

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7628319号
(P7628319)

(45)発行日 令和7年2月10日(2025.2.10)

(24)登録日 令和7年1月31日(2025.1.31)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/09 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/09	1 0 0
C 1 2 N	15/63 (2006.01)		C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 1 2 N	15/86 (2006.01)		C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	15/864 (2006.01)		C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 N	15/861 (2006.01)		C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z

請求項の数 22 (全115頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-511242(P2022-511242)
 (86)(22)出願日 令和1年9月20日(2019.9.20)
 (65)公表番号 特表2022-553607(P2022-553607
 A)
 (43)公表日 令和4年12月26日(2022.12.26)
 (86)国際出願番号 PCT/US2019/052266
 (87)国際公開番号 WO2021/034336
 (87)国際公開日 令和3年2月25日(2021.2.25)
 審査請求日 令和4年8月31日(2022.8.31)
 (31)優先権主張番号 62/890,542
 (32)優先日 令和1年8月22日(2019.8.22)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 62/891,210
 (32)優先日 令和1年8月23日(2019.8.23)
 最終頁に続く

(73)特許権者 513037649
 ソーク インスティテュート フォー バ
 イオロジカル スタディーズ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 920
 37, ラ ホヤ, ノース トレイ バイ
 ンズ ロード 10010
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 in vivo遺伝子編集のための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

分裂細胞において標的ゲノムを編集する方法における使用のための組成物であって、前記方法は、前記分裂細胞を前記組成物と接触させるステップを含み、

前記組成物は、(i)置換配列と、標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および(ii)標的化エンドヌクレアーゼを含み、

前記置換配列が、標的ゲノムと比較して少なくとも1つのヌクレオチドの差異を含み、前記置換配列が、スプライシングアクセプターを含み、前記標的ゲノムが、前記標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含み、前記单一相同アーム構築物が含む前記標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と前記標的ゲノムが含む前記標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とは逆の配向であり、

前記標的化エンドヌクレアーゼがDNAを切断可能であり、前記標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な前記配列の切断部位が、前記標的ゲノムにおけるエクソンのいずれからの各100塩基対を除外し、前記置換配列が、非相同末端結合タンパク質を用いて前記標的ゲノムに組み込まれる、組成物。

【請求項2】

前記標的化エンドヌクレアーゼが、CRISPRヌクレアーゼ、TALENヌクレアーゼ、DNAガイドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、またはジンクフィンガーヌクレアーゼである、請求項1に記載の使用のための組成物。

【請求項3】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼが、 Cas 9、 Cas 12 a (C p f 1)、 Cas 12 b (c 2 c 1)、 Cas 12 c (c 2 c 3)、 Cas 12 g、 Cas 12 i、 Cas 14 、 Cas 10 、 Cas 3 、 Cas X 、 Cas Y 、 C s f 1 、 c 2 c 4 、 c 2 c 5 、 c 2 c 8 、 c 2 c 9 、 c 2 c 10 、または Cas 10 である、請求項 2 に記載の 使用のための組成物。

【請求項 4】

前記 C R I S P R ヌクレアーゼが、 Cas 9 である、請求項 3 に記載の 使用のための組成物。

【請求項 5】

前記標的化エンドヌクレアーゼが、二本鎖 DNA 平滑末端を生成可能である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の 使用のための組成物。

10

【請求項 6】

前記置換え配列が、前記標的ゲノムと比較して、置換、挿入、逆位、転座、重複、もしくは欠失を含む変異を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の 使用のための組成物。

【請求項 7】

前記置換え配列が、前記標的ゲノムの遺伝子において、イントロンの少なくとも一部およびエクソンの少なくとも一部を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の 使用のための組成物。

【請求項 8】

前記置換え配列が、前記標的ゲノムにおける変異の下流にある遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の 使用のための組成物。

20

【請求項 9】

前記置換え配列が、前記单一相同アーム構築物の单一相同アームを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の 使用のための組成物。

【請求項 10】

ガイドオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の 使用のための組成物。

【請求項 11】

前記单一相同アーム構築物、前記ガイドオリゴヌクレオチド、および前記標的化エンドヌクレアーゼが、ウイルスもしくは非ウイルス構築物内においてコードされており、

30

前記ウイルス構築物が、アデノ随伴ウイルス構築物、アデノウイルス構築物、レンチウイルス構築物、もしくはレトロウイルス構築物を含み、または、

前記非ウイルス構築物が、ミニサーキルもしくはプラスミドである、請求項 1_0 に 使用のための記載の組成物。

【請求項 12】

前記单一相同アーム構築物および前記ガイドオリゴヌクレオチドが、標的化構築物においてコードされており、前記標的化エンドヌクレアーゼが、ヌクレアーゼ構築物においてコードされており、前記標的化構築物および前記ヌクレアーゼ構築物が、ウイルス構築物もしくは非ウイルス構築物であり、

前記ウイルス構築物が、アデノ随伴ウイルス構築物、アデノウイルス構築物、レンチウイルス構築物、もしくは、レトロウイルス構築物を含み、または、

40

前記非ウイルス構築物が、ミニサーキルもしくはプラスミドを含む、請求項 1_0 に記載の 使用のための組成物。

【請求項 13】

前記ウイルス構築物が、アデノウイルス構築物を含む、請求項 1_2 に記載の 使用のための組成物。

【請求項 14】

細胞をさらに含み、および / または、薬学的に許容される緩衝液もしくは賦形剤をさらに含む、請求項 1 ~ 1_3 のいずれか一項の記載の 使用のための組成物。

【請求項 15】

50

分裂細胞において標的ゲノムを編集する方法における使用のための組成物であって、前記方法は、前記分裂細胞を前記組成物と接触させるステップを含み、
前記組成物は、請求項 1 に記載の单一相同アーム構築物をコードする核酸分子を含み、
前記組成物が標的化エンドヌクレアーゼとともに使用するためのものであり、前記標的化エンドヌクレアーゼが DNA を切断可能である、組成物。

【請求項 16】

ガイドオリゴヌクレオチドもしくは前記標的化エンドヌクレアーゼをさらにコードし、
前記核酸分子が、ウイルス構築物もしくは非ウイルス構築物であり、

前記ウイルス構築物が、アデノ随伴ウイルス構築物、アデノウイルス構築物、レンチウイルス構築物、もしくは、レトロウイルス構築物を含み、または、

前記非ウイルス構築物が、ミニサークルもしくはプラスミドである、請求項 1_5 に記載の核酸分子。

【請求項 17】

前記置換配列が、前記標的ゲノムの少なくとも一部を置き換える、請求項 1 に記載の 10
使用のための組成物。

【請求項 18】

前記細胞が、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臓ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、閑門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臓脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、または卵母細胞を含む、請求項 1 ~ 1_7 のいずれか一項に記載の 20
使用のための組成物。

【請求項 19】

前記細胞が、被験体由来のものであり、前記被験体が、ヒト、非ヒト靈長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ラット、またはマウスであり、前記被験体が、前記置換配列と相同な遺伝子に変異を有する、請求項 1 ~ 1_8 のいずれか一項に記載の 20
使用のための組成物。

