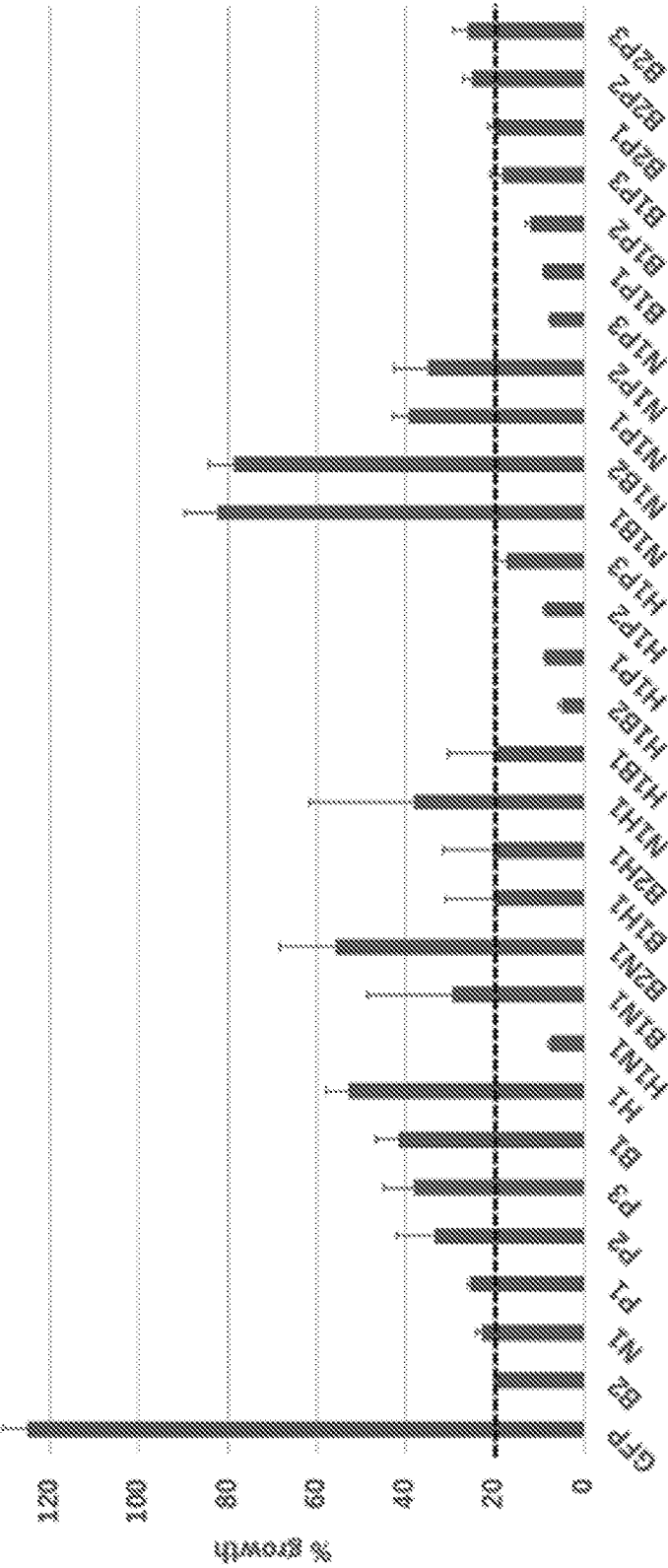
[図11]



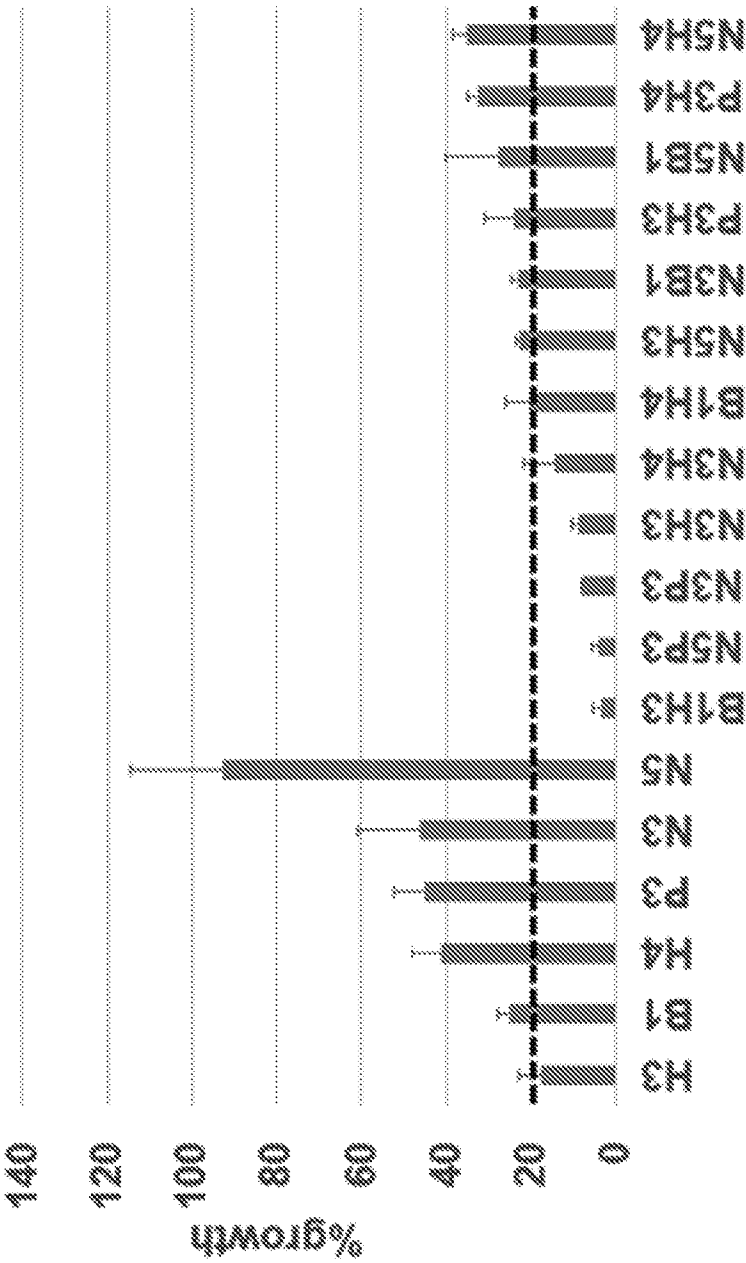
[図12]



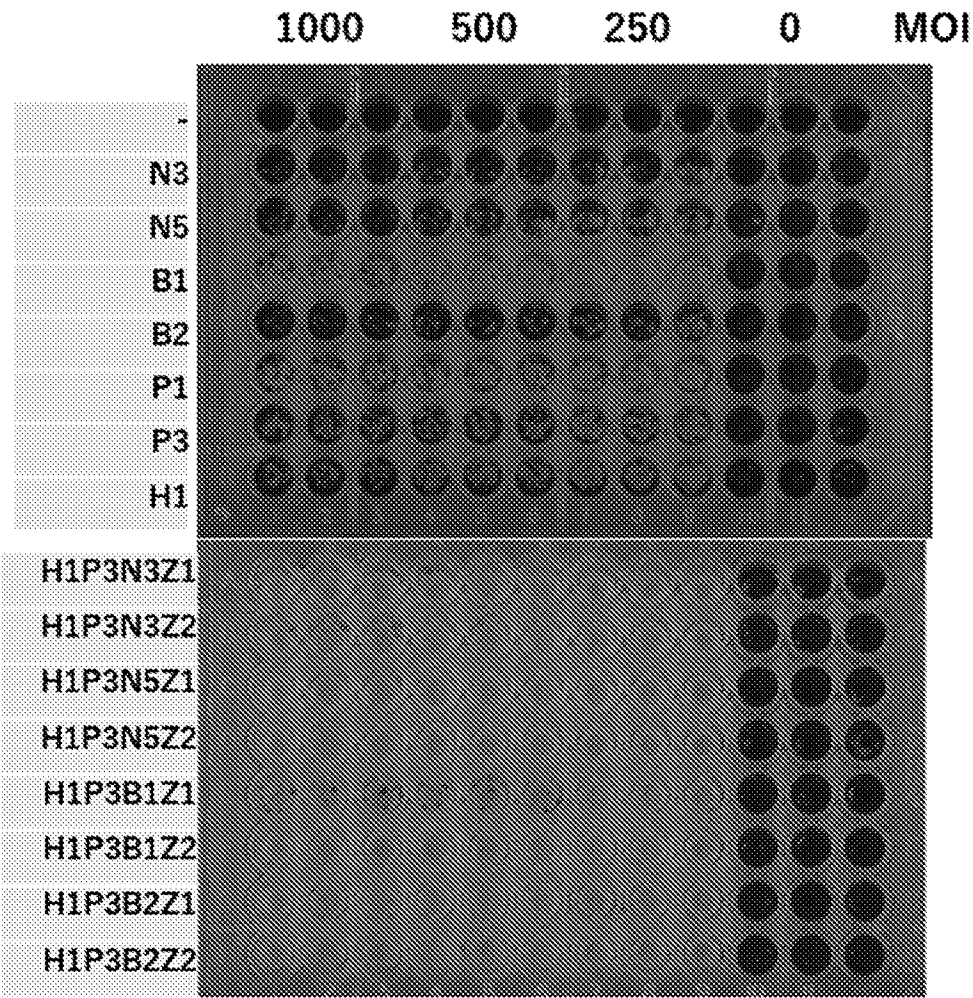
[図13]



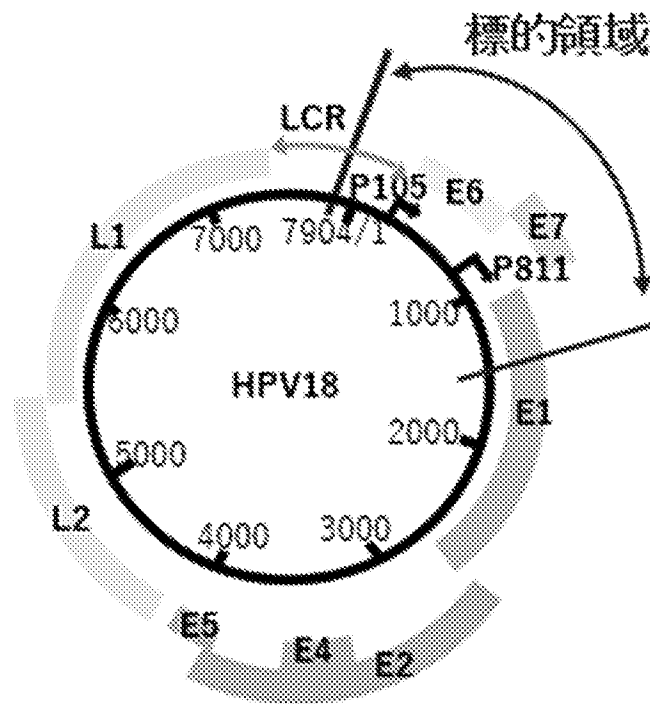
[図14]



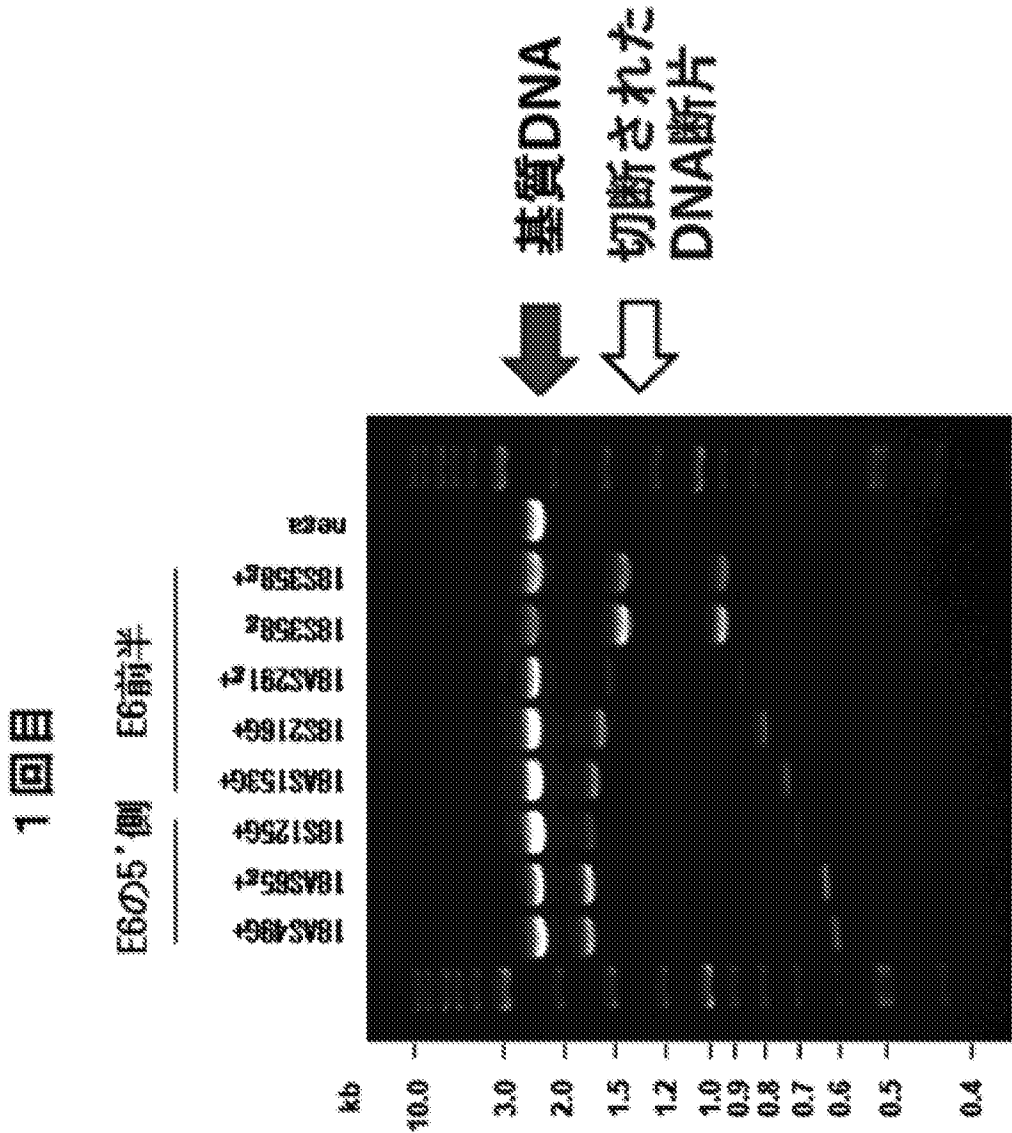
[図15]



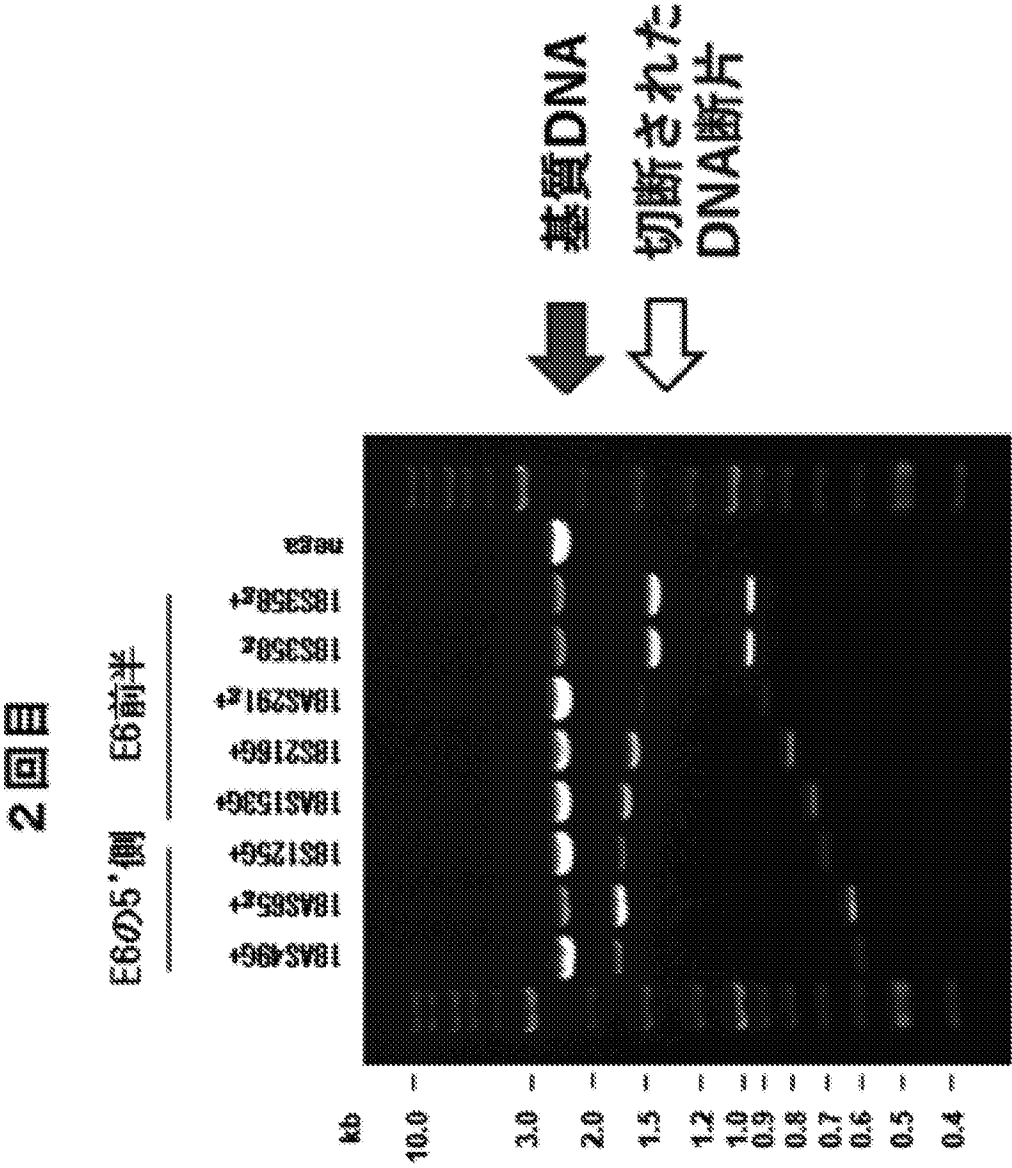
[図16]



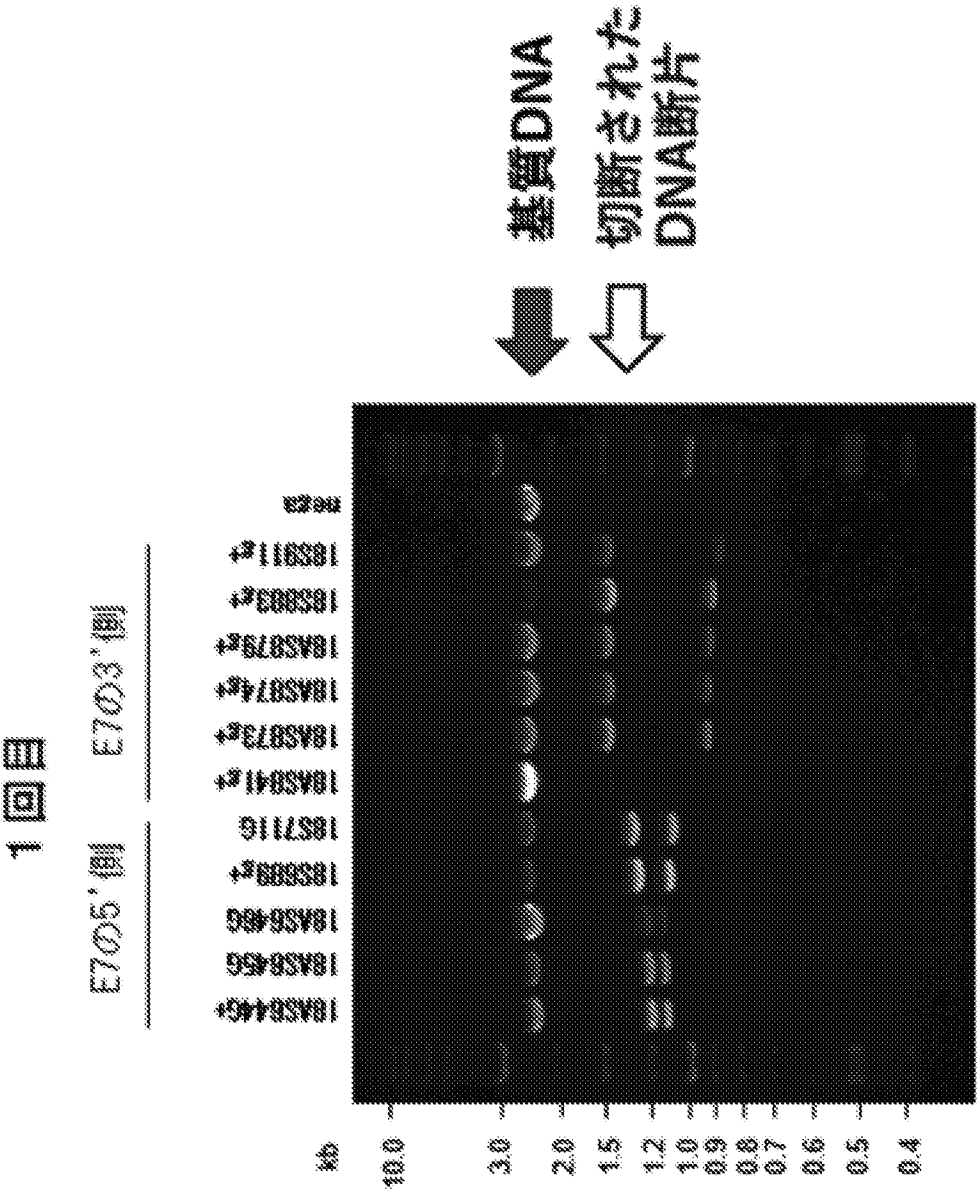
[図17]