【請求項 20】

遺伝子に変異を有する被験体において遺伝子疾患を処置する方法における使用のための組成物であって、前記方法が、前記被験体由来の細胞を前記組成物と接触させることを含む、請求項 1 に記載の 30
使用のための組成物。

【請求項 21】

前記置換配列が、前記遺伝子の野生型配列を含む、請求項 2_0 に記載の 30
使用のための組成物。

【請求項 22】

前記遺伝子疾患が、軟骨無形成症、アルファ 1 アンチトリプシン欠損症、アルツハイマー病、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性囊胞腎、乳がん、がん、シャルコー・マリー・トゥース、結腸がん、ネコ鳴き症候群、クローン病、囊胞性線維症、ダーカム病、ダウン症候群、デュアン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第 V 因子ライデン血栓形成傾向、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱 X 症候群、ゴーシェ病、ヘモクロマトーシス、血友病、全前脳症、ハンチントン病、クラインフェルター症候群、レーバー先天黒内障、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、ヌーナン症候群、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、ポーランド異常、ポルフィリン症、早老症、前立腺がん、網膜色素変性症、重症複合免疫不全症 (SCID)、鎌状赤血球症、皮膚がん、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、ティ・サックス、サラセミア、トリメチルアミン尿症、ターナー症候群、口蓋心顎面症候群、WAGR 症候群、およびウィルソン病から選択される、請求項 2_0 または 2_1 に記載の 40
使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

相互参照

本出願は、その出願のそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる、2019年8月22日出願の米国仮出願第62/890,542号および2019年8月23日出願の米国仮出願第62/891,210号の利益を主張するものである。

【背景技術】

【0002】

背景

in vivo標的化ゲノム編集技術による、生きている生物体における直接遺伝子改変は、動物科学および発生生物学を含めた生命科学に関する多くの分野に関して強力なツールである。さらに、この技術は、潜在的に、疾患を引き起こす変異を除去することによって遺伝性疾患を補正するために使用することができ、恒久的治癒の可能性をもたらすものである。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

概要

in vivoゲノム編集は、基礎生物学を理解するため、ならびに遺伝性疾患を処置するための強力な戦略である。しかし、分裂しているか分裂していないかいずれかの状態にある多様な細胞型からなるin vivo組織に対する普遍的かつ効率的なゲノム編集ツールを開発することは依然として困難なままである。細胞内用に直線化された单一相同アームドナーを使用して標的遺伝子座のイントロンにミニ遺伝子を挿入することによって広範囲の変異および細胞型を標的とすることを可能にする多用途in vivo遺伝子ノックイン方法体系が本明細書で提供される。この戦略の概念実証として、既存のin vivoゲノム編集ツールを使用して修復することが難しい優性点変異によって引き起こされる早期老化のマウスモデルの処置が本明細書に提示される。この方法を使用した全身性の処置により、老化に関連する表現型が好転し、動物の寿命が延長され、それにより、広範囲のin vivoゲノム編集適用に関するこの方法体系の潜在性が強調される。

20

【0004】

一態様では、細胞内の標的ゲノムを編集する方法が提供される。一部の実施形態では、本明細書の方法は、細胞を(i)置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および(ii)標的化エンドヌクレアーゼと接触させるステップを含み、ここで、置換え配列は標的ゲノムと比較して少なくとも1つのヌクレオチドの差異を含み、標的ゲノムは標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物により標的ゲノムの少なくとも一部分が置き換える。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ、TALENヌクレアーゼ、DNAによりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、CRISPRヌクレアーゼは、Cas9、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(c2c1)、Cas12c(c2c3)、Cas12g、Cas12i、Cas14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Csf1、Cas13a(c2c2)、Cas13b(c2c6)、Cas13c(c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8、c2c9、c2c10、Cas10、CASTおよびTn6677からなる群より選択される。一部の実施形態では、方法は、細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドはガイドRNAである。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムと比較して單一ヌクレオチド差異を含む。一部の実施形態では、一塩基差異は、置換、挿入、および欠失のうちの1つから選択される。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムと比較して、置換、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む。一部の実施形態では、置換え配列は、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む。一部の実施形態では、置換え配列は、標

30

40

50

的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある当該遺伝子の全てのインtronおよびエクソンを含む。一部の実施形態では、細胞は、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臓ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T細胞、B細胞、NK細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、閑門細胞 (barrier cell)、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臍脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞 (urinary cell)、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの1つまたは複数から選択される。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼは構築物内にコードされている。一部の実施形態では、構築物はウイルス構築物である。一部の実施形態では、ウイルス構築物は、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである。一部の実施形態では、構築物は非ウイルス構築物である。一部の実施形態では、非ウイルス構築物はミニサークルまたはプラスミドである。一部の実施形態では、細胞を *in vivo* で接触させる。一部の実施形態では、細胞を *in vitro* で接触させる。一部の実施形態では、細胞は被験体由来のものである。一部の実施形態では、被験体は、ヒト、非ヒト靈長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ラット、またはマウスである。一部の実施形態では、被験体は置換え配列と相同な遺伝子に変異を有する。

【0005】

別の態様では、遺伝子に変異を有する被験体における遺伝子疾患を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、被験体由来の細胞を (i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および (ii) 標的化エンドヌクレアーゼと接触させるステップを含み、ここで、置換え配列は遺伝子の野生型配列を含み、遺伝子は標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物により遺伝子の少なくとも一部分が置き換えられる。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ、TALENヌクレアーゼ、DNAによりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、CRISPRヌクレアーゼは、Cas9、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (c2c1)、Cas12c (c2c3)、Cas12g、Cas12i、Cas14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Csf1、Cas13a (c2c2)、Cas13b (c2c6)、Cas13c (c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8、c2c9、c2c10、Cas10、CASTおよびTn6677からなる群より選択される。一部の実施形態では、方法は、細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドはガイドRNAである。一部の実施形態では、変異は、標的ゲノムと比較して单一ヌクレオチド差異を含む。一部の実施形態では、单一ヌクレオチド差異は、置換、挿入、および欠失のうちの1つから選択される。一部の実施形態では、変異は、標的ゲノムと比較して、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む。一部の実施形態では、置換え配列は、インtronの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある当該遺伝子の全てのインtronおよびエクソンを含む。一部の実施形態では、細胞は、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臓ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T細胞、B細胞、NK細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、閑門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臍脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの1つまたは複数から選択される。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼは構築物内にコードされている。一部の実施形態では、構築物はウイルス構築物である。一部の実施形態では、ウイルス構築物は、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである。一部の実施形態では、構築物は非ウイルス構築物である。一部の実施形態では、非ウイルス構築