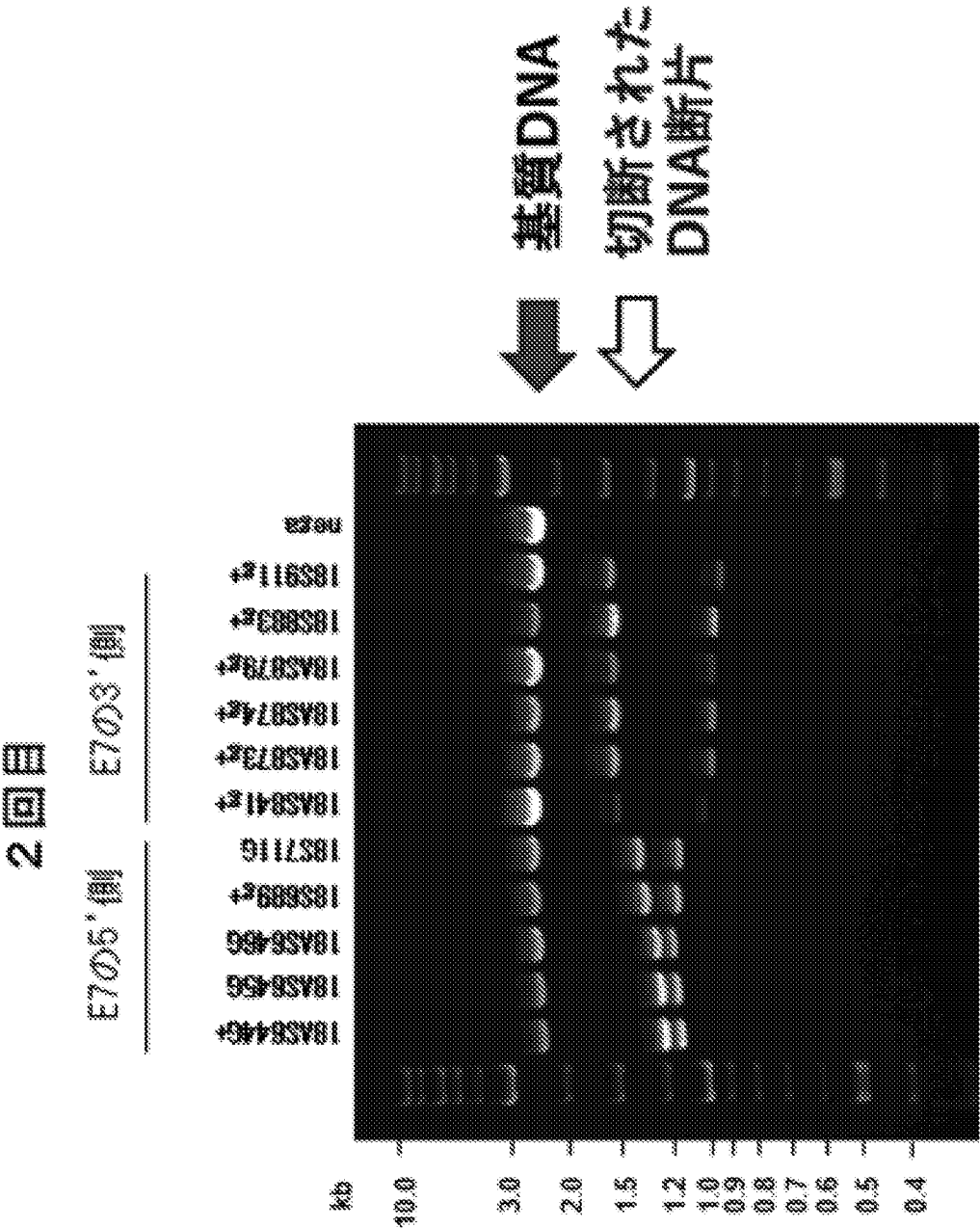
[図18]



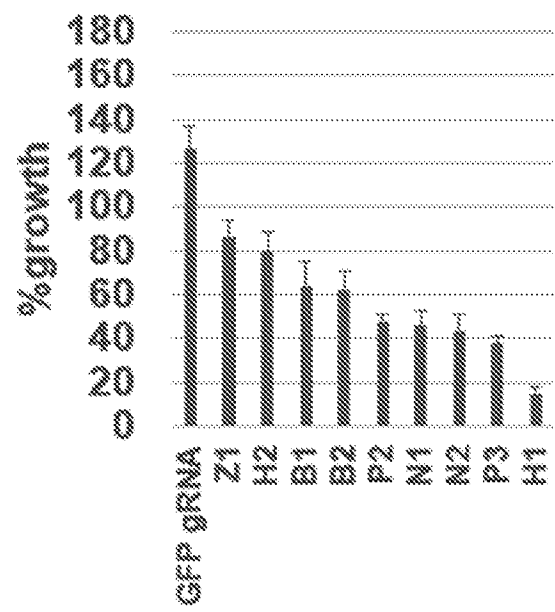
[図19]



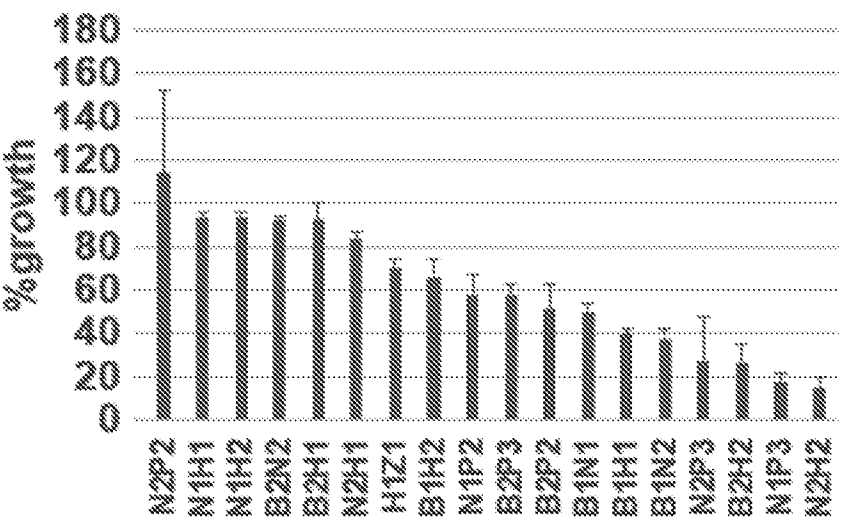
[図20]



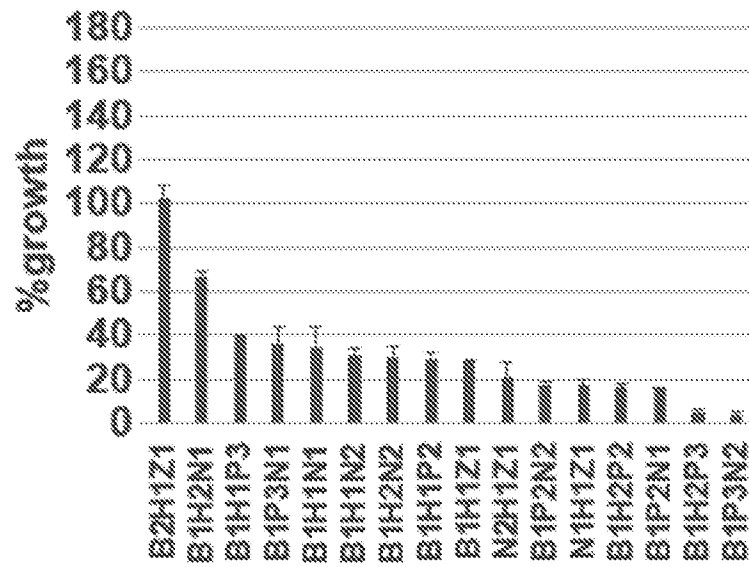
[図21]



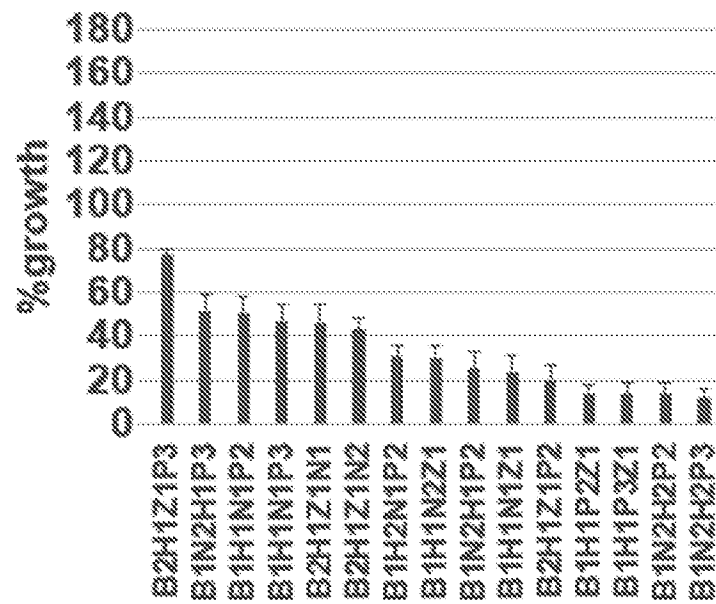
[図22]



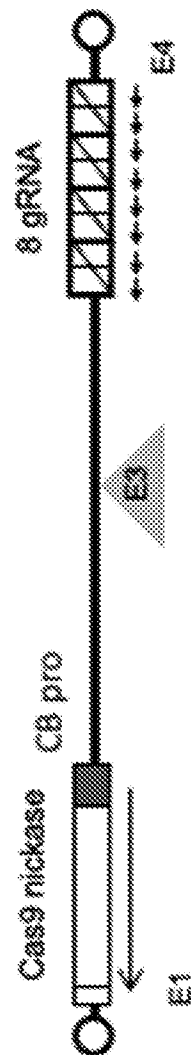
[図23]



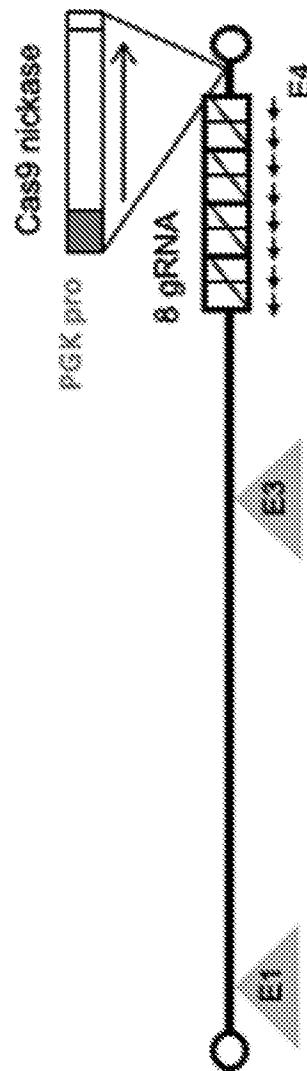
[図24]



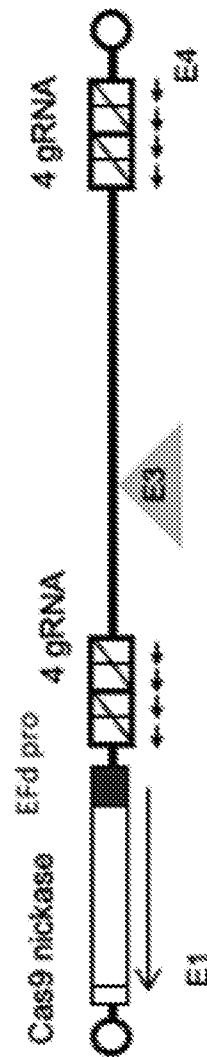
[図25]



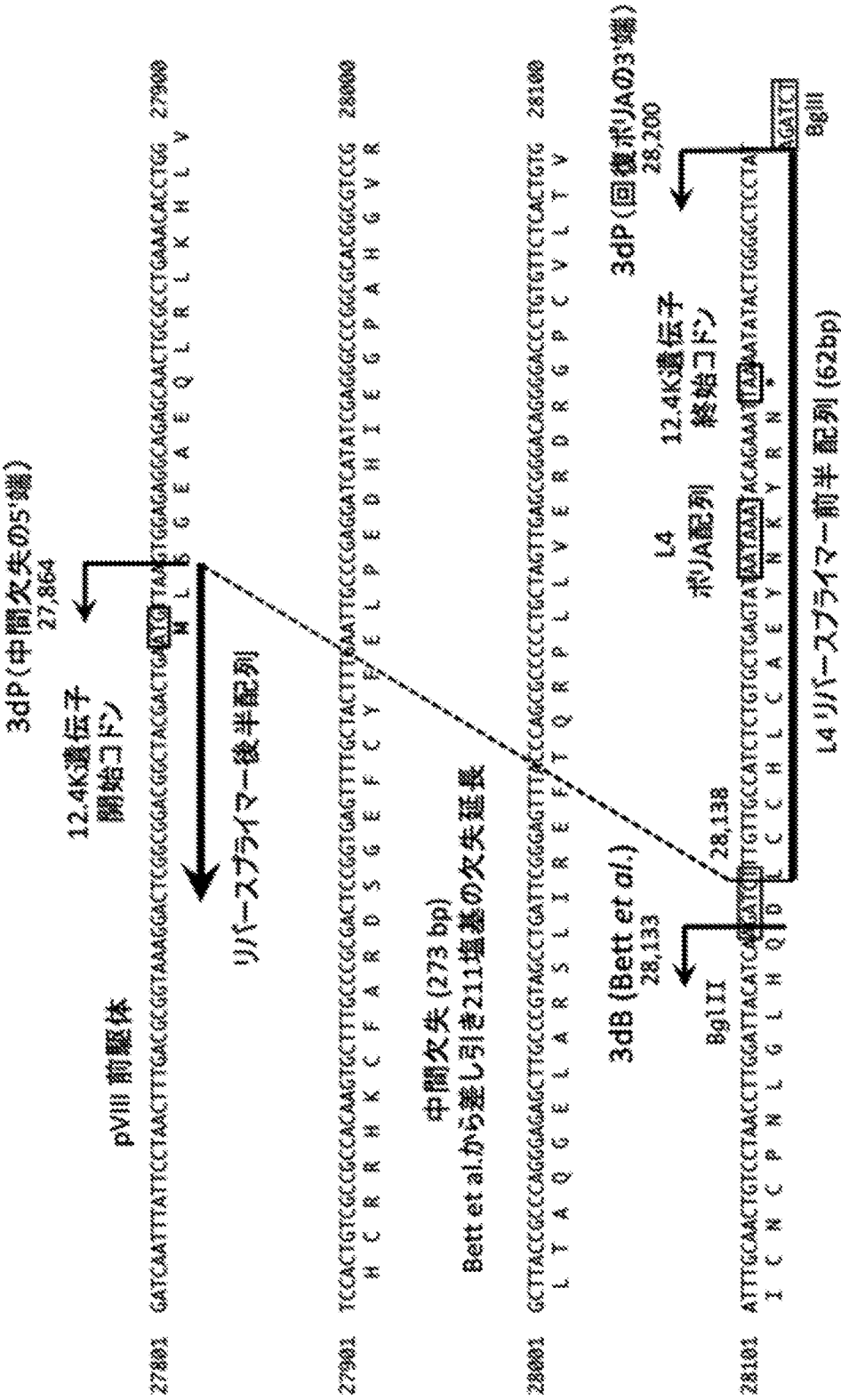
[図26]



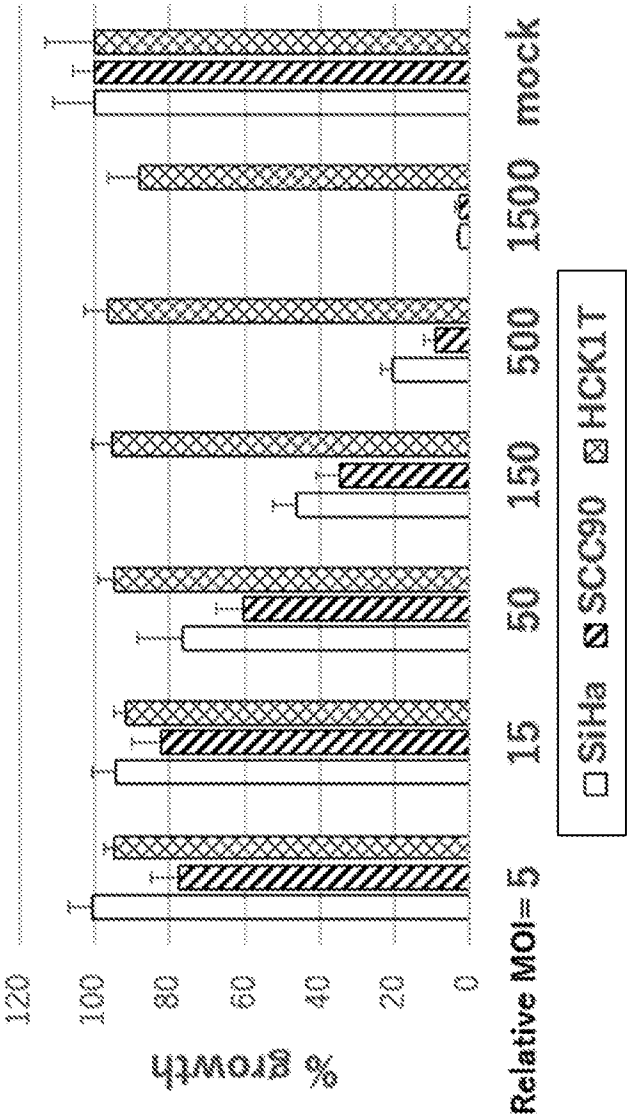
[図27]



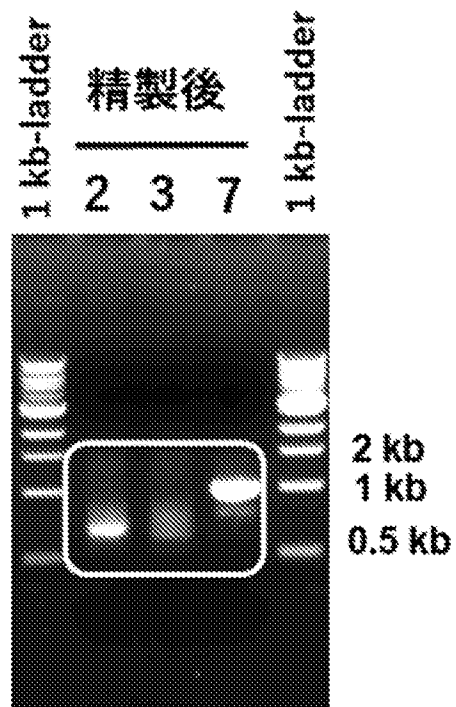
[図28]



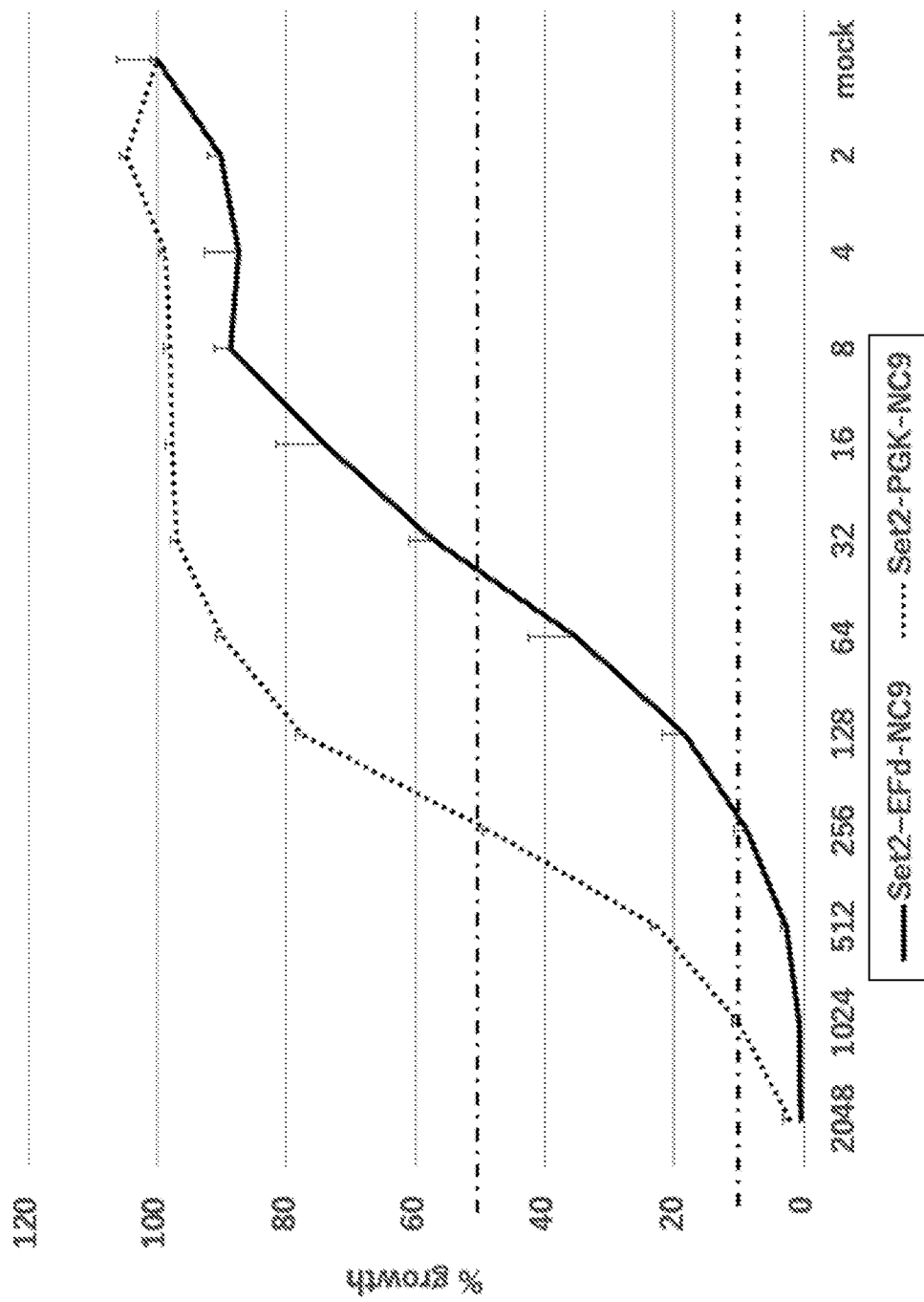
[図29]



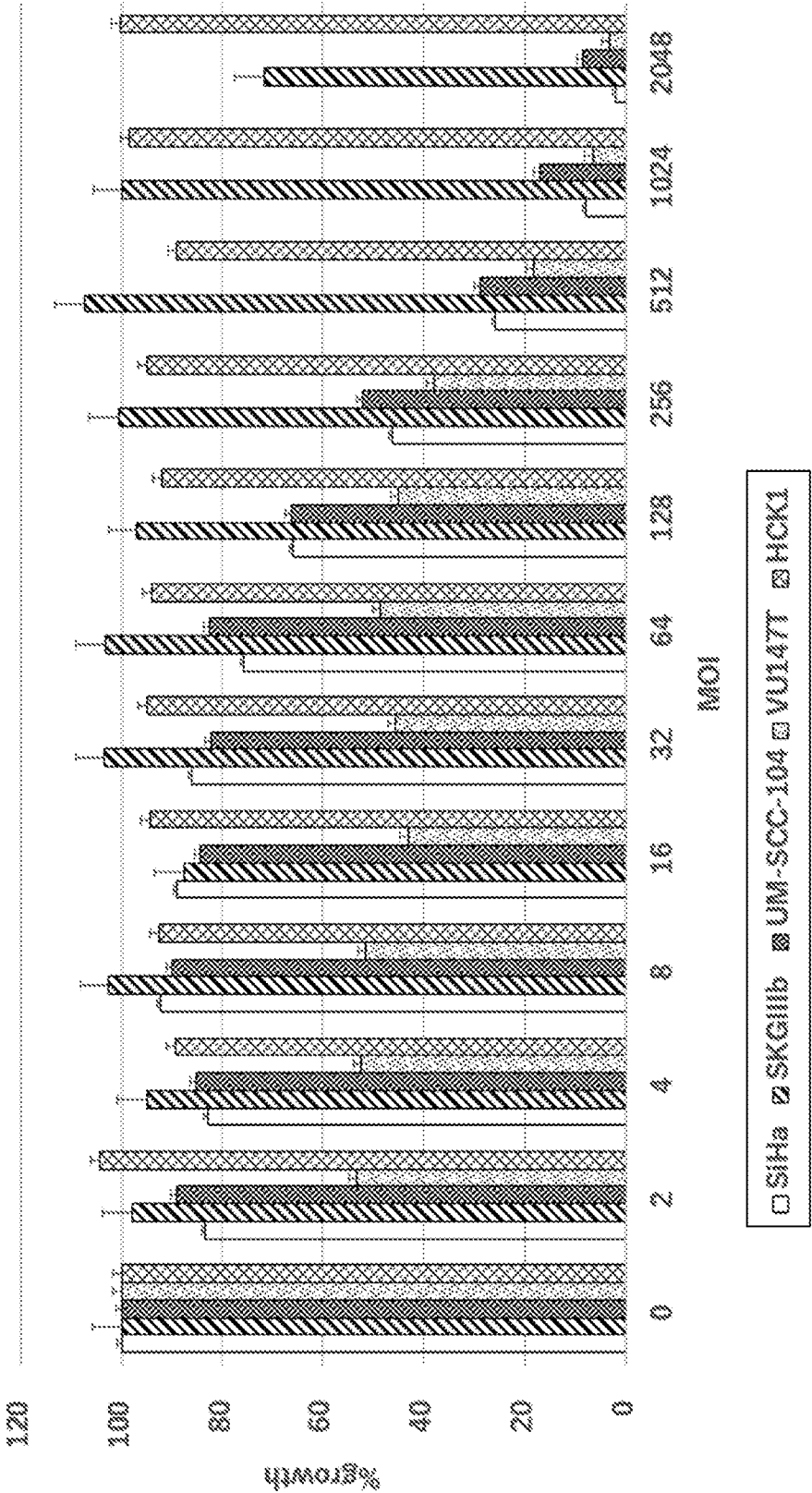
[図30]



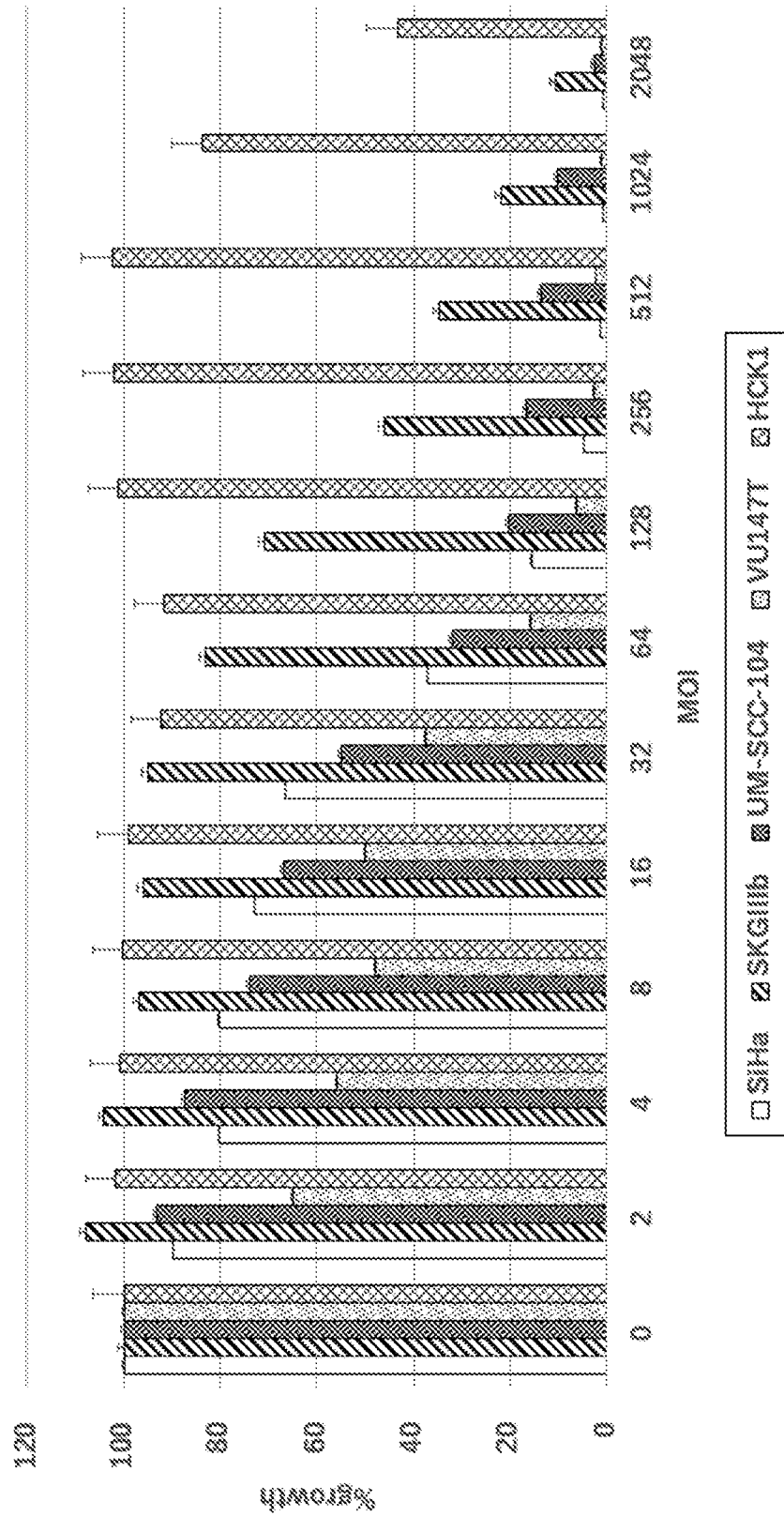
[図31]



[図32]



[図33]



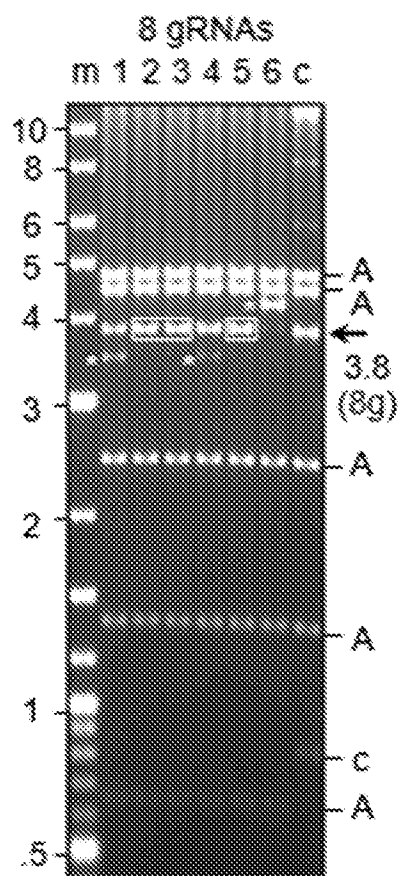
[図34]



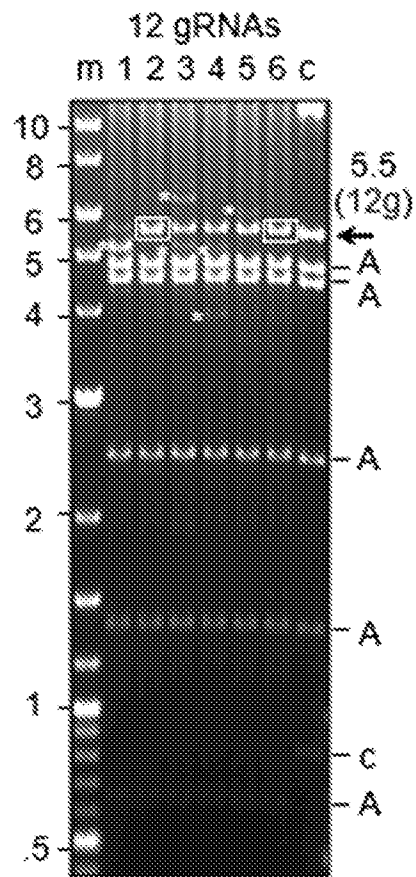
[図35]



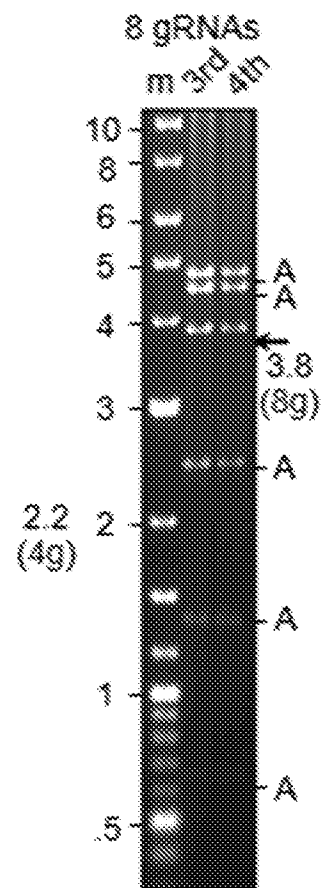
[図36]



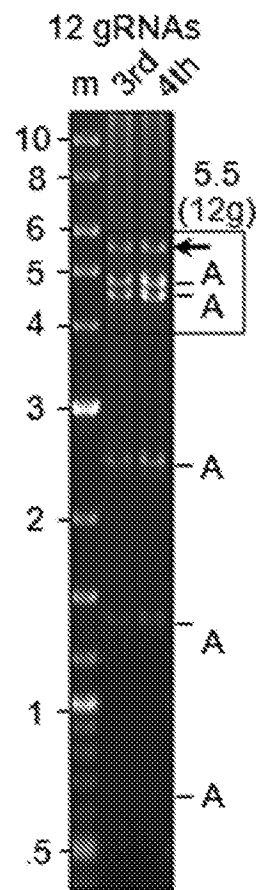
[図37]



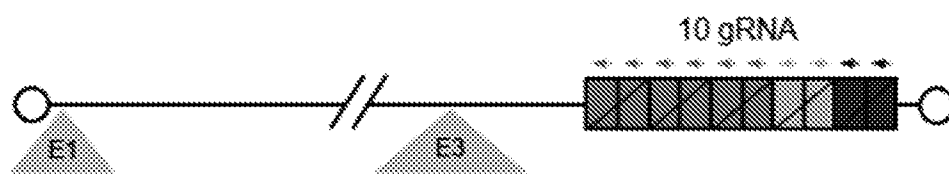
[図38]



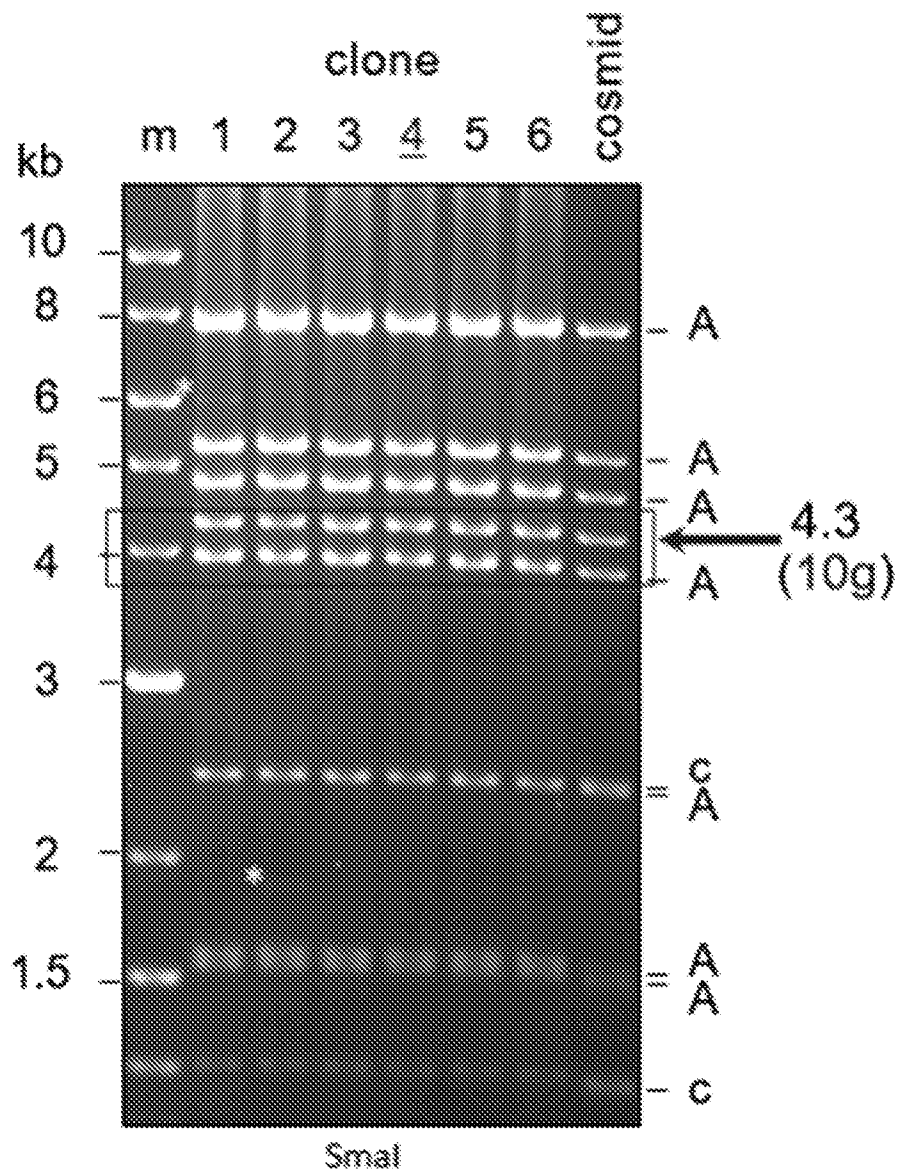
[図39]