10

20

30

40

50

物はミニサークルまたはプラスミドである。一部の実施形態では、細胞を *in vivo* で接触させる。一部の実施形態では、細胞を *in vitro* で接触させる。一部の実施形態では、細胞は非分裂細胞である。一部の実施形態では、被験体は、ヒト、非ヒト靈長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ラット、またはマウスである。一部の実施形態では、遺伝子疾患は、軟骨無形成症、アルファ1アンチトリプシン欠損症、アルツハイマー病、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性囊胞腎、乳がん、がん、シャルコー・マリー・トゥース、結腸がん、ネコ鳴き症候群、クローン病、囊胞性線維症、ダーカム病、ダウン症候群、デュアン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第V因子ライデン血栓形成傾向、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱X症候群、ゴーシェ病、ヘモクロマトーシス、血友病、全前脳症、ハンチントン病、クラインフェルター症候群、レーバー先天黒内障、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、ヌーナン症候群、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、ポーランド異常(Poland Anomaly)、ポルフィリン症、早老症、前立腺がん、網膜色素変性症、重症複合免疫不全症(SCID)、鎌状赤血球症、皮膚がん、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、ティ・サックス、サラセミア、トリメチルアミン尿症、ターナー症候群、口蓋心顔面症候群、WAGR症候群、およびウィルソン病から選択される。

【0006】

さらなる態様では、遺伝子疾患の処置に使用するための、(i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および(ii) 標的化エンドヌクレアーゼを含む組成物であって、置換え配列が、標的ゲノムと比較して少なくとも1つのヌクレオチドの差異を含み、標的ゲノムが、標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む、組成物が提供される。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物により遺伝子の少なくとも一部分が置き換えられる。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ、TALENヌクレアーゼ、DNAによりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、CRISPRヌクレアーゼは、Cas9、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(c2c1)、Cas12c(c2c3)、Cas12g、Cas12i、Cas14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Csf1、Cas13a(c2c2)、Cas13b(c2c6)、Cas13c(c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8、c2c9、c2c10、Cas10、CASTおよびTn6677からなる群より選択される。一部の実施形態では、組成物は、ガイドオリゴヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドはガイドRNAである。一部の実施形態では、遺伝子疾患は、標的ゲノムと比較して單一ヌクレオチド差異を含む変異によって引き起こされるものである。一部の実施形態では、單一ヌクレオチド差異は、置換、挿入、および欠失のうちの1つから選択される。一部の実施形態では、遺伝子疾患は、置換、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む変異によって引き起こされるものである。一部の実施形態では、置換え配列は、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある当該遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む。一部の実施形態では、組成物は、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臍ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T細胞、B細胞、NK細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、関門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臍脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの1つまたは複数から選択される細胞を標的とするものである。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼは構築物内にコードされている。一部の実施形態では、構築物はウイルス構築物である。一部の実施形態では、ウイルス構築物は、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである。一部の実施形態では、構築物は非ウイルス構築物である。一部の実施形態では、非ウイルス構築物はミニサークルまたはプラスミドである

。一部の実施形態では、遺伝子疾患は、軟骨無形成症、アルファ1アンチトリプシン欠損症、アルツハイマー病、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性囊胞腎、乳がん、がん、シャルコー・マリー・トゥース、結腸がん、ネコ鳴き症候群、クローン病、囊胞性線維症、ダーカム病、ダウン症候群、デュアン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第V因子ライデン血栓形成傾向、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱X症候群、ゴーシェ病、ヘモクロマトーシス、血友病、全前脳症、ハンチントン病、クラインフェルター症候群、レーバー先天黒内障、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、ヌーナン症候群、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、ポーランド異常、ポルフィリン症、早老症、前立腺がん、網膜色素変性症、重症複合免疫不全症（S C I D）、鎌状赤血球症、皮膚がん、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、ティ・サックス、サラセミア、トリメチルアミン尿症、ターナー症候群、口蓋心顔面症候群、W A G R症候群、およびウィルソン病から選択される。

【0007】

さらなる態様では、（i）置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および（ii）標的化エンドヌクレアーゼを含む組成物であって、置換え配列が、標的ゲノムと比較して少なくとも1つのヌクレオチドの差異を含み、標的ゲノムが、標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む、組成物が提供される。一部の実施形態では、組成物は細胞を含む。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼは構築物内にコードされている。一部の実施形態では、構築物はウイルス構築物である。一部の実施形態では、ウイルス構築物は、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである。一部の実施形態では、構築物は非ウイルス構築物である。一部の実施形態では、非ウイルス構築物はミニサークルまたはプラスミドである。一部の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される緩衝液または賦形剤をさらに含む。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、C R I S P Rヌクレアーゼ、T A L E Nヌクレアーゼ、D N Aによりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、C R I S P Rヌクレアーゼは、C a s 9、C a s 1 2 a (C p f 1)、C a s 1 2 b (c 2 c 1)、C a s 1 2 c (c 2 c 3)、C a s 1 2 g、C a s 1 2 i、C a s 1 4、C a s 1 0、C a s 3、C a s X、C a s Y、C s f 1、C a s 1 3 a (c 2 c 2)、C a s 1 3 b (c 2 c 6)、C a s 1 3 c (c 2 c 7)、c 2 c 4、c 2 c 5、c 2 c 8、c 2 c 9、c 2 c 1 0、C a s 1 0、C A S TおよびT n 6 6 7 7からなる群より選択される。一部の実施形態では、組成物は、ガイドオリゴヌクレオチドをさらに含む。

【0008】

本明細書で提供される任意の組成物および使用についての指示を含むキットが本明細書でさらに提供される。

【0009】

さらなる態様では、置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物を含む核酸分子であって、置換え配列が、標的ゲノムと比較して少なくとも1つのヌクレオチドの差異を含む、核酸分子が提供される。一部の実施形態では、核酸分子は、ガイドオリゴヌクレオチドをコードする配列をさらに含む。一部の実施形態では、核酸分子は、標的化エンドヌクレアーゼをコードする配列をさらに含む。一部の実施形態では、核酸分子はウイルス構築物である。一部の実施形態では、ウイルス構築物は、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである。一部の実施形態では、核酸分子は非ウイルス構築物である。一部の実施形態では、非ウイルス構築物はミニサークルまたはプラスミドである。