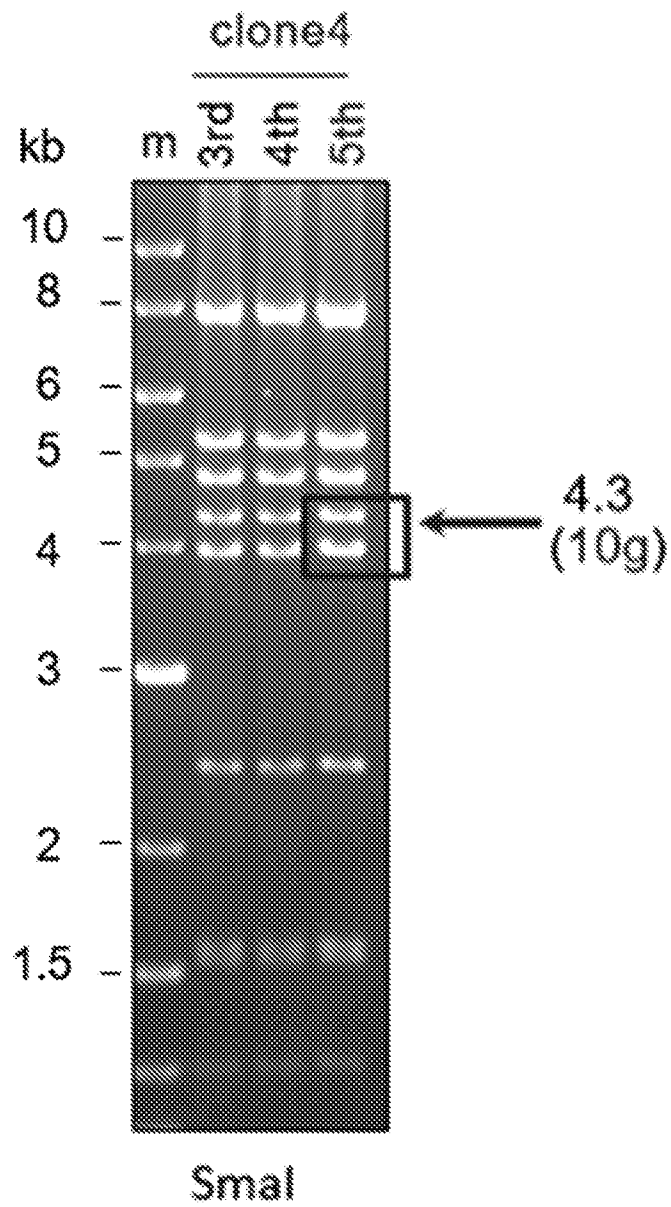
[図40]



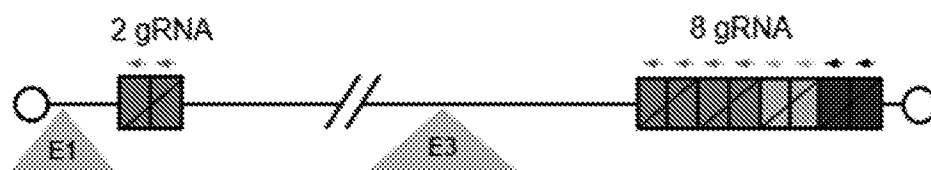
[図41]



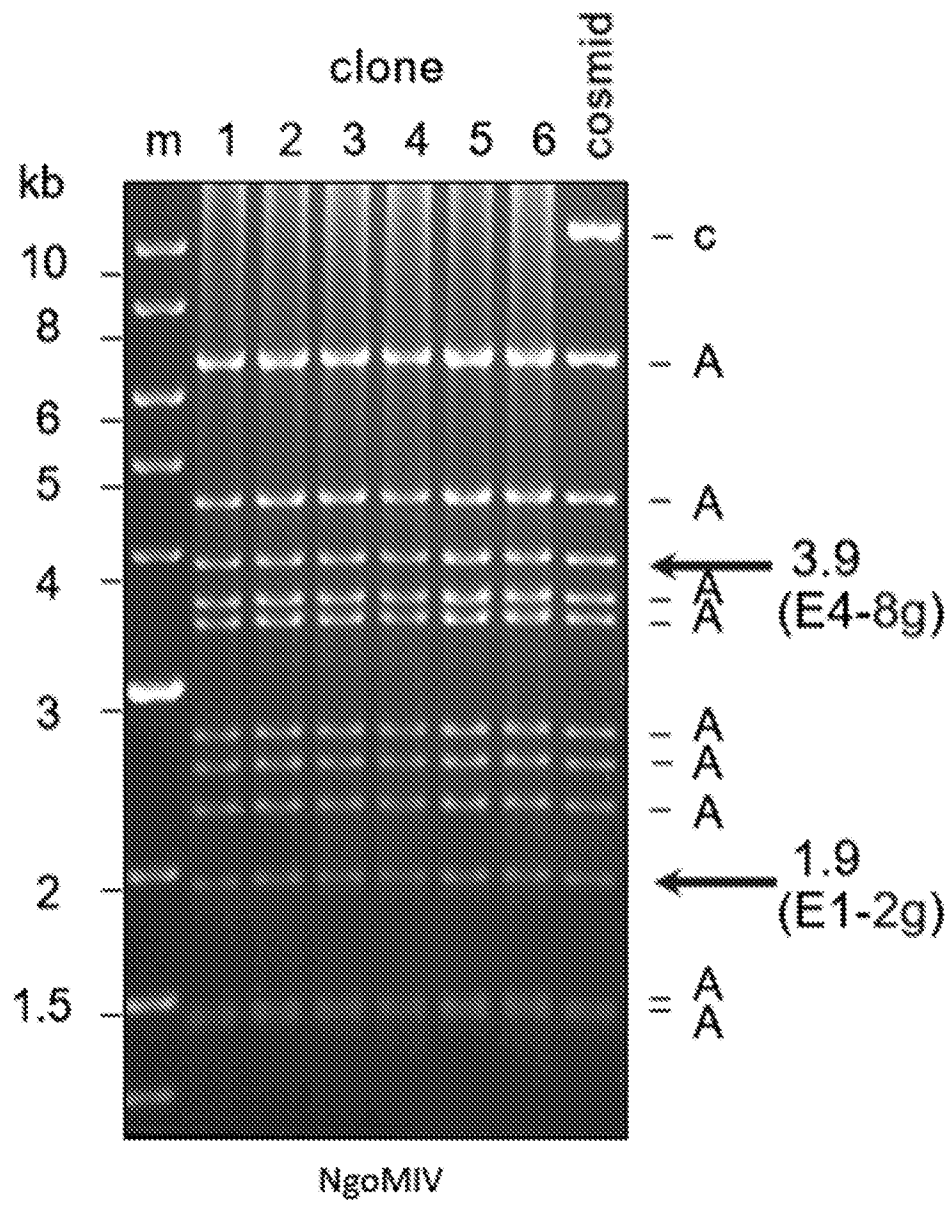
[図42]



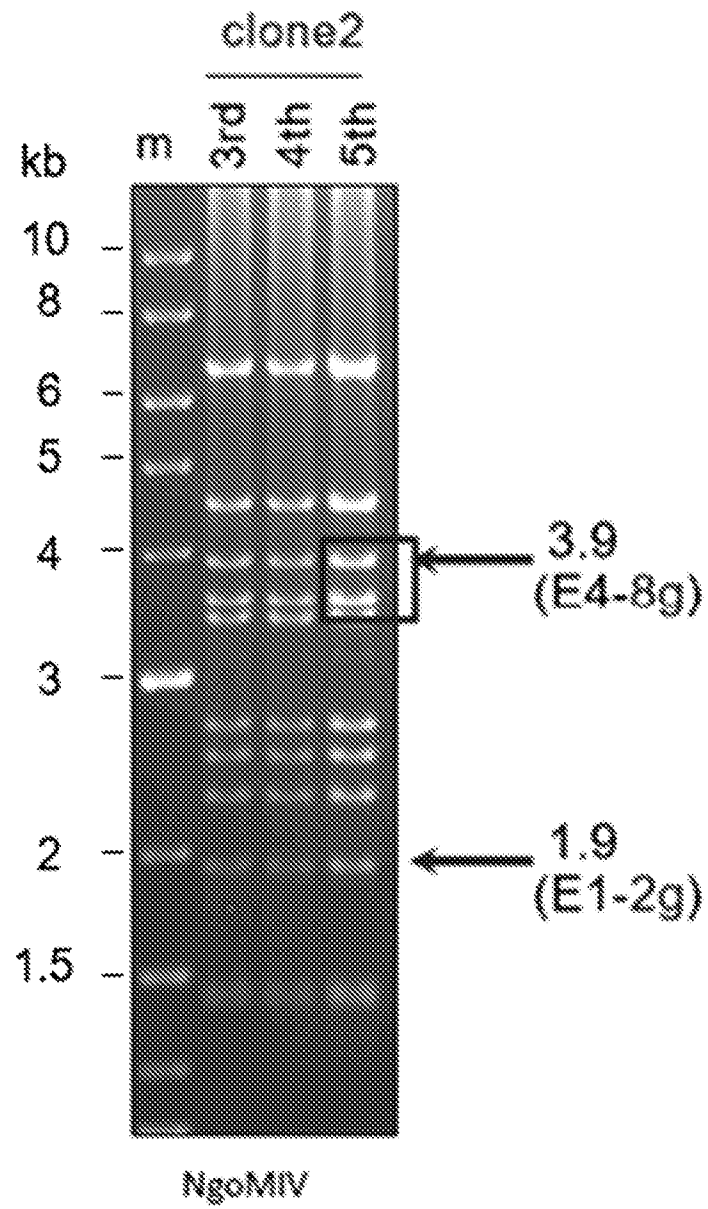
[図43]



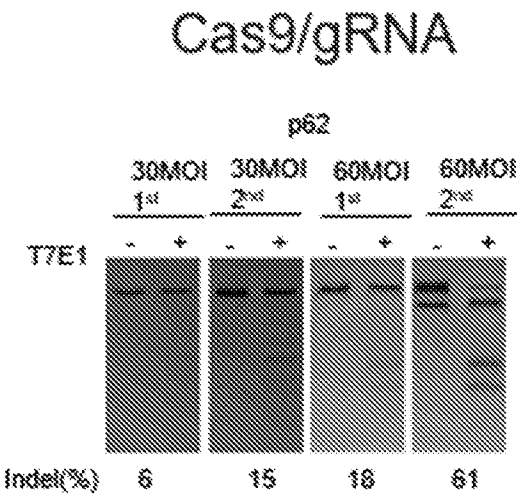
[図44]



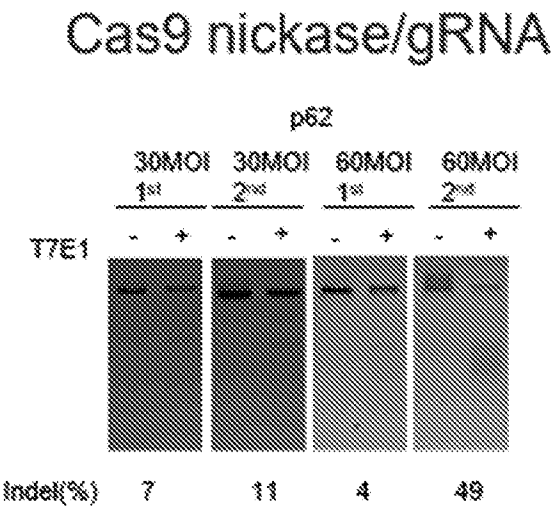
[図45]



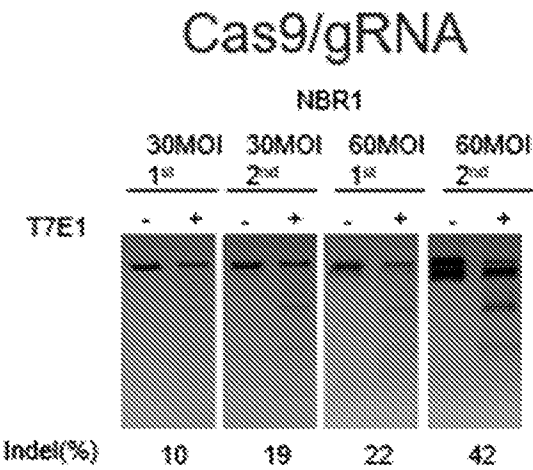
[図46]



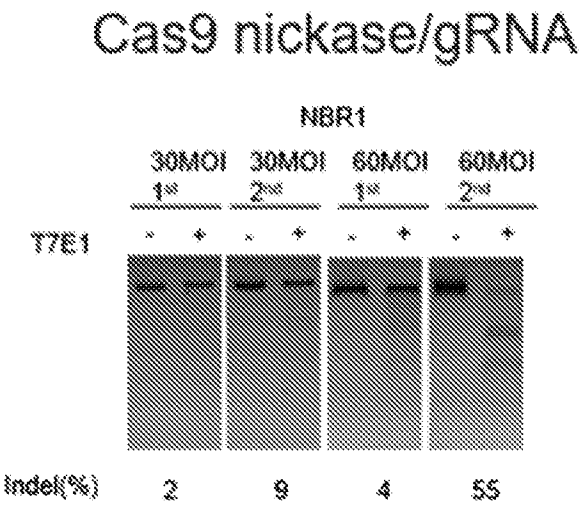
[図47]



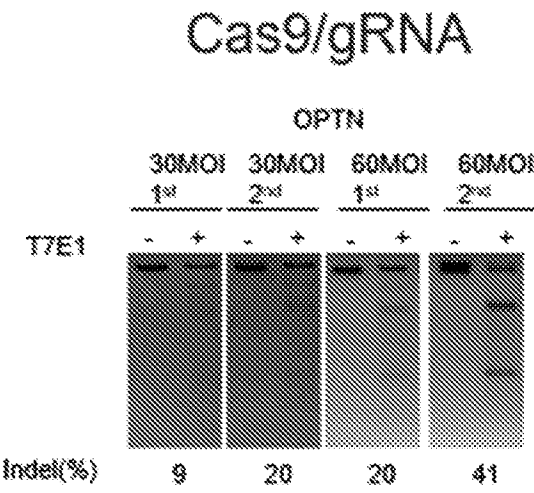
[図48]



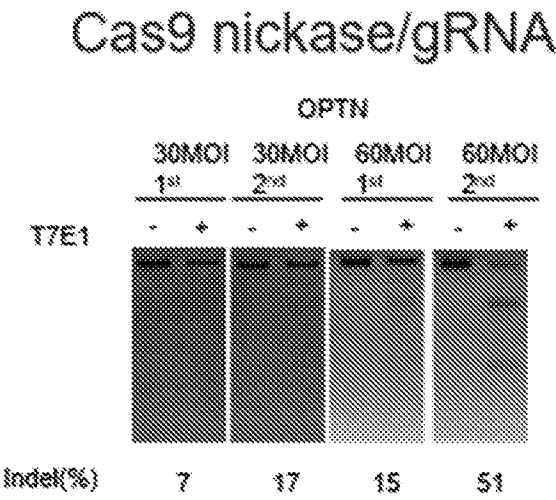
[図49]



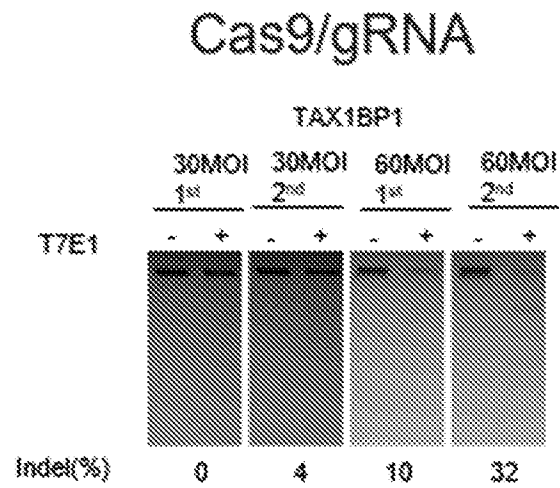
[図50]



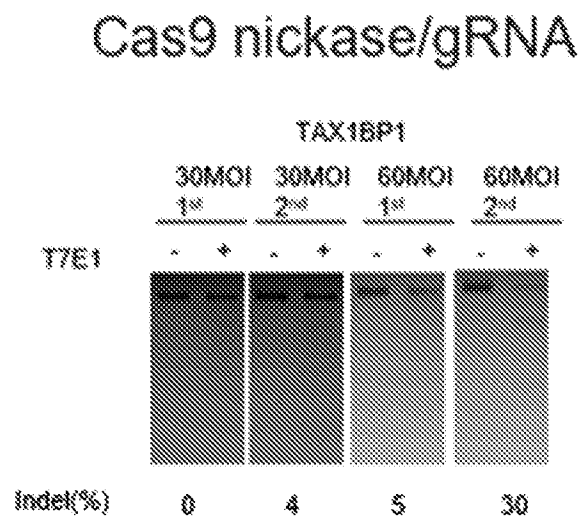
[図51]



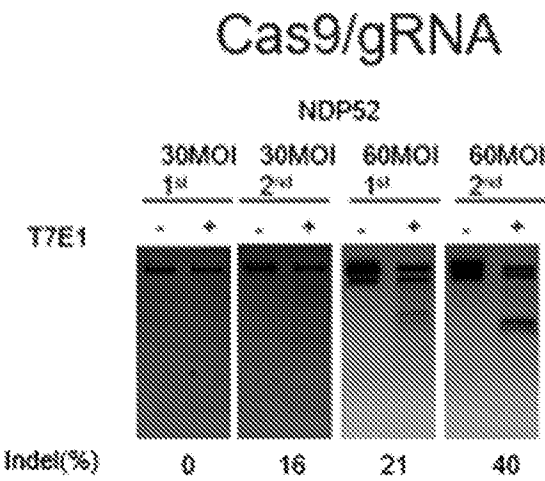
[図52]



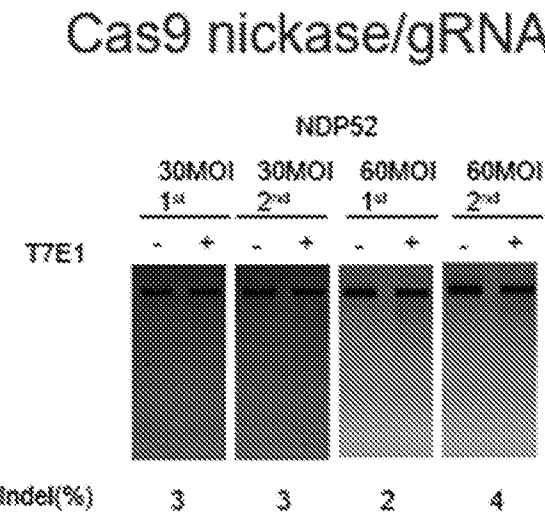
[図53]



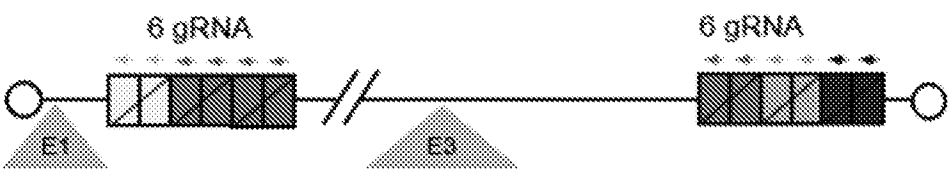
[図54]



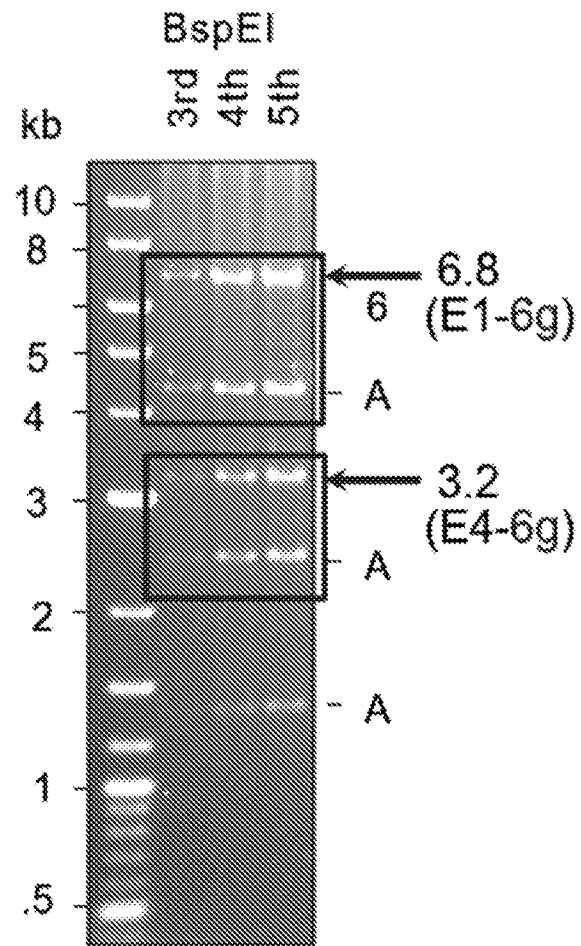
[図55]