【0010】

本明細書で提供される核酸分子のいずれか1つおよび使用についての指示を含むキットが本明細書でさらに提供される。

【0011】

10

20

30

40

50

別の態様では、細胞内の標的ゲノムを編集するための相同組換え修復方法であって、細胞を (i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および (ii) 標的化エンドヌクレアーゼと接触させるステップを含み、置換え配列が、標的ゲノムと比較して少なくとも 1 つのヌクレオチドの差異を含み、標的ゲノムが、標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含み、置換え配列が、相同組換え修復タンパク質を使用して標的ゲノム内に組み込まれる、方法が提供される。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物により標的ゲノムの少なくとも一部分が置き換えられる。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、C R I S P R ヌクレアーゼ、T A L E N ヌクレアーゼ、D N A によりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、C R I S P R ヌクレアーゼは、C a s 9 、C a s 1 2 a (C p f 1) 、C a s 1 2 b (c 2 c 1) 、C a s 1 2 c (c 2 c 3) 、C a s 1 2 g 、C a s 1 2 i 、C a s 1 4 、C a s 1 0 、C a s 3 、C a s X 、C a s Y 、C s f 1 、C a s 1 3 a (c 2 c 2) 、C a s 1 3 b (c 2 c 6) 、C a s 1 3 c (c 2 c 7) 、c 2 c 4 、c 2 c 5 、c 2 c 8 、c 2 c 9 、c 2 c 1 0 、C a s 1 0 、C A S T およびT n 6 6 7 7 からなる群より選択される。一部の実施形態では、方法は、細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドはガイドR N A である。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムと比較して單一ヌクレオチド差異を含む。一部の実施形態では、一塩基差異は、置換、挿入、および欠失のうちの 1 つから選択される。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムと比較して、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む。一部の実施形態では、置換え配列は、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある当該遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む。一部の実施形態では、細胞は、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臍ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T 細胞、B 細胞、N K 細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、関門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臍脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの 1 つまたは複数から選択される。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼは構築物内にコードされている。一部の実施形態では、構築物はウイルス構築物である。一部の実施形態では、ウイルス構築物は、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである。一部の実施形態では、構築物は非ウイルス構築物である。一部の実施形態では、非ウイルス構築物はミニサークルまたはプラスミドである。一部の実施形態では、細胞をi n v i v o で接触させる。一部の実施形態では、細胞をi n v i t r o で接触させる。一部の実施形態では、細胞は被験体由来のものである。一部の実施形態では、被験体は、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ラット、またはマウスである。一部の実施形態では、被験体は置換え配列と相同な遺伝子に変異を有する。

【 0 0 1 2 】

さらなる態様では、遺伝子疾患の処置に使用するための、(i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む、相同組換え修復のために構成された单一相同アーム構築物；および (ii) 標的化エンドヌクレアーゼを含む組成物であって、置換え配列が、標的ゲノムと比較して少なくとも 1 つのヌクレオチドの差異を含み、標的ゲノムが、標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む、組成物が提供される。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物により相同組換え修復が使用されて、遺伝子の少なくとも一部分が置き換えられる。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、C R I S P R ヌクレアーゼ、T A L E N ヌクレアーゼ、D N A によりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、C R I S P R ヌクレアーゼは、C a s 9 、C a s 1 2 a (C p f 1) 、C a s 1 2 b (c 2 c 1) 、C a s 1 2 c (c 2 c 3) 、C a s 1 2 g 、C a s 1 2 i 、C a s

10

20

30

40

50

14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Casf1、Cas13a(c2c2)、Cas13b(c2c6)、Cas13c(c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8、c2c9、c2c10、Cas10、CASTおよびTn6677からなる群より選択される。一部の実施形態では、組成物は、細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるためにさらに構成される。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドはガイドRNAである。一部の実施形態では、遺伝子疾患は、標的ゲノムと比較して単一ヌクレオチド差異を含む変異によって引き起こされるものである。一部の実施形態では、単一ヌクレオチド差異は、置換、挿入、および欠失のうちの1つから選択される。一部の実施形態では、遺伝子疾患は、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む変異によって引き起こされるものである。一部の実施形態では、置換配列は、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む。一部の実施形態では、置換配列は、標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある当該遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む。一部の実施形態では、組成物は、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臓ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T細胞、B細胞、NK細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、関門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臓脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの1つまたは複数から選択される細胞を標的とするものである。一部の実施形態では、単一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼは構築物内にコードされている。一部の実施形態では、構築物はウイルス構築物である。一部の実施形態では、ウイルス構築物は、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである。一部の実施形態では、構築物は非ウイルス構築物である。一部の実施形態では、非ウイルス構築物はミニサークルまたはプラスミドである。一部の実施形態では、遺伝子疾患は、軟骨無形成症、アルファ1アンチトリプシン欠損症、アルツハイマー病、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性囊胞腎、乳がん、がん、シャルコー・マリー・トゥース、結腸がん、ネコ鳴き症候群、クローン病、囊胞性線維症、ダーカム病、ダウン症候群、デュアン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第V因子ライデン血栓形成傾向、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱X症候群、ゴーシエ病、ヘモクロマトーシス、血友病、全前脳症、ハンチントン病、クラインフェルター症候群、レーバー先天黒内障、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、ヌーナン症候群、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、ポーランド異常、ポルフィリン症、早老症、前立腺がん、網膜色素変性症、重症複合免疫不全症(SCID)、鎌状赤血球症、皮膚がん、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、ティ・サックス、サラセニア、トリメチルアミン尿症、ターナー症候群、口蓋心顔面症候群、WAGR症候群、およびウィルソン病から選択される。

【0013】

参照による組込み

本明細書において言及されている全ての刊行物、特許および特許出願は、個々の刊行物、特許、または特許出願の各々が、具体的にかつ個々に参照により組み込まれることが示されたものと同じく参照により本明細書に組み込まれる。

【0014】

本特許または出願のファイルは、カラーで製作された少なくとも1つの図面を含有する。カラーの図面(複数可)を伴う本特許または特許出願公開のコピーは、要請し、必要な料金を支払えば、特許庁により提供されるであろう。

【0015】

本発明の原理が利用されている例示的な実施形態が記載されている以下の詳細な説明および付属図を参照することにより、本発明の特徴および利点の理解が得られよう。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A】図1Aは、イントロン3における標的化のための単一相同アームを有するSA

10

20

30

40

50

T I (細胞間直線化単一相同アームドナー媒介性イントロン標的化組込み) ドナーによる T u b b 3 遺伝子座における標的化 G F P ノックインの略図を示す。

【0017】

【図1B】図1Bは、エクソン4を標的とする非相同性H I T I ドナーによるT u b b 3 遺伝子座における標的化 G F P ノックインの略図を示す。

【0018】

【図1C】図1Cは、エクソン4を標的とする2つの相同アームを有する従来のH D R ドナーによるT u b b 3 遺伝子座における標的化 G F P ノックインの略図を示す。

【0019】

【図1D】図1Dは、イントロン3を標的とする2つの相同アームを有するH M E J ドナーによるT u b b 3 遺伝子座における標的化 G F P ノックインの略図を示す。

【0020】

【図1E】図1Eは、培養された初代ニューロンにおけるG F P ノックインの実験スキームを示す。

【0021】

【図1F】図1Fは、C a s 9 、1アームS A T I ドナーおよびi n t 3 g R N A - m C h e r r y をトランスフェクトしたニューロンの代表的な免疫蛍光画像を示す。

【0022】

【図1G】図1Gは、g R N A とドナーの異なる組合せを用いてトランスフェクトされた細胞 (m C h e r r y +) 当たりのノックイン細胞 (G F P +) のパーセンテージを示す。

【0023】

【図1H】図1Hは、1アームS A T I ドナーを用いた初代ニューロンへのトランスフェクション後のH I T I 媒介性G F P ノックインとo a H D R 媒介性G F P ノックインの比を示す。

【0024】

【図2A】図2Aは、S A T I 媒介性遺伝子補正ドナーを用いたL m n a G 6 0 9 G (c . 1 8 2 7 C > T) 遺伝子補正の略図を示す。