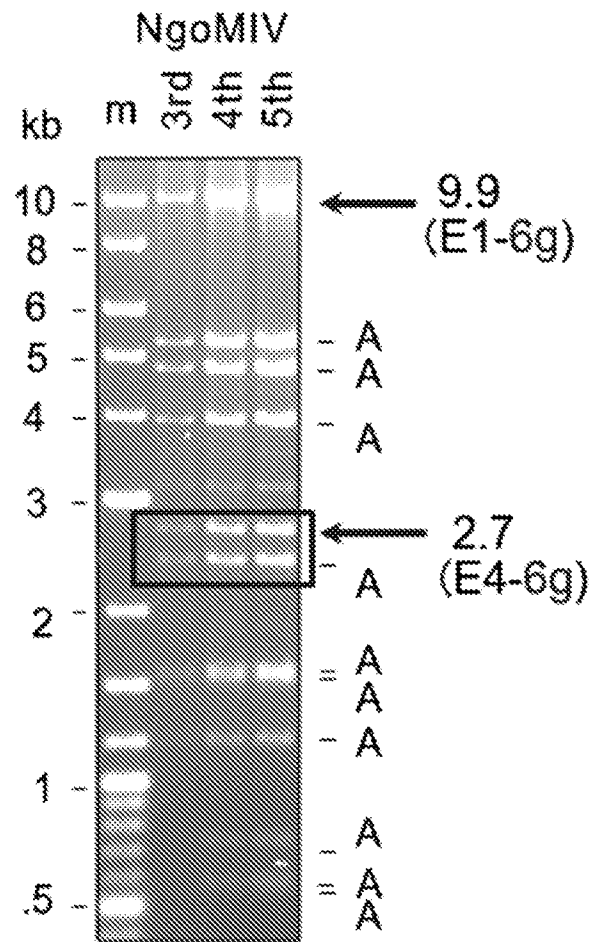
[図56]



[図57]



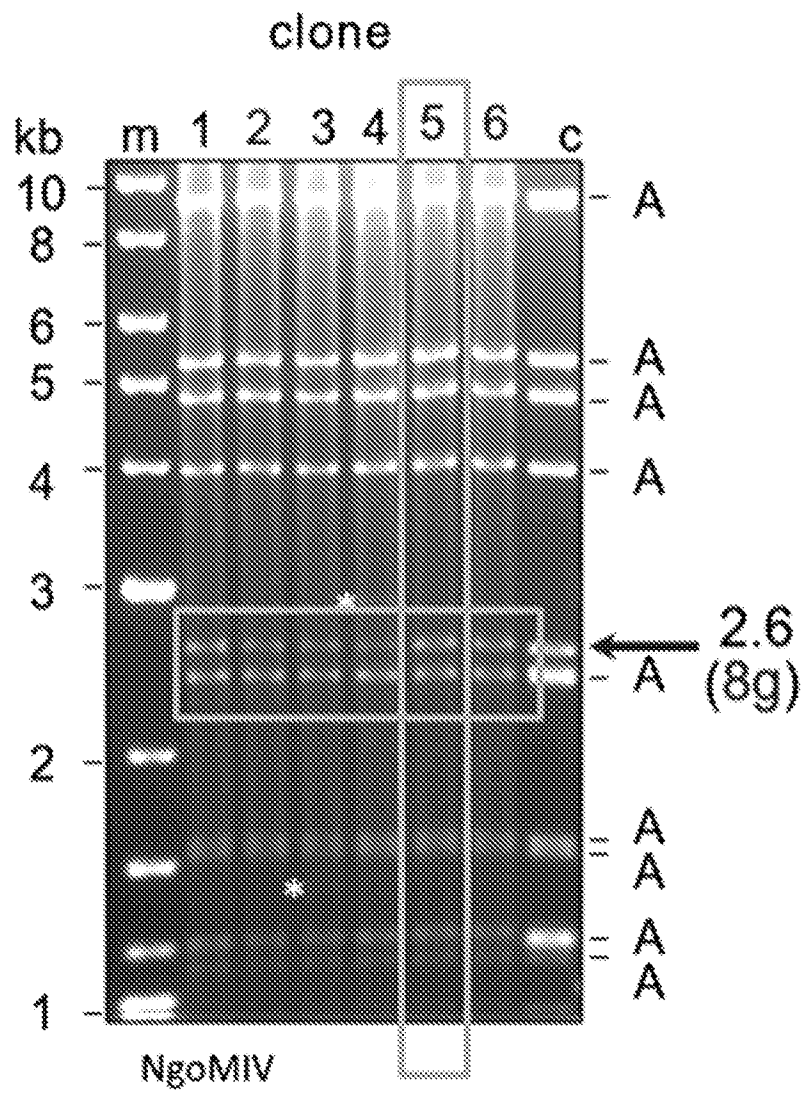
[図58]



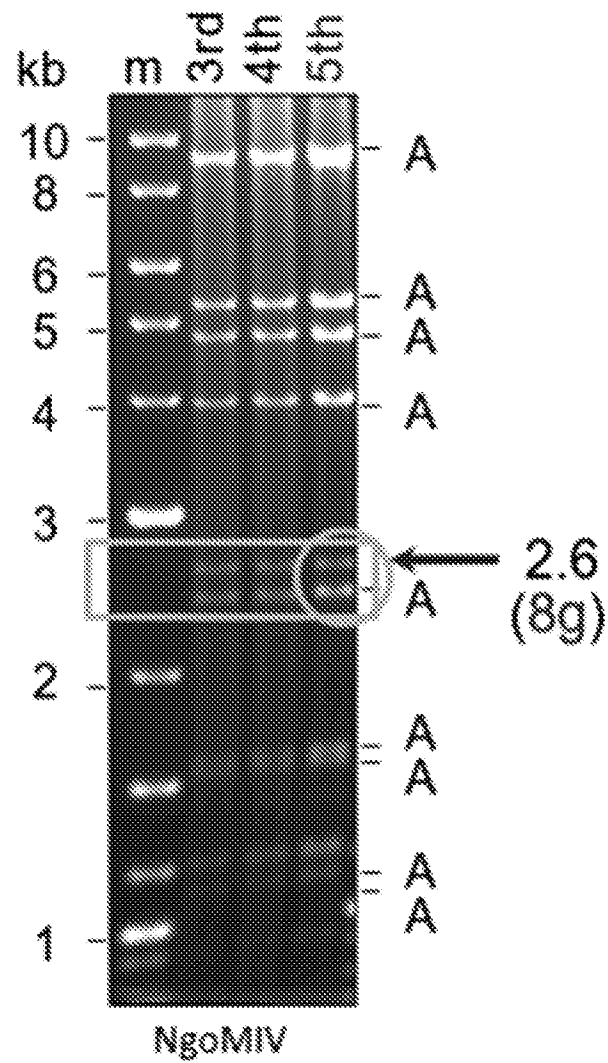
[図59]



[図60]



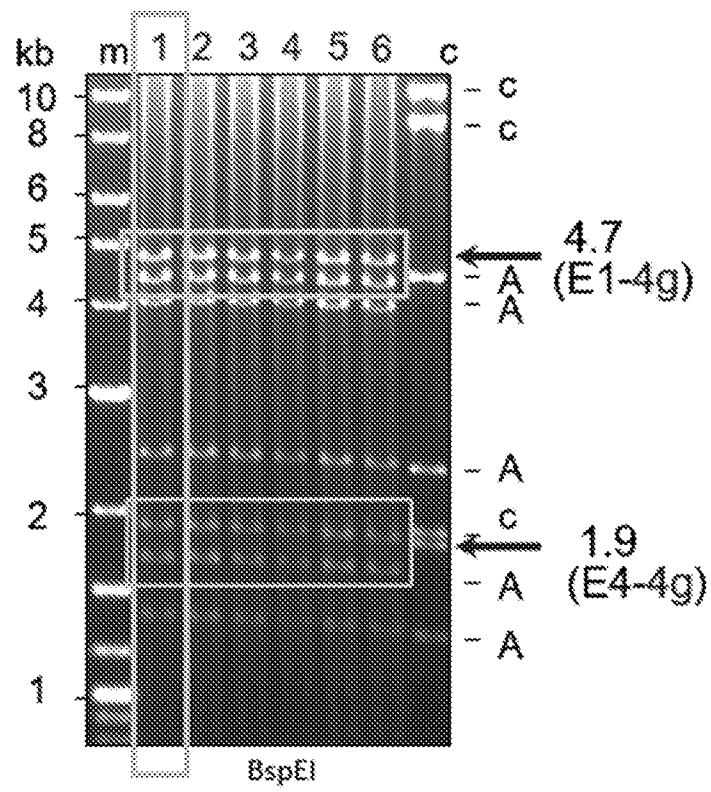
[図61]



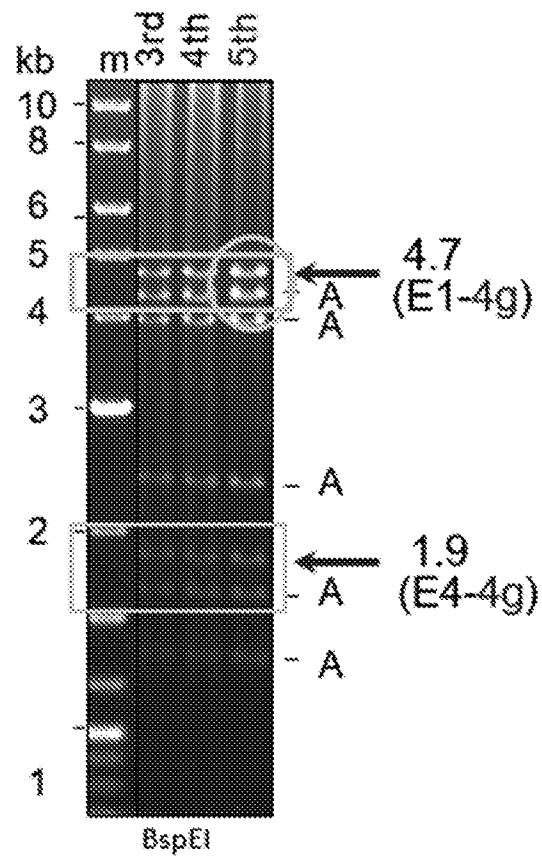
[図62]



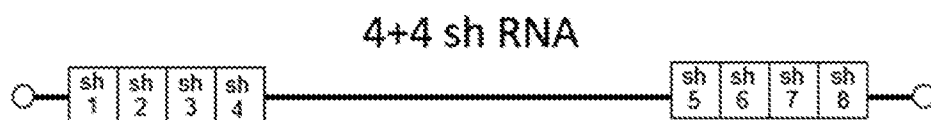
[図63]



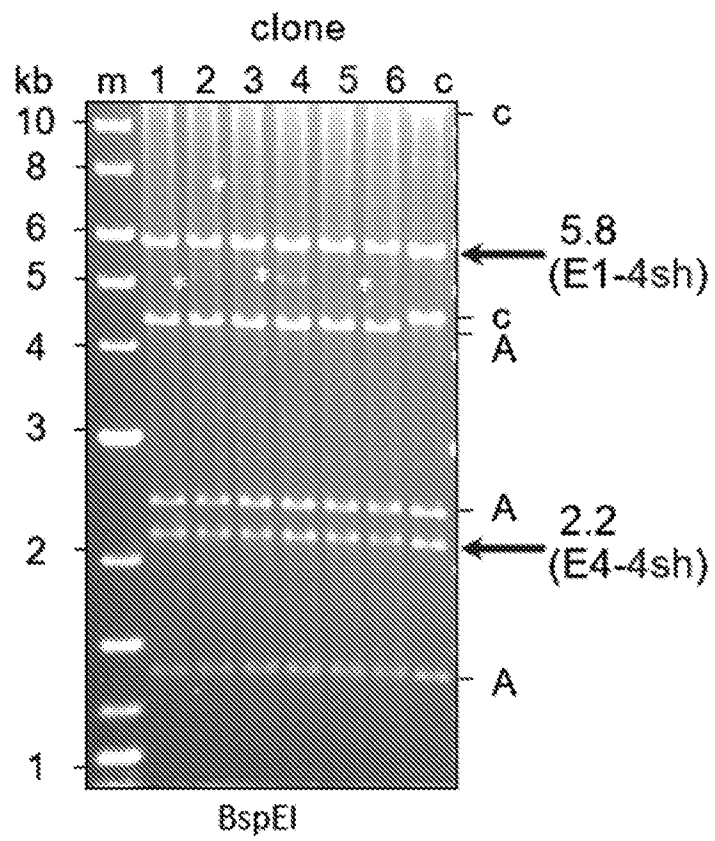
[図64]



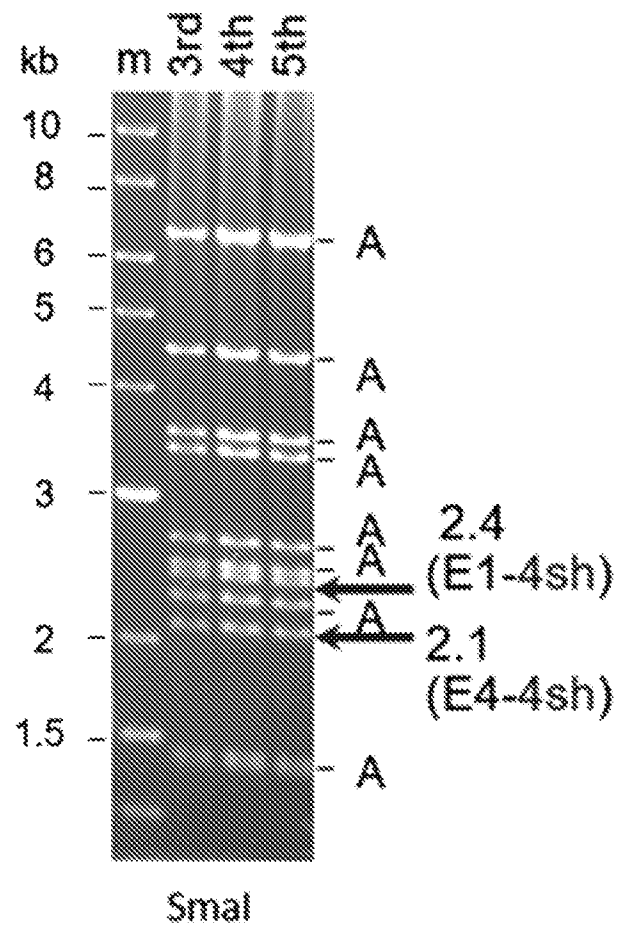
[図65]



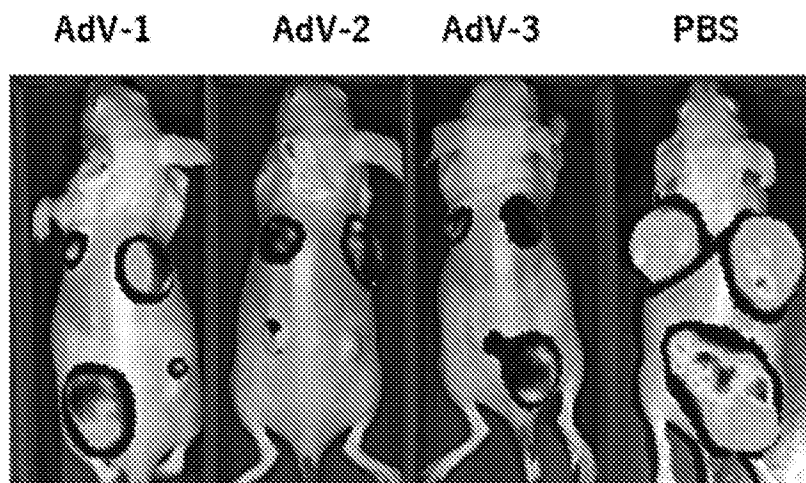
[図66]



[図67]

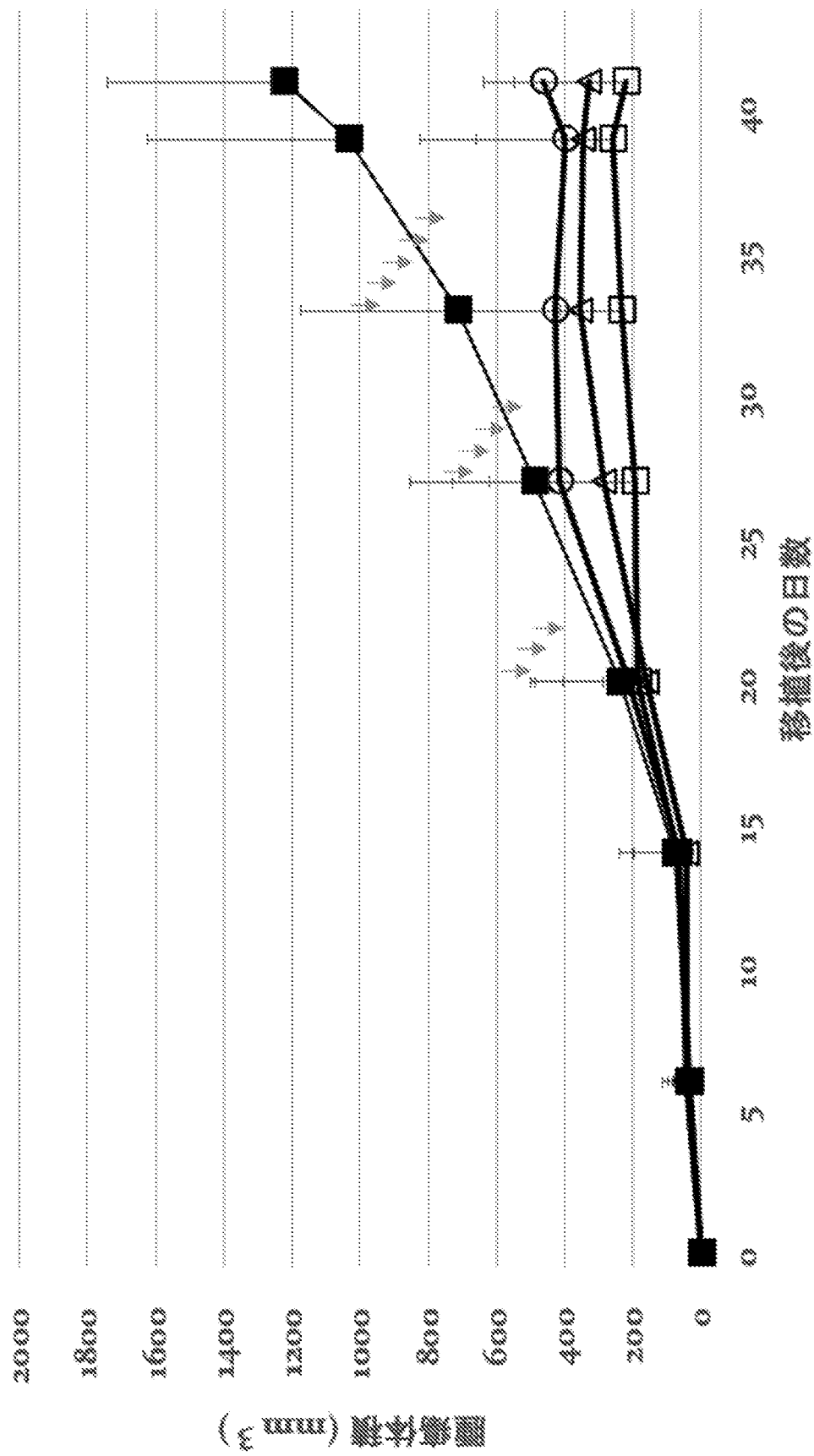


[図68]