【0025】

【図2B】図2Bは、S A T I 媒介性遺伝子補正後の標的化配列におけるH I T I 、o a H D R および未確定(大きな欠失に起因して)の比を示す。

【0026】

【図2C】図2Cは、遺伝子補正後の標的化部位におけるインデルを伴うまたは伴わないH I T I 、o a H D R および未確定(大きな欠失に起因して)の比を示す。

【0027】

【図2D】図2Dは、L m n a G 6 0 9 G / G 6 0 9 G 早老症マウスモデルへの静脈内(I V) A A V 注射を介したA A V - 早老症 - S A T I によるi n v i v o 遺伝子補正の実験スキームを示す。

【0028】

【図2E】図2Eは、100日目の、S A T I で処置した(P r o + S A T I) またはC a s 9 を伴わずにドナーのみで処置した(P r o + ドナー) 早老症マウスにおける、示されている組織からのL m n a c . 1 8 2 7 C > T 優性点変異部位における遺伝子補正効率を示す。

【0029】

【図2F】図2Fは、100日目の、S A T I で処置した(P r o + S A T I) またはC a s 9 を伴わずにドナーのみで処置した(P r o + ドナー) 早老症マウスにおける、示されている組織からのL m n a イントロン10 g R N A 標的部位におけるインデルパーセンテージを示す。

【0030】

【図2G】図2Gは、早老症マウスに対する全身性A A V - 早老症 - S A T I 注射による遺伝子補正後の標的化部位におけるインデルを伴うまたは伴わないH I T I 、o a H D R

10

20

30

40

50

および未確定（大きな欠失に起因して）の比を示す。

【0031】

【図3A】図3Aは、*Lmna^{+/+}*マウス(WT)、SATIで処置した*Lmna^{+/+}*マウス(WT+SATI)、*Lmna^{G609G/G609G}*マウス(Pro)、SATIで処置した*Lmna^{G609G/G609G}*マウス(Pro+SATI)、*Lmna^{+/G609G}*ヘテロ接合性マウス(Het)、SATIで処置した*Lmna^{+/G609G}*ヘテロ接合性マウス(Het+SATI)の生存プロットを示す。

【0032】

【図3B】図3Bは、示されている組織からのラミンAとラミンCの発現比（左側）およびプロジェリンとラミンAの発現比（右側）についてのRT-qPCR分析（n=3）を示す。

10

【0033】

【図3C】図3Cは、17週齢時のWTマウス、早老症マウス(Pro)、および早老症+SATIマウス(Pro+SATI)の代表的な写真を示す。

【0034】

【図3D】図3Dは、17週齢時の皮膚の組織学的分析を示す。

【0035】

【図3E】図3Eは、17週齢時の脾臓の組織学的分析を示す。

【0036】

【図3F】図3Fは、17週齢時の腎臓の組織学的分析を示す。

20

【0037】

【図3G】図3Gは、17週齢時の大動脈の組織学的分析を示す。

【0038】

【図3H】図3Hは、WTマウス、Proマウス、およびPro+SATIマウスにおける92日目から110日目の間の心電図(ECG)分析を示す。心拍数が毎分拍動(bpm)として表されている、n=7。P値が各グラフに示されている、チューキー多重比較検定を伴う一元配置ANOVA。

【0039】

【図4A】図4Aは、成体*Lmna^{G609G/G609G}*早老症の前脛骨(TA)筋への筋肉内(IM)AAV注射を介したAAV-早老症-SATIによるin vivo遺伝子修復の実験スキームを示す。

30

【0040】

【図4B】図4Bは、13週齢時のTA筋のH&E染色の代表的な写真を示す。

【0041】

【図4C】13週齢時の早老症マウスにおけるTA筋の筋線維横断面積分布。

【0042】

【図5A】図5Aは、HDR媒介性遺伝子ノックイン方法の略図を示す。

【0043】

【図5B】図5Bは、HITI媒介性遺伝子ノックイン方法の略図を示す。

【0044】

【図5C】図5Cは、HITIによる一方向遺伝子ノックインを示す。

40

【0045】

【図6A】図6Aは、HMEJ媒介性イントロン遺伝子ノックイン方法の略図を示す。

【0046】

【図6B】図6Bは、新しいイントロン遺伝子ノックイン方法であるSATIの略図を示す。

【0047】

【図6C】図6Cは、本試験で使用した遺伝子編集方法間の適応性の差異の要約を示す。

【0048】

【図7A】図7Aは、エクソン標的化HITIドナーを用いて従来のHITI系によって

50

挿入されたDNA配列を示すスキームを示す。

【0049】

【図7B】図7Bは、本試験におけるgRNAの種々の設計能力を示す。

【0050】

【図7C】図7Cは、GFP補正HEK293株におけるIRESmCherry-MCドナーおよび異なるCas9を用いたHITIによる遺伝子標的化の略図を示す。

【0051】

【図7D】図7Dは、HEK293における通常のSpCas9(wtCas9)およびNG_PAM_Cas9(Cas9-NGおよびxCas9)を用いたmCherryノックインHITI効率(%)を示す。

【0052】

【図8A】図8Aは、1アーム相同意性およびHITIドナーによって誘導されるカットパターンを認識するために、トランスフェクトされていないニューロン培養物および異なるドナーおよびgRNAを用いてトランスフェクトされたニューロン培養物の代表的な写真を示す。

【0053】

【図8B】図8Bは、EdU+またはEdU-ニューロンにおける総細胞(DAPI+)またはトランスフェクトされた細胞(mCherry+)の中のGFP+細胞のパーセンテージによって示される絶対的なノックイン効率および相対的なノックイン効率を示す。

【0054】

【図8C】図8Cは、1相同アームドナー(MC-Tubb3int3-SATI)によるTubb3コード領域の3'末端におけるGFPノックイン後の実際の配列の例を示す。

【0055】

【図8D】図8Dは、ニューロンにおけるGFPノックインの効率に対する影響を、SATIドナー(MC-Tubb3int3-SATI、MC-Tubb3int3-スクランブル)、HITIドナー(Tubb3ex4-HITI)およびHDRドナー(Tubb3ex4-HDR)における野生型Cas9(Cas9)とCas9ニッカーゼ(Cas9D10A、一本鎖切断を導入する)を比較することによって示す。

【0056】

【図9A】図9Aは、GFP補正HEK293株およびhESC株におけるHDRによる遺伝子標的化およびoahDRによる遺伝子標的化の略図を示す。

【0057】

【図9B】図9Bは、Cas9、gRNAおよびtGFPドナードNAを用いてトランスフェクトして実施したサーベイヤースクレアーゼアッセイを示す。

【0058】

【図9C】図9Cは、HEK293細胞におけるGFPノックイン効率を示す。

【0059】

【図9D】図9Dは、hES細胞におけるGFPノックイン効率を示す。

【0060】

【図10A】図10Aは、GFP補正HeLa株における2日間にわたるG1期における細胞周期阻害剤である20μMのロバスタチンを用いた/用いない処理後のヨウ化プロピジウム(PI)染色による細胞周期分析を示す。細胞周期の各期の効率がグラフに示されている(%)。

【0061】

【図10B】図10Bは、ロバスタチンによる処理を伴う、GFP補正HeLa株におけるoahDR媒介性遺伝子ノックインおよびHDR媒介性遺伝子ノックインのパーセンテージを示す。

【0062】

【図10C】図10Cは、野生型Cas9(Cas9)、G1期特異的Cas9(Cas9-Cdt1)およびS-M期特異的Cas9(Cas9-Geminin)の構造を示す。

10

20

30

40

50

す。

【0063】

【図10D】図10Dは、異なるCas9による処理を用いた、GFP補正HEK293株におけるoaHDR媒介性遺伝子ノックインおよびHDR媒介性遺伝子ノックインの%を示す。

【0064】

【図10E】図10Eは、異なるCas9による処理を用いた、GFP補正HeLa株におけるoaHDR媒介性遺伝子ノックインおよびHDR媒介性遺伝子ノックインの%を示す。

【0065】

【図11A】図11Aは、GFP補正HEK293株およびhESC株におけるmCherryレポータードナーを用いたHDRおよびHITIによる遺伝子標的化の略図を示す。HDRドナー(IRESmCherry-HDR-0c)がHDRによって挿入される(上)。HITIドナー(IRESmCherry-MC)がHITIによって挿入される(下)。

【0066】

【図11B】図11Bは、HEK293細胞におけるmCherryノックイン効率を示す。

【0067】

【図11C】図11Cは、hES細胞におけるmCherryノックイン効率を示す。

【0068】

【図11D】図11Dは、異なる細胞型における、概念的に本発明者らの知見に由来するSATIの図式モデルを示す。

【0069】

【図12A】図12Aは、SATI媒介性遺伝子補正ドナーを有するプラスミド(MC-早老症-SATI)またはAAV(AAV-早老症-SATI)を用いたLmnaG609G(c.1827C>T)遺伝子補正の略図を示す。

【0070】

【図12B】図12Bは、補正された遺伝子配列を評価するための実験スキームを示す。

【0071】

【図13A】図13Aは、本試験で使用したDNA修復に関連するshRNAの遺伝子一覧を示す。

【0072】

【図13B】図13Bは、示されているshRNAの存在下でのSATIノックイン効率の影響を示す。

【0073】

【図13C】図13Cは、oaHDR経路およびNHEJ経路でのSATIドナー媒介性遺伝子ノックインのモデルを示す。

【0074】

【図14A】図14Aは、100日目の、AAV-早老症-SATIで処置したマウスの種々の組織由来のゲノム鑄型を使用したPCRによるHITI媒介性遺伝子ノックインの検証を示す。

【0075】

【図14B】図14Bは、100日目の、AAV-早老症-SATIのIV注射による肝臓細胞(左側)および心臓細胞(右側)の3'接合部位の配列決定分析を示す。

【0076】

【図15A】図15Aは、示されている器官からのディープシーケンシングによるリード計数(リード)およびゲノム編集(インデル、HITI、および補正)効率(%)を示す。

【0077】

【図15B】図15Bは、肝臓におけるインデルサイズの分布を示す。

10

20

30

40

50

【0078】

【図15C】図15Cは、心臓におけるインデルサイズの分布を示す。

【0079】

【図15D】図15Dは、筋肉におけるインデルサイズの分布を示す。

【0080】

【図15E】図15Eは、SATI媒介性ゲノム編集のインデル頻度を決定するために使用したオンターゲット部位(On、Lmnaイントロン10)およびオフターゲット部位(OTS)の一覧を示す。

【0081】

【図16A】図16Aは、スプライシングアクセプターを含む「Lmnaの遺伝子半分」をノックインするイントロンSATI媒介性遺伝子標的化戦略を示す。

10

【0082】

【図16B】図16Bは、100日目の、SATIで処置したマウス由来の肝臓および心臓における捕捉されたエクソンの一覧を示す。データは2匹のマウス(#1および#2)から得たものである。

【0083】

【図16C】図16Cは、8週齢のマウスの肝臓における主要なオフターゲット遺伝子であるAlbのクロマチン(H3K27AcおよびDNaseI HS)および発現(RNAseq)の状態を示す。

【0084】

【図16D】図16Dは、8週齢のマウスの心臓における主要なオフターゲット遺伝子であるMyh6のクロマチン(H3K27AcおよびDNaseI HS)および発現(RNAseq)の状態を示す。

20

【0085】

【図16E】図16Eは、100日目の、SATIで処置したマウス由来の肝臓におけるアルブミンのGapdhに対する発現比(左側)およびラミンAのGapdhに対する発現比(右側)についてのRT-qPCR分析を示す。

【0086】

【図17A】図17Aは、早老症マウス(n=5)およびSATIで処置した早老症マウス(早老症+SATI)の体重の累積プロットを示す。

30

【0087】

【図17B】図17Bは、17週齢時点でのWT、早老症、および早老症+SATIで処置した脾臓の代表的な写真を示す。

【0088】

【図17C】図17Cは、野生型(WT)、早老症(NT)、およびSATIで処置した早老症(T)から単離した尾端線維芽細胞(HTF)由来のゲノム鋳型を使用したPCRによるHTTI媒介性遺伝子ノックインの検証を示す。

【0089】

【図17D】図17Dは、野生型(WT)、早老症(NT)、およびSATIで処置した早老症(T)の培養したHTFから検出されたラミンA(上のバンド)、プロジェリン(中央のバンド)、およびラミンC(下のバンド)のタンパク質レベルを示す。

40

【0090】

【図17E】図17Eは、SATIで処置した早老症マウスから単離した線維芽細胞における核の形態学的異常の表現型レスキューを示す。

【0091】

【図17F】図17Fは、SATIで処置した早老症マウスから単離した線維芽細胞における核の形態学的異常の表現型レスキューを示す。

【0092】

【図17G】図17Gは、17週齢のマウスの肝臓のヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色を示す。

50

【発明を実施するための形態】

【0093】

詳細な説明

直接遺伝子改変は、疾患を引き起こす変異を取り除くことによって遺伝性疾患を補正するために潜在的に使用することができ、疾患の恒久的治癒の可能性をもたらすものである。特に、標的ゲノムと相同な配列の2つのストレッチを有する異所性ドナーの存在下で、相同組換え修復（H D R）により、内因性ゲノム配列を外因的に供給されたドナー配列で置き換え、それにより、導入遺伝子の部位特異的組込み、または疾患を引き起こす変異（劣性および優性の両方）の補正を可能にすることができる。しかし、H D Rは分裂細胞において主に活性であるので、これらの従来のH D Rに基づく標的化遺伝子ノックイン戦略には実用的な限定がある。したがって、非分裂細胞で構成される成体組織には利用できない。in vivo組織は、分裂している状態かまたは分裂していない状態のいずれかであり、発生および再生の間に変化する多くの種類の細胞型からなる。H D R媒介性遺伝子補正戦略は、マウスにおける遺伝性疾患を治癒させる見込みが示されているが、標的は現在のところin vivoで分裂能を有する組織に限定されている（図5A）。