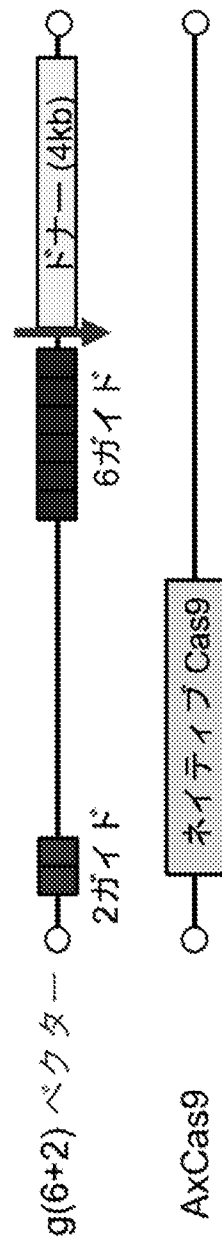


41日目

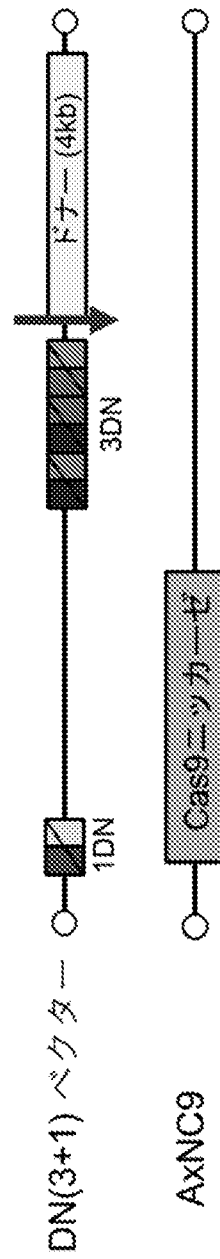
[図69]



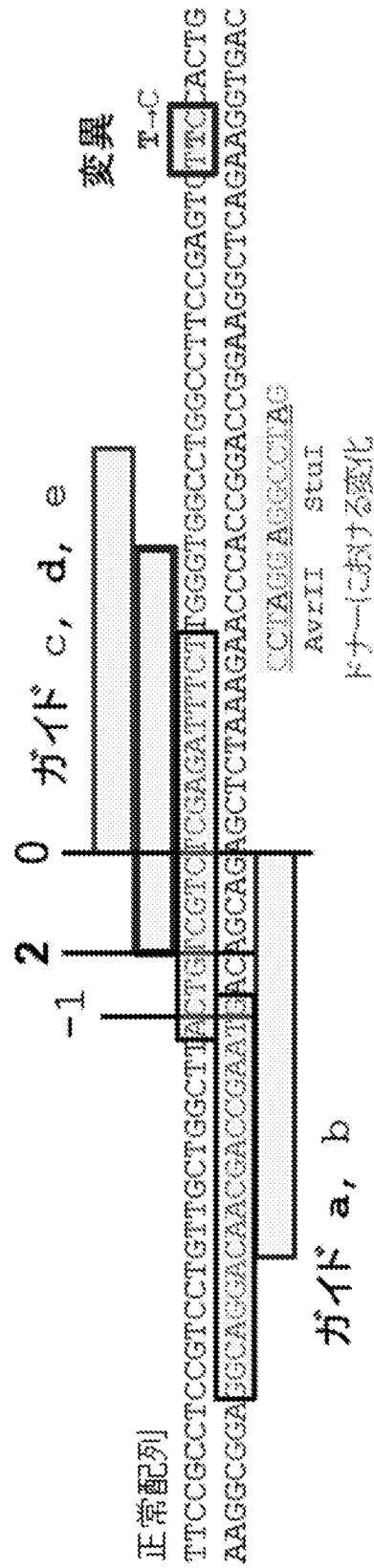
[図70]



[図71]

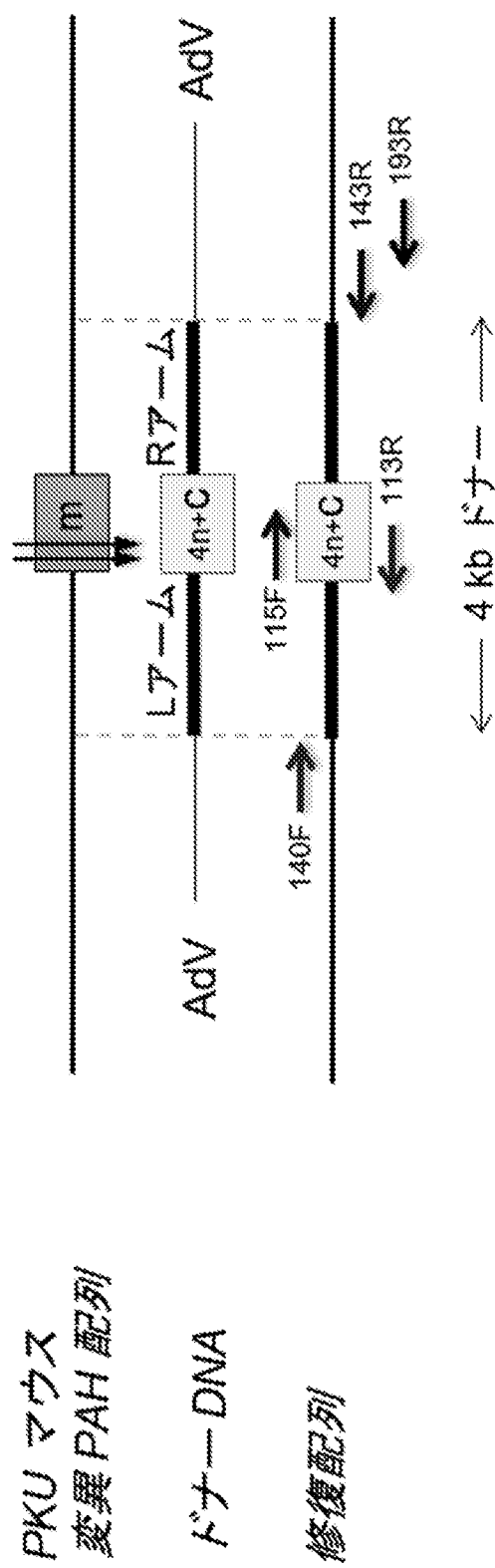


[図72]



Agarose gel electrophoresis image showing DNA bands for 3rd, 4th, 5th, and purified fractions. Molecular weight markers are on the left (10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1.5, 1.2, 1.0, 0.5 kb). On the right, bands are labeled 'A' with molecular weights 5.3 (6g) and 1.3 (2g) indicated by arrows. Two boxes highlight specific bands across the four lanes.

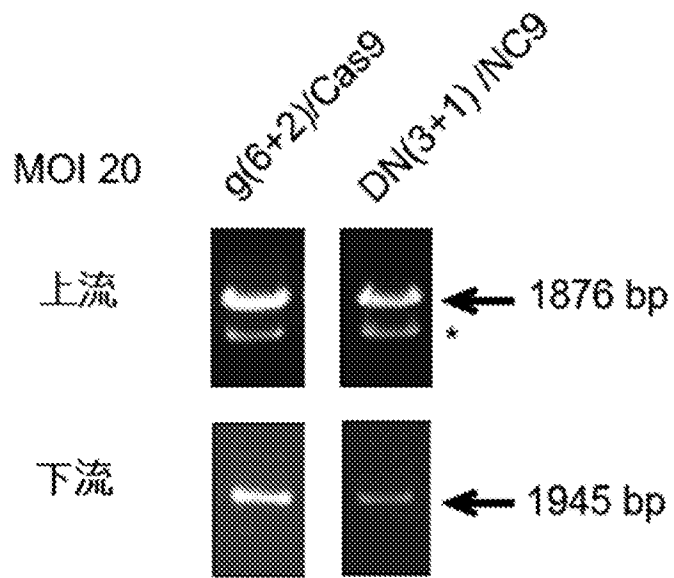
[図74]



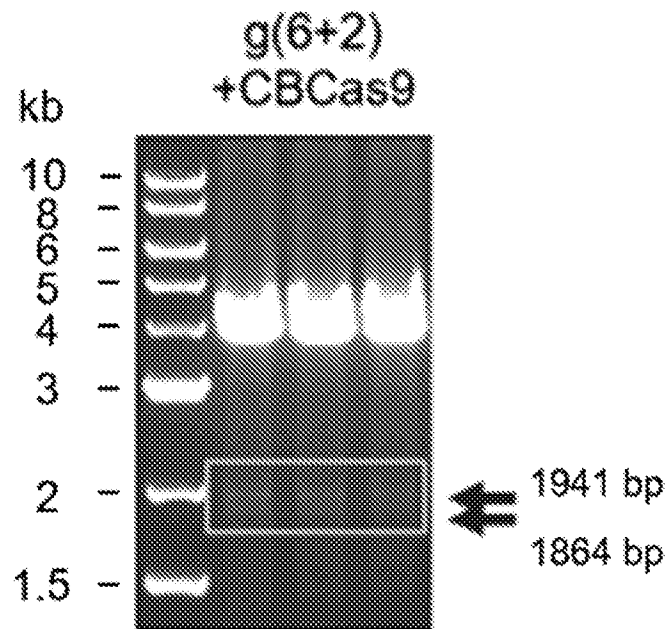
[図75]

	F	L	G	G	L	A	F	R	V	S
PKUマウス配列	TTC	TTC	CGT	GGC	CTG	GCC	TTC	CGA	GTC	TTC
ドナー配列	TTC	CTA	CGA	GGC	CTA	GCC	TTC	CGA	GTC	TTC
	<u>AvrII</u>				<u>StuI</u>				F	

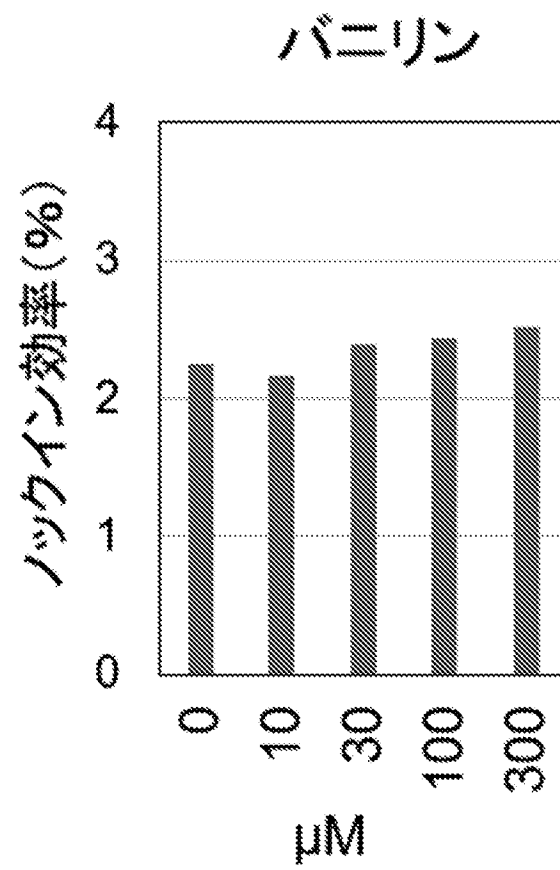
[図76]



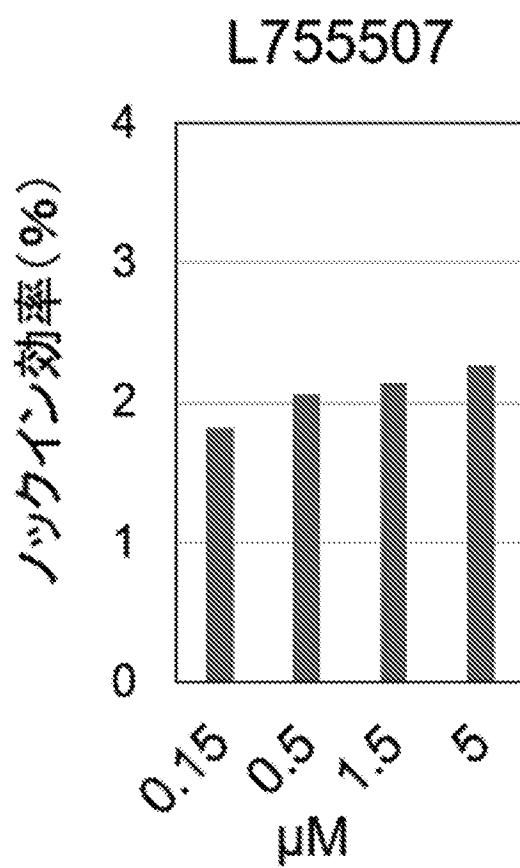
[図77]



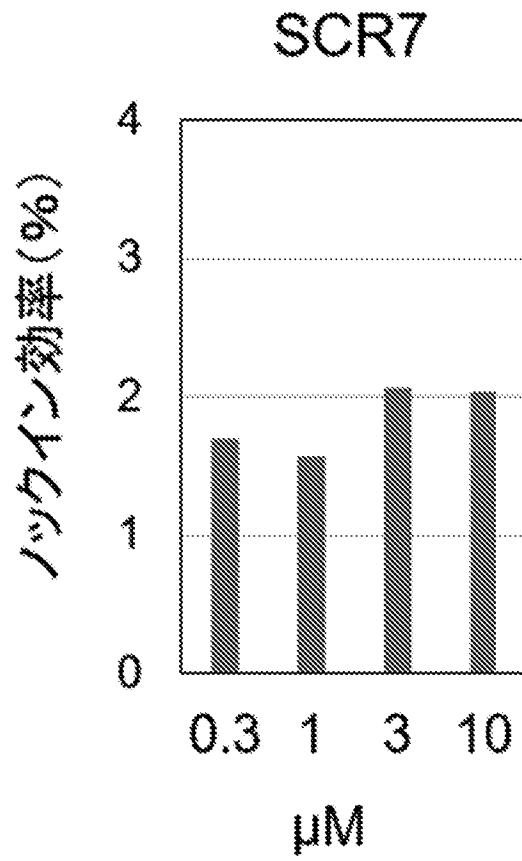
[図78]



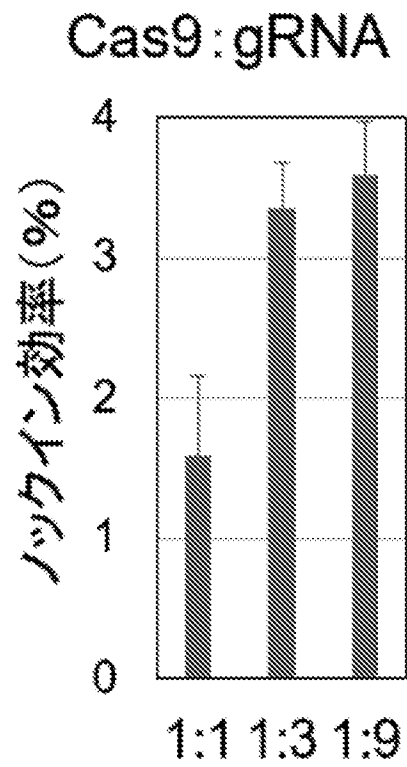
[図79]



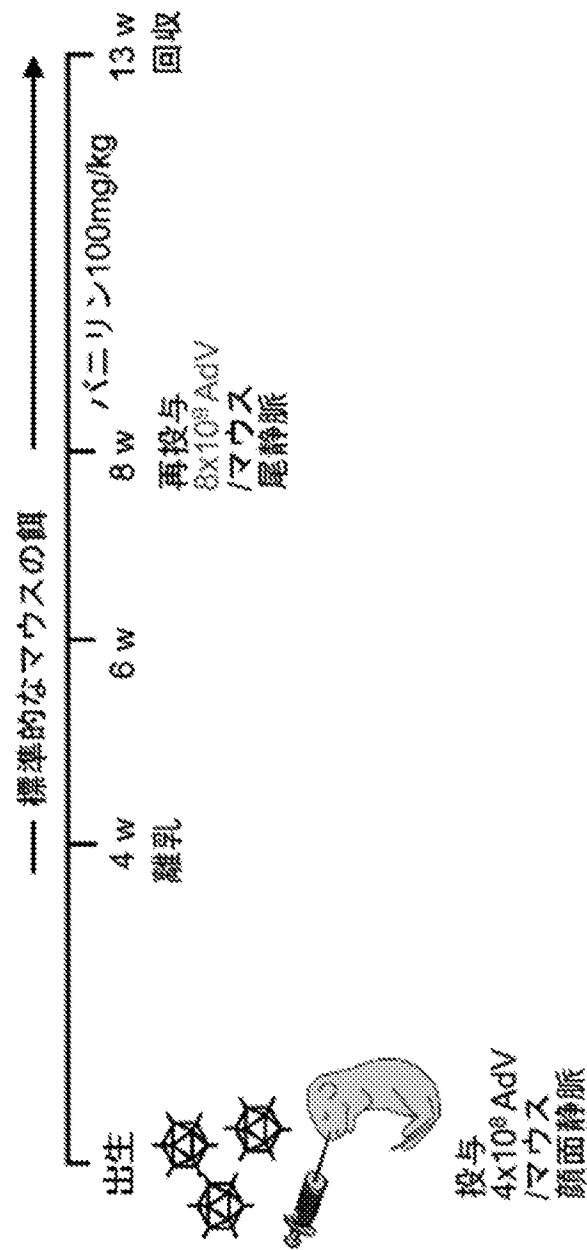
[図80]



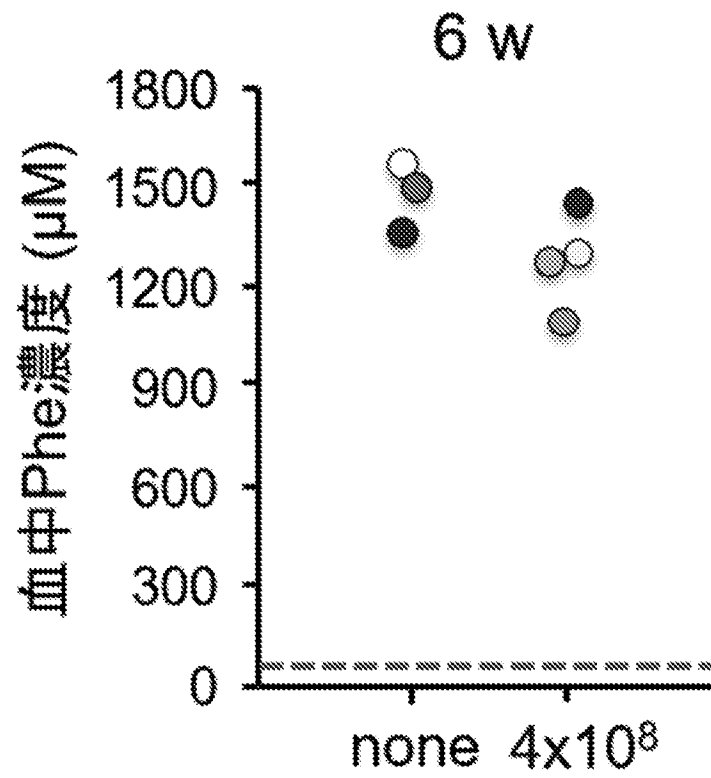
[図81]



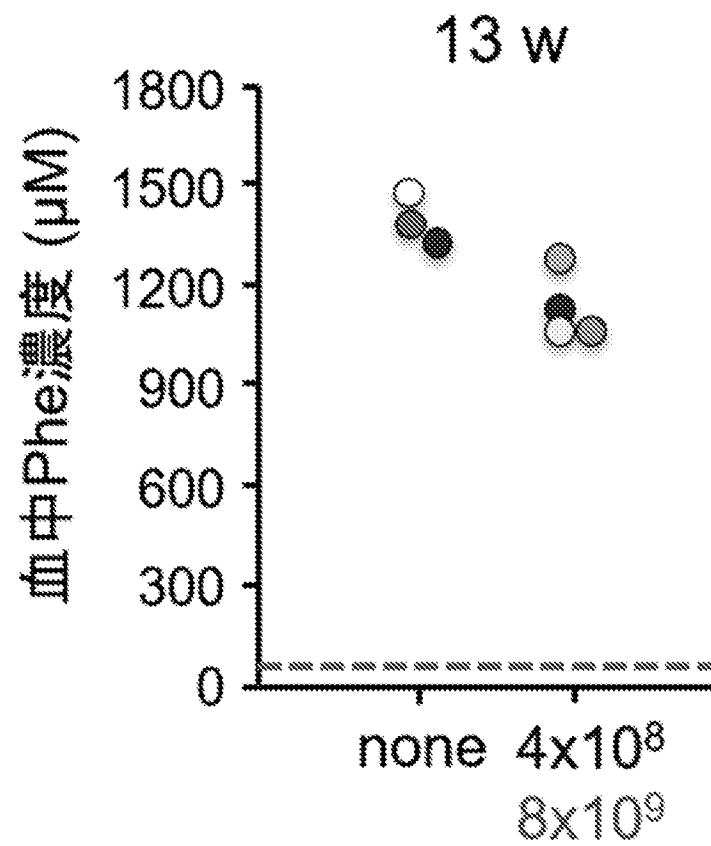
[図82]



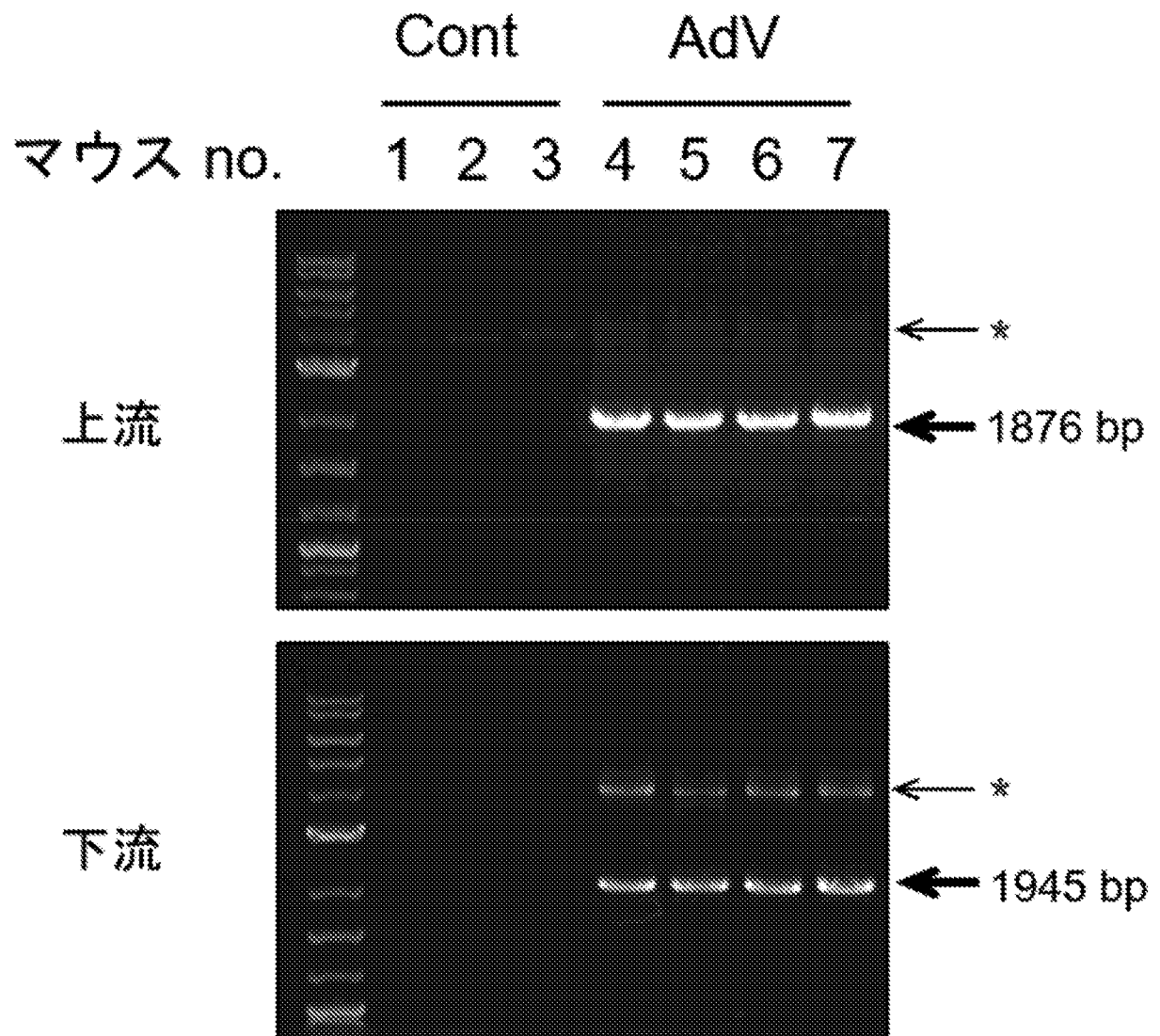
[図83]



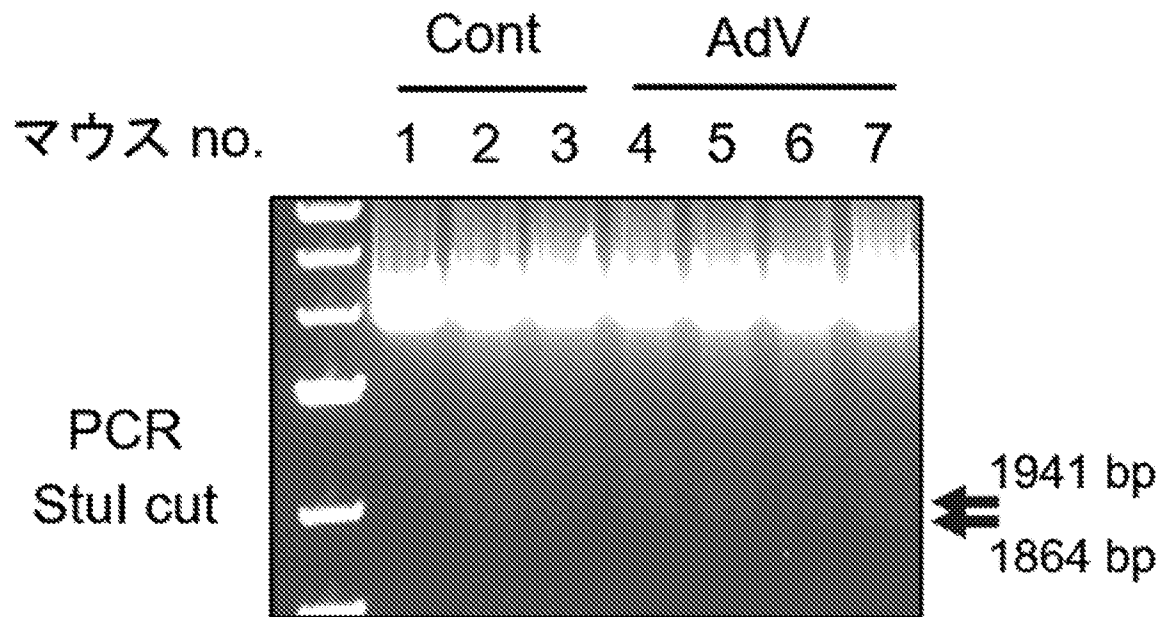
[図84]



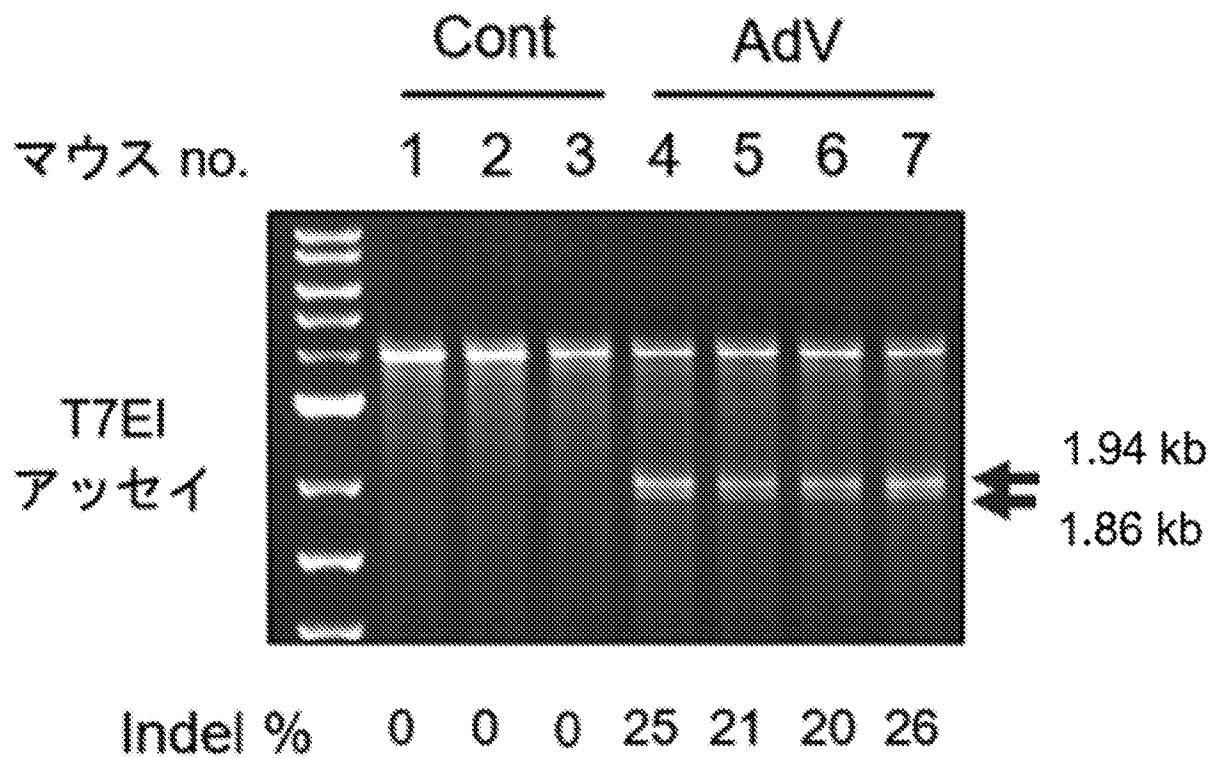
[図85]



[図86]

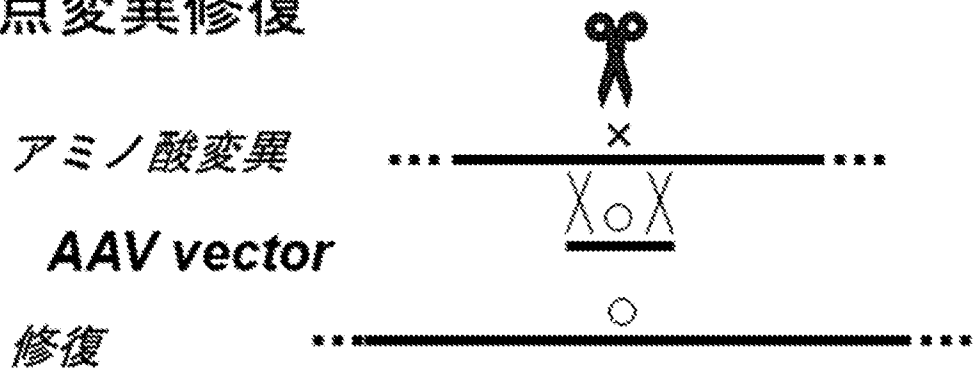


[図87]

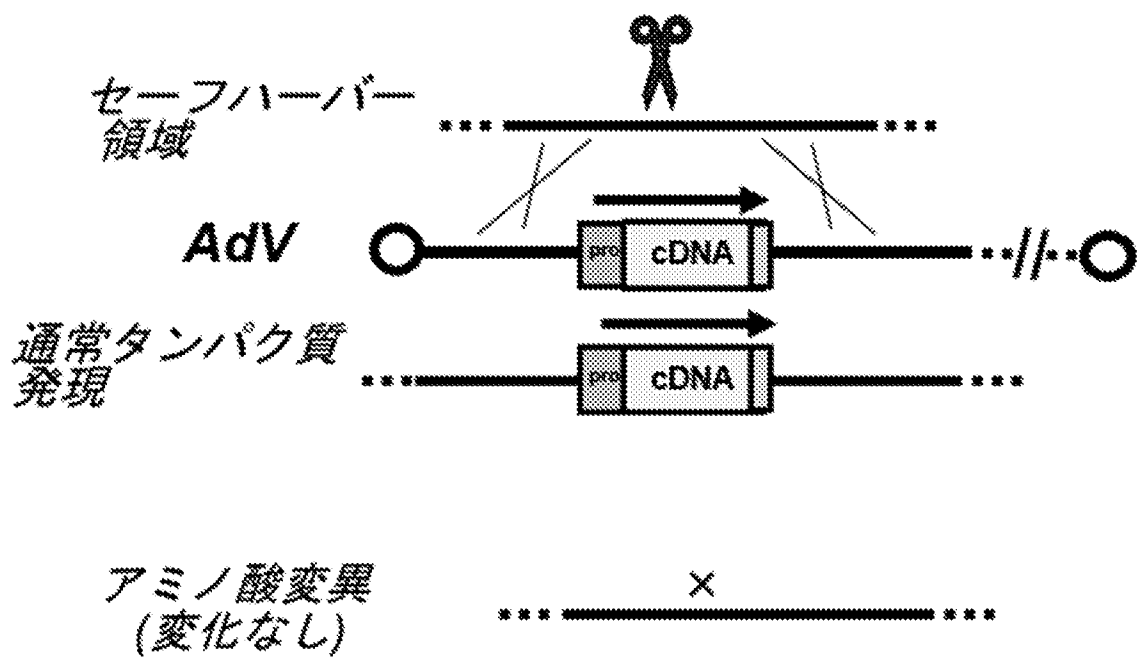


[図88]

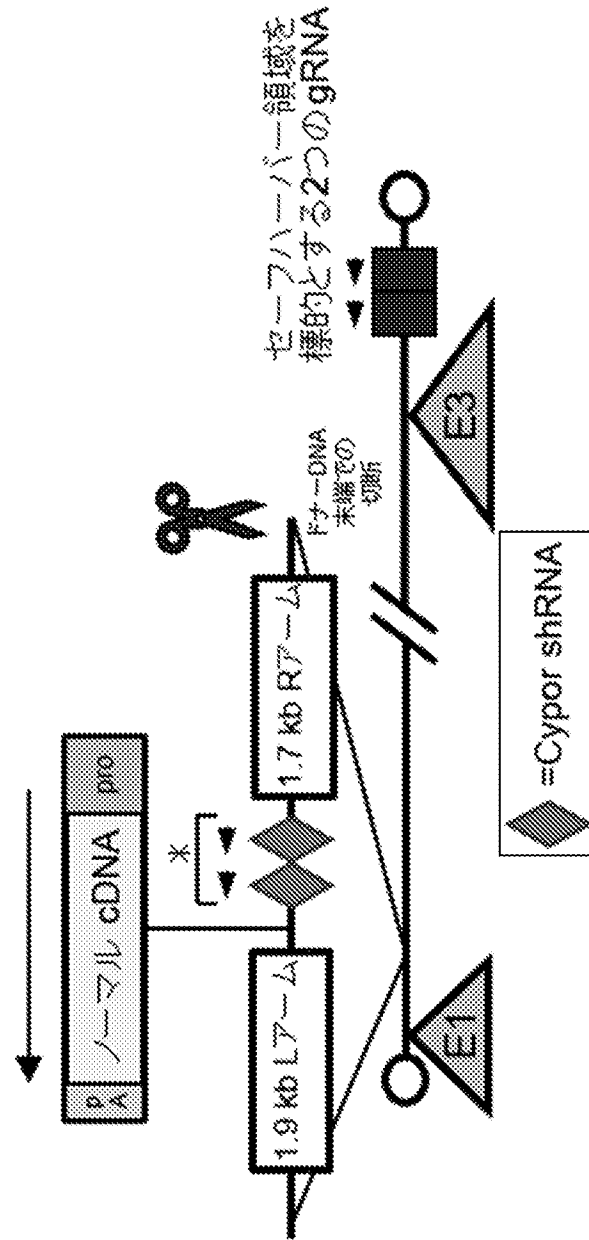
点変異修復

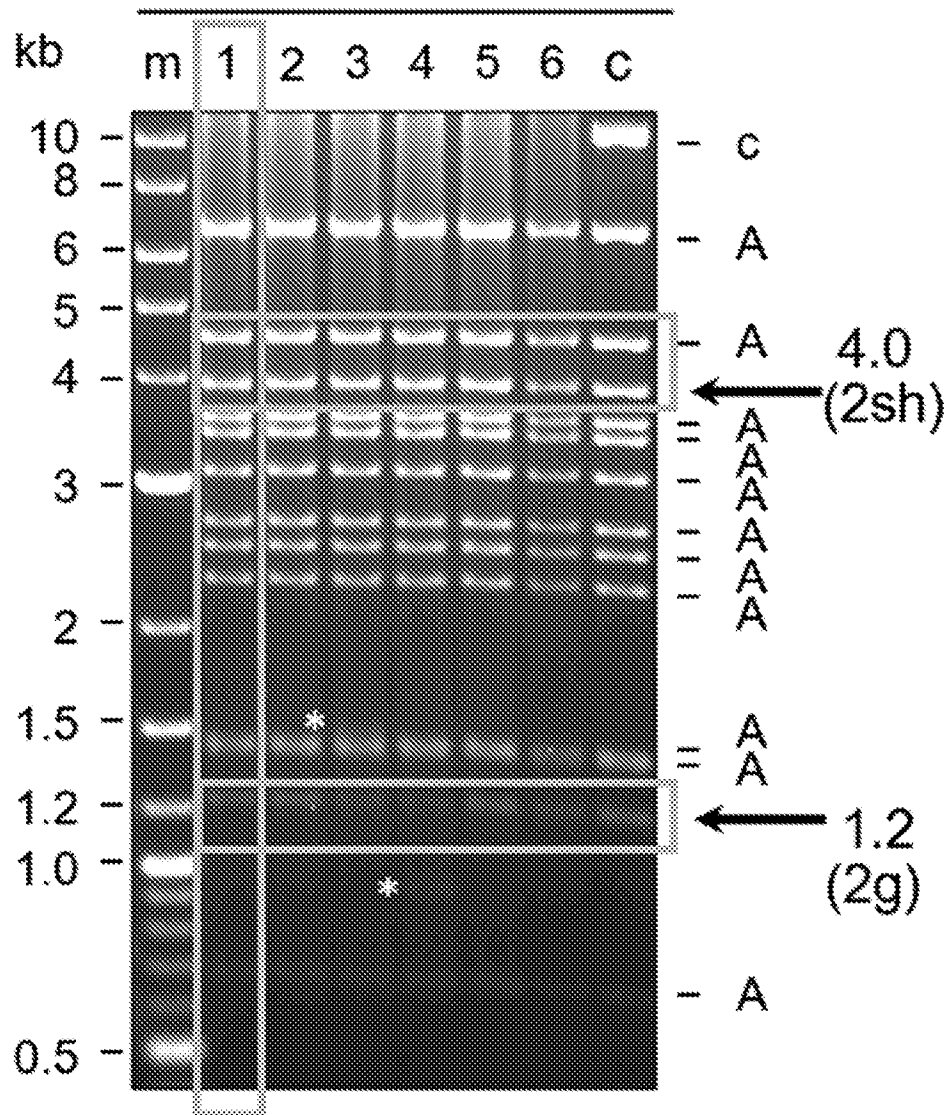


cDNAノックイン



[図89]