10

【0094】

H D R媒介性ゲノム編集の限界を克服するために、in vitroおよびin vivoにおける分裂細胞および非分裂細胞の両方において標的化ノックインを効率的に可能にする、CRISPR/Cas9に基づく相同性非依存性標的化組込み（H I T I）が開発された（その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2018/013932を参照されたい）。H I T Iは、H D Rを利用するのではなく、その代わりに、他の主要なDNA二本鎖切断（D S B）修復経路である非相同末端結合（N H E J）経路に依拠する。H I T Iの場合では、ドナーDNAは、相同アームを有さず、ドナー配列を挟むCas9切断部位を含むように設計される（図5B）。Cas9媒介性D S Bがゲノムの標的配列および外因的に提供されたドナーDNAの両方において同時に創出され、それにより、平滑末端が生じる。直線化されたドナーDNAがN H E J経路による修復に使用され得、それにより、ドナーDNAのゲノムのD S B部位への組込みが可能になる。ゲノムに組み入れられたら、所望の配向で挿入されたドナーDNAによりCas9標的配列が乱され、さらなるCas9によるカットが妨げられる。ドナーDNAが望ましくない配向で挿入されると、Cas9標的配列はインタクトなままになり、第2ラウンドのCas9によるカットにより、組み込まれたドナーDNAが取り除かれる。したがって、H I T IではドナーDNAが標的化された染色体に所定の方向で挿入される（図5C）。

20

【0095】

N H E Jは種々の成体細胞型（増殖している細胞および有糸分裂後の細胞を含む）において細胞周期全体を通して活性であり、その活性はH D Rをはるかに超えるので、H I T I戦略により、脳などの非分裂組織を含めた多くの器官における導入遺伝子カセットの標的化組込みが可能になった。とりわけ、網膜色素変性症のラットモデルにおいて、H I T Iを使用してM e r t k遺伝子のエクソン2の機能的コピーを標的化挿入して1.9kbの欠失に起因する遺伝子の機能喪失を補正することによって視覚機能が復活したが、一方、従来のH D Rではこれを復活させることができなかつた。これらの結果から、H I T Iに基づく処置を使用して種々の遺伝子疾患および標的組織を好転させることができることが示唆される。しかし、H I T Iにはいくつかの限定があり、例えば、H I T Iでは、DNAをゲノム内の的確な場所に挿入することができるが、H I T Iにより既存の変異を取り除くことができないという事実に起因して、遺伝子点変異およびフレームシフト変異を修復することはできない。したがって、H I T I媒介性遺伝子補正戦略は、大きな欠失によって引き起こされる機能喪失型変異の標的化に関しては効果的であるが、機能獲得型優性変異など、全ての変異に効果的とは限らない（図5B）。このことにより、処置することができる疾患の型が大きく限定される。したがって、ゲノムのin vivo操作のための改善された技術が依然として必要とされている。

30

【0096】

40

50

最近の研究により、DNA修復複合体のエレメントが以前に考えられていたよりも乱雑であり、有糸分裂後の細胞においてさえ、NHEJ経路またはHDR経路に制限されないことが示唆された。これにより、細胞にDNA損傷を克服する柔軟性が付与され、ゲノムを補正する新しい機会がもたらされる。以前に、従来のHDRのための2つの相同アームを有するHITIドナーを構築することによってNHEJ媒介性HITIと標準のHDRを組み合わせることが試みられた。このドナー構造は、以前報告された相同性媒介性末端結合(HMEJ)戦略と同様である(図6A)(Yao, X. et al. *Cell Res.* 27, 801-814 (2017))。しかし、HEK293細胞におけるHMEJ様HITI-HDR組合せドナーの標的化組込み効率はHITIドナーよりも低く、これにより、従来の2つの相同アームの付加では分裂細胞における標的化遺伝子ノックイン効率が上昇しないことが示唆される(Suzuki, K. et al. *Nature* 540, 144-149 (2016))。

【0097】

ドナー上の相同配列の单一のストレッチ内にDSB誘導部位を必要とする独特のNHEJおよびHDR媒介性標的化遺伝子ノックイン方法が本明細書に記載される(図6B)。この設計は、「細胞間直線化单一相同アームドナー媒介性インtron標的化組込み(*intercellular linearized Single homology Arm donor mediated intron-Targeting Integration*)」と称される。SATIにより、单一相同アーム媒介性HDRまたは相同性非依存性NHEJに基づくHITIによるDNAノックインが可能になり、それにより、広範囲の変異および細胞型を標的とすることが可能になる。この系の有用性は、本明細書では、マウスにおける早期老化を引き起こす優性点変異の*in vivo*補正による潜在的治療法として例示される。本明細書の実施例において提示されるデータから、SATIが、その標的柔軟性および多用途性に起因して、*in vivo*ゲノム編集のための強力な遺伝学的ツールであることが示される。

【0098】

SATIは、インtron標的化遺伝子ノックインと、单一相同アームおよびCas9による切断部位を有する特定のドナーベクターを組み合わせた独特の戦略である。SATIのための独特的ベクター構造は、標的細胞において優勢なDSB修復機構(すなわち、单一相同アームによって媒介される非標準のHDRまたはNHEJ)を選択することによって効率的な遺伝子ノックインを達成する両方の能力(*bipotential capacity*)を有する。HMEJドナーは2つの相同アームならびにカット部位を含有し、外因性カセットが標準のHDRまたはNHEJ経路のいずれかによって標的部位に組み込まれることを可能にするので、SATIはHMEJとは異なる。従来のHDRのための2つの相同アームを有するHITIドナーを構築することによって同じドナー構造を作出することが以前に試みられた。しかし、この組合せHMEJ様ドナーの標的化組込み効率はHITIドナーよりも低く、それにより、従来の2つの相同アームの付加により分裂細胞における標的化遺伝子ノックイン効率が上昇しないこと、および以前に記載されている通り、標準のHDR経路とNHEJ経路が互いに競合することが示唆される。さらに、*in vivo* HDR適用は分裂能を有する組織に限定される。本試験では、HMEJは初代ニューロン培養物においてHITIおよびSATIと等しく効果的である。この結果から、標準のHDRとNHEJがこの細胞型では競合しないことが示唆され、これは、標準のHDRがニューロンでは活性ではないからである。したがって、標的細胞型におけるHMEJの効率は標準のHDR活性の影響を受ける可能性がある。*in vivo*組織は分裂している状態または分裂していない状態のいずれかである細胞型の混合物からなるので、HMEJが広範囲の*in vivo*細胞型を標的とし得るかどうかは依然として不明なままである。対照的に、SATI媒介性ノックインは、HITIと同じく分裂細胞および非分裂細胞のどちらにおいても達成されている。HMEJとSATIの差異の詳細を明らかにするために、多くの異なる細胞型におけるさらなる並列比較が必要である。適応性に関して、SATIは、広範囲の変異および細胞型を標的とすることができる多用途*in vivo*ゲノム編集方法である(図6C)。さらに、HMEJドナーの設計は、望ましくないスプライシングを