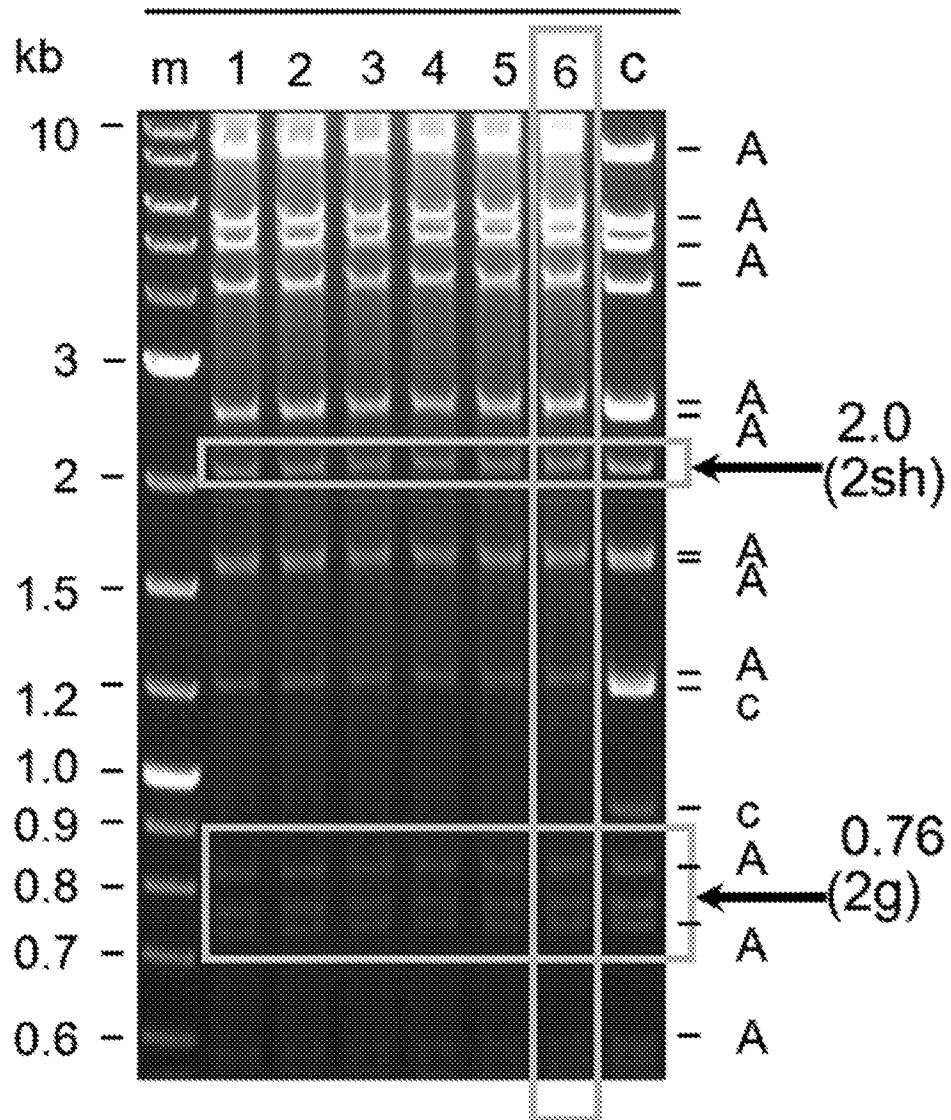




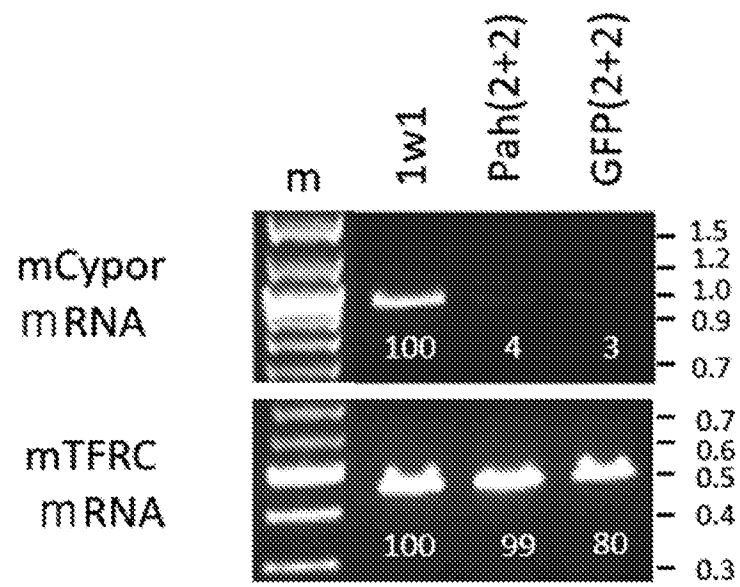
[図91]

GFP

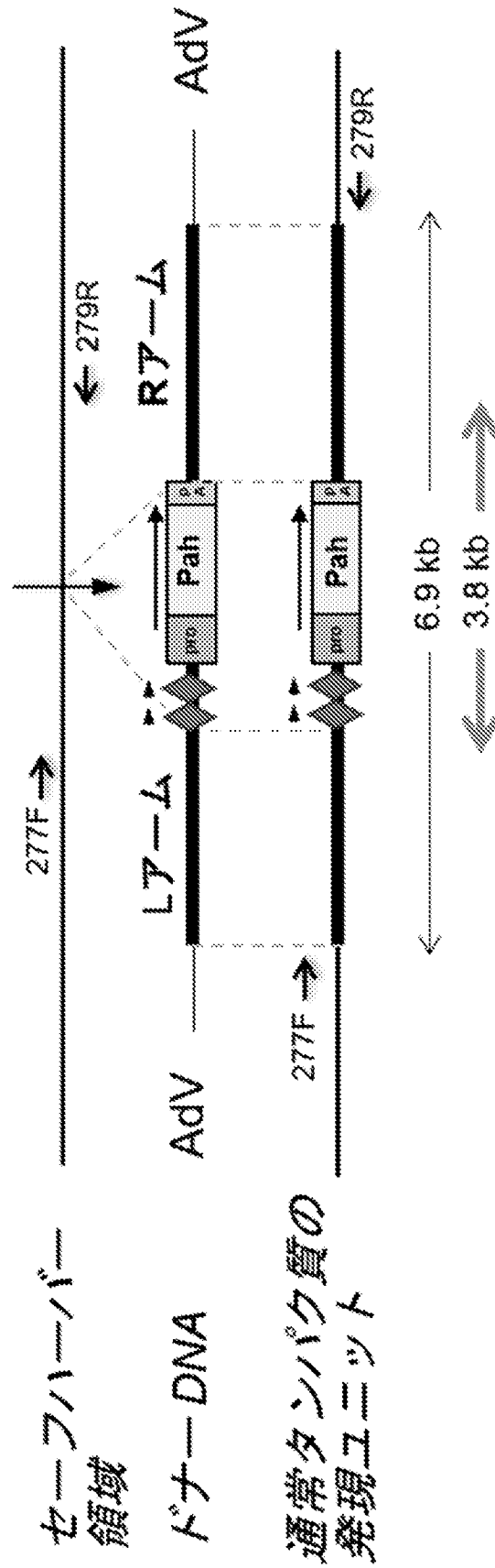
NgoMIV/ClaI



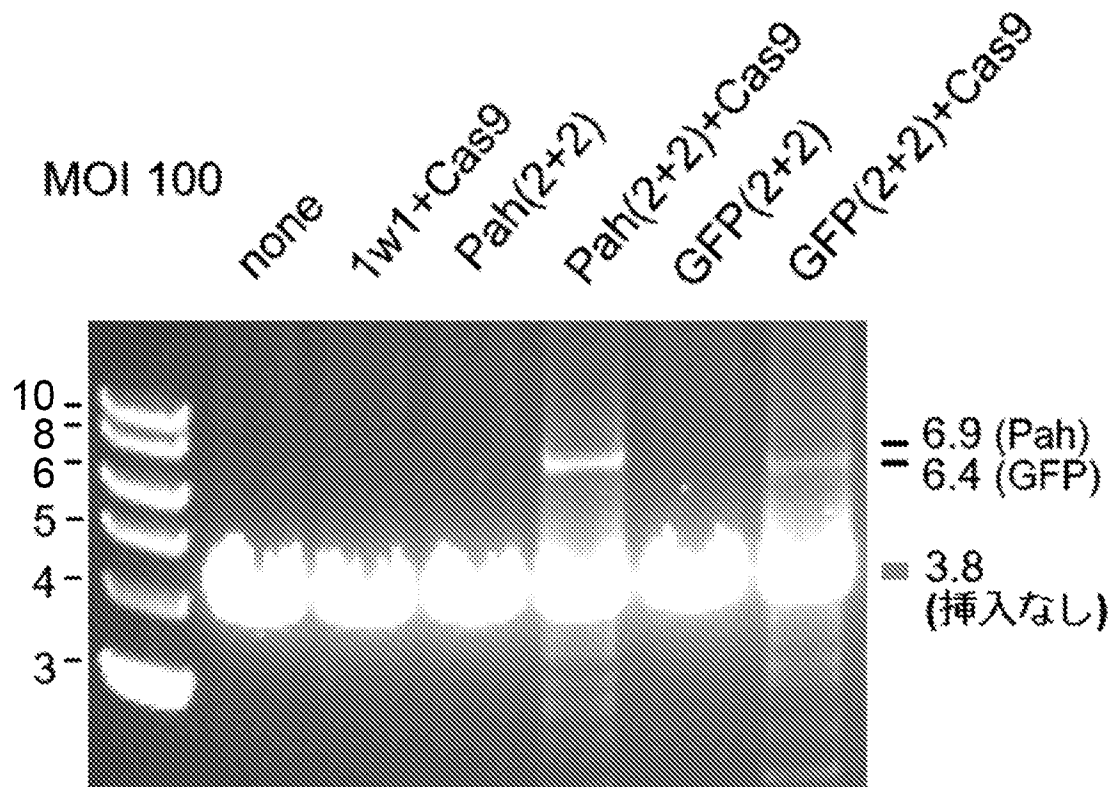
[図92]



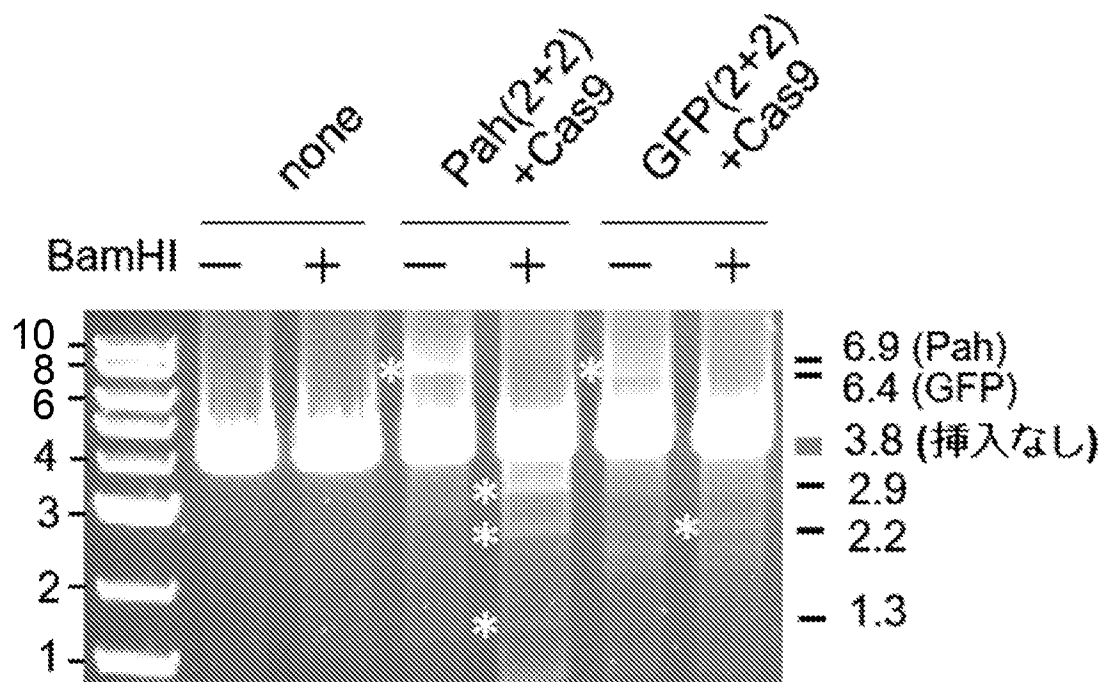
[図93]



[図94]



[図95]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7088(2006.01)i; **A61K 35/761**(2015.01)i; **A61K 38/47**(2006.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i;
C12N 15/09(2006.01)i; **C12N 15/861**(2006.01)i

FI: A61K31/7088; A61K35/761; A61K38/47; A61K48/00; A61P35/00; C12N15/09 110; C12N15/861 Z ZNA

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)

A61K31/7088; A61K35/761; A61K38/47; A61K48/00; A61P35/00; C12N15/09; C12N15/861

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/067004 A1 (MICROBIAL CHEMISTRY RESEARCH FOUNDATION) 02 April 2020 (2020-04-02) paragraphs [0001], [0028]-[0038], claims	1-11
X	paragraph [0020], claims	12
Y	paragraph [0020], claims	13-31
A	JUBAIR, L. et al., Systemic Delivery of CRISPR/Cas9 Targeting HPV Oncogenes Is Effective at Eliminating Established Tumors, Molecular Therapy, 2019, vol. 27, no. 12, pp. 2091-2099 abstract, fig. 1	1-11
Y	abstract, fig. 1	22
A	GAO, C. et al., The application of CRISPR/Cas9 system in cervical carcinogenesis, Cancer Gene Therapy, 2022, vol. 29, pp. 466-474 abstract, fig. 1	1-11
Y	abstract, fig. 1	22



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

05 April 2024

Date of mailing of the international search report

23 April 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003376

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHEN, S. et al., CRISPR/Cas9-HPV-liposome enhances antitumor immunity and treatment of HPV infection-associated cervical cancer, Journal of Medical Virology, 2022, vol. 95, article. e28144	1-11
Y	abstract	22
Y	HAWKINS, L. K. et al., A 12,500 MW Protein Is Coded by Region E3 of Adenovirus, Virology, 1992, vol. 188, pp. 486-494	13, 21, 28, 31
Y	abstract, fig. 2	
Y	前川文 他, Cas9及び多重guide RNA発現アデノウイルスベクターを用いた高効率HBV DNA除去システム, 第39回日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, 2016, 1P-0780, (MAEKAWA, Aya et al, Efficient elimination system of HBV DNA using adenovirus vector expressing Cas9 and multiplex guide RNAs), non-official translation (Program and Proceedings of 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan) 1P-0780, entire text	14-31
Y	WO 2012/121071 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 13 September 2012 (2012-09-13)	23-31
Y	claim 7	
Y	WO 2020/171222 A1 (KAGOSHIMA UNIVERSITY) 27 August 2020 (2020-08-27)	30
Y	paragraphs [0005], [0006]	
Y	JP 2021-522787 A (OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY) 02 September 2021 (2021-09-02)	30
Y	claims 1, 7, paragraph [0008]	
A	MENGSTIE, M. A. et al., Viral Vectors for the in Vivo Delivery of CRISPR Components: Advances and Challenges, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, vol. 10, article. 895713	1-31
A	BETT, A. J. et al., An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, vol. 91, pp. 8802-8806	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003376

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:

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:

Document 1: WO 2020/067004 A1 (MICROBIAL CHEM RES FOUND) 02 April 2020 (2020-04-02)

"Nucleic acid molecules" and "recombinant adenoviral vectors" are well known as disclosed in document 1 (the claims, etc.), and thus do not provide a special technical feature.

As such, the inventions in claims 1-31 are classified into four inventions respectively having the common technical features indicated below.

(Invention 1) Claims 1-11

A pharmaceutical composition for therapy of human papilloma virus (HPV)-positive cancer or HPV-positive precancerous lesion gene, comprising a Cas guide RNA or a nucleic acid molecule encoding the same and a Cas9 nickase or a nucleic acid molecule encoding the same, wherein the Cas guide RNA or a nucleic acid molecule encoding the same includes a pair of Cas guide RNAs or nucleic acid molecules encoding the same or a combination of pairs

(Invention 2) Claims 12-13

A recombinant adenoviral vector lacking the 12.4K gene sequence in the L4/E3 region and having the LP4 polyA region sequence

(Invention 3) Claims 14-22

A recombinant adenoviral vector having four or more in total of Cas guide RNA expression units separated in two or more sites on the vector genome

(Invention 4) Claims 23-31

A recombinant adenoviral vector having two or more short hairpin RNA expression units on the vector genome

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/003376

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2020/067004	A1	02 April 2020	US 2021/0395774 A1 paragraphs [0001], [0055]- [0065], claims EP 3868887 A1	
WO	2012/121071	A1	13 September 2012	(Family: none)	
WO	2020/171222	A1	27 August 2020	(Family: none)	
JP	2021-522787	A	02 September 2021	US 2021/0130832 A1 claims 1, 7, paragraph [0010] WO 2019/213065 A1 EP 3787693 A1 CN 112135640 A KR 10-2021-0005184 A CA 3097914 A AU 2019263055 A MX 2020011470 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 35/761(2015.01)i; A61K 38/47(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i;
A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/861(2006.01)i
FI: A61K31/7088; A61K35/761; A61K38/47; A61K48/00; A61P35/00; C12N15/09 110; C12N15/861 Z ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
A61K31/7088; A61K35/761; A61K38/47; A61K48/00; A61P35/00; C12N15/09; C12N15/861

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2024年
日本国実用新案登録公報 1996-2024年
日本国登録実用新案公報 1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2020/067004 A1 (公益財団法人微生物化学研究会) 02.04.2020 (2020-04-02) 段落0001、0028~0038、特許請求の範囲	1-11
X	段落0020、特許請求の範囲	12
Y	段落0020、特許請求の範囲	13-31
A	JUBAIR L et al, Systemic Delivery of CRISPR/Cas9 Targeting HPV Oncogenes Is Effective at Eliminating Established Tumors, Molecular Therapy, 2019, Vol.27, No.12, p.2091-2099 要約、図1	1-11
Y	要約、図1	22
A	GAO C et al, The application of CRISPR/Cas9 system in cervical carcinogenesis, Cancer Gene Therapy, 2022, Vol.29, p.466-474 要約、図1	1-11
Y	要約、図1	22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に
公表されたもの

“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し
くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を
付す）

“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の
後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵
触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引
用するもの

“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性
又は進歩性がないと考えられるもの

“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献
との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな
いと考えられるもの

“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.04.2024

国際調査報告の発送日

23.04.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

春日 淳一 4C 4866

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2022年7月）

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	ZHEN S et al, CRISPR/Cas9-HPV-liposome enhances antitumor immunity and treatment of HPV infection-associated cervical cancer, Journal of Medical Virology, 2022, Vol.95, Article. e28144	1-11
Y	要約	22
Y	HAWKINS LK et al, A 12,500 MW Protein Is Coded by Region E3 of Adenovirus, Virology, 1992, Vol.188, p.486-494	13, 21, 28, 31
	要約、図 2	
Y	前川文 他, Cas9及び多重guide RNA発現アデノウイルスベクターを用いた高効率HBV DNA除去システム, 第39回日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, 2016, 1P-0780	14-31
	1P-0780全文	
Y	WO 2012/121071 A1 (国立大学法人大阪大学) 13.09.2012 (2012-09-13)	23-31
	請求項 7	
Y	WO 2020/171222 A1 (国立大学法人 鹿児島大学) 27.08.2020 (2020-08-27)	30
	段落 0005、0006	
Y	JP 2021-522787 A (オレゴン ヘルス アンド サイエンス ユニバーシティ) 02.09.2021 (2021-09-02)	30
	請求項 1、7、段落 0008	
A	Mengstie MA et al, Viral Vectors for the in Vivo Delivery of CRISPR Components: Advances and Challenges, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, Vol.10, Article.895713	1-31
A	BETT AJ et al, An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, Vol.91, p.8802-8806	1-31

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

文献1：W0 2020/067004 A1（公益財団法人微生物化学研究会）02.04.2020（2020-04-02）

「核酸分子」や「組換えアデノウイルスベクター」は、上記文献1（請求の範囲等）に記載されるように公知であるから、特別な技術的特徴とはならない。

そうすると、請求項1～31に係る発明は、それぞれ以下の共通する技術的特徴を有する4の発明に区分される。

（発明1）請求項1～11

CasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子と、Cas9ニッカーゼ又はそれをコードする核酸分子とを含み、前記CasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子がCasガイドRNA又はそれをコードする核酸分子のペア又はペアの組合せを含むヒトパピローマウイルス（HPV）陽性がん又はHPV陽性前がん病変遺伝子治療用医薬組成物

（発明2）請求項12～13

L4/E3領域において、12.4K遺伝子配列を欠失し、かつL4ポリA領域配列を有する組換えアデノウイルスベクター

（発明3）請求項14～22

ベクターゲノム上で合計4個以上のCasガイドRNA発現ユニットを2カ所以上の部位に分割して有する組換えアデノウイルスベクター

（発明4）請求項23～31

ベクターゲノム上で2個以上のショートヘアピンRNA発現ユニット有する組換えアデノウイルスベクター

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/003376

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2020/067004	A1	02.04.2020	US 2021/0395774 A1 [0001]、[005 5]～[0065]、特許 請求の範囲 EP 3868887 A1	
WO	2012/121071	A1	13.09.2012	(ファミリーなし)	
WO	2020/171222	A1	27.08.2020	(ファミリーなし)	
JP	2021-522787	A	02.09.2021	US 2021/0130832 A1 請求項1、7、段落001 O WO 2019/213065 A1 EP 3787693 A1 CN 112135640 A KR 10-2021-0005184 A CA 3097914 A AU 2019263055 A MX 2020011470 A	