10

20

30

40

50

回避するために、左側の相同アームにスプライシングアクセプターが含まれる可能性を伴わずに2つの相同アームを含める必要があるので、S A T Iよりも柔軟性が低い。さらに、2つの相同アームにより、A A Vにパッケージングすることができる挿入されるカセットのサイズが小さくなり、したがって、そのi n v i v oでの適用が限定される。

【0099】

i n v i t r oおよびi n v i v oにおいてニューロンへの標的化導入遺伝子ノックインを可能にするS A T Iの概念実証が基礎およびトランスレーショナルな神経科学研究の両方の進歩に役立つであろう。例えば、ニューロンの活動の的確な細胞型特異的制御を獲得するために、この系を使用して関連性のある遺伝子座の下流に光遺伝学的活性化因子を挿入することができる。成体マウスの脳および筋肉におけるi n v i v oでのS A T I媒介性ゲノム編集により、他の種の非分裂組織の細胞系列を追跡するためのノックインレポーターの生成の可能性がもたらされる。これは、トランスジェニックツールが限られている動物モデル（例えば、非ヒト霊長類）において特に有用である。現行のウイルスベクター媒介性導入遺伝子補完手法を使用して、劣性変異、特に、変異体対立遺伝子により機能的タンパク質が産生されない（または非常にわずかに産生される）変異によって引き起こされる疾患を有効に処置することができる。これらなどの遺伝性障害に関して、遺伝子治療により臨床試験において注目すべき治療的利益がもたらされている。しかし、この遺伝子補完戦略は、軟骨無形成症、ハンチントン病、および早老症症候群などの、機能の増大または異常な機能を有するタンパク質が産生される機能獲得型遺伝子変異を処置するためには使用することができない。S A T I系により、多数の組織における標的化遺伝子ノックインが可能になり、したがって、i n v i v o遺伝子補正に関する最初のi n v i v o概念実証がもたらされる。

10

【0100】

本試験において優性点変異によって引き起こされる早期老化マウスモデルで達成されたS A T I媒介性i n v i v o遺伝子補正効率は軽度であるが（肝臓で2%）、いくつかの組織における老化表現型の減弱、ならびに寿命の延長が観察された。さらに、皮膚および脾臓において、ならびに尾端線維芽細胞において老化表現型の減弱が観察されたが、後期（およそ生後90日目）にはこれらの組織におけるS A T I媒介性遺伝子ノックインをP C RおよびN G Sによって検出することはできなかった。S A T I効率を上昇させるため、ならびに、表現型の改善の程度および補正された細胞と細胞非自律性効果の関連性を明らかにするために、効率的な遺伝子送達ツールの開発ならびにo a H D Rの詳細な機構の解明が必要である。

20

【0101】

総合すると、本発明者らの結果から、全身送達によって多数の組織を標的とすることにより、ノックイン動物を生成し、成体組織であっても優性変異をi n v i v oで補正するためにS A T Iを潜在的に使用することができる事が示される。重要なことに、ヒトR e f S e q遺伝子の90%よりも多くが4 k b未満のオープンリーディングフレームを有し、これは現行のA A Vに基づく送達方法の能力の範囲内であることに留意するべきである。この進歩した遺伝子修復手法を、一部の実施形態では、優性変異を含めた広範囲の変異型のi n v i v o標的遺伝子置換えのための効果的な戦略の開発、ならびに遺伝学的多器官および全身性病理に対処することに使用する。

30

【0102】

ゲノム編集の方法

一態様では、細胞内の標的ゲノムを編集する方法が本明細書で提供される。いくつかのそのような方法は、一部の実施形態では、細胞を（i）置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および（i i）標的化エンドヌクレアーゼと接触させるステップを含み、ここで、置換え配列は標的ゲノムと比較して少なくとも1つのヌクレオチドの差異を含み、標的ゲノムは標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物により標的ゲノムの少なくとも一部分が置き換えられる。

40

50

【0103】

一部の実施形態では、本明細書のゲノム編集の方法では、置換配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物を使用する。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物は、表2の核酸配列と少なくとも90%相同的な核酸配列を有する。

【0104】

一部の実施形態では、本明細書のゲノム編集の方法では、標的化エンドヌクレアーゼを使用する。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ、TALENヌクレアーゼ、DNAによりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、Cas9、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(c2c1)、Cas12c(c2c3)、Cas12g、Cas12i、Cas14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Csf1、Cas13a(c2c2)、Cas13b(c2c6)、Cas13c(c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8、c2c9、c2c10、Cas10、CASTおよびTn6677からなる群より選択されるCRISPRヌクレアーゼである。

10

【0105】

一部の実施形態では、本明細書のゲノム編集の方法は、細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドはガイドRNAである。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドまたはガイドRNAは、表3の核酸配列と少なくとも90%同一の配列を有する。

20

【0106】

一部の実施形態では、本明細書のゲノム編集の方法では、ゲノム配列と置き換えるための配列を含有する置換配列を使用する。一部の実施形態では、置換配列は、標的ゲノムと比較して单一ヌクレオチド差異を含む。一部の実施形態では、一塩基差異は、置換、挿入、および欠失のうちの1つから選択される。一部の実施形態では、置換配列は、標的ゲノムと比較して、置換、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む。一部の実施形態では、置換配列は、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む。一部の実施形態では、置換配列は、標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある当該遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む。

【0107】

30

一部の実施形態では、本明細書のゲノム編集の方法により、細胞のゲノムを編集する。これだけに限定されないが、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臍ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T細胞、B細胞、NK細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、関門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臍脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの1つまたは複数から選択される細胞を含めた任意の細胞が本明細書の方法における使用のために意図されている。

【0108】

40

本明細書のゲノム編集の方法では、ゲノム編集に必要な構成成分を含む構築物、例えばDNA構築物を使用する。例えば、一部の実施形態では、構築物は、構築物内にコードされている单一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスを含めたウイルス構築物である。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、ミニサークルまたはプラスミドを含めた非ウイルス構築物である。

【0109】

一部の実施形態では、本明細書のゲノム編集の方法を、細胞を接触させることによって実施する。一部の実施形態では、細胞をin vitroで接触させる。一部の実施形態では、細胞をin vitroで接触させる。一部の実施形態では、細胞は被験体由来のも

50

のである。一部の実施形態では、被験体は、ヒト、非ヒト靈長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ラット、またはマウスである。一部の実施形態では、被験体は置換え配列と相同な遺伝子に変異を有する。

【0110】

処置方法

別の態様では、遺伝子に変異を有する被験体における遺伝子疾患を処置する方法が提供される。いくつかのそのような方法は、一部の実施形態では、被験体由来の細胞を (i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物、および (ii) 標的化エンドヌクレアーゼと接触させるステップを含み、ここで、置換え配列は遺伝子の野生型配列を含み、遺伝子は標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物により遺伝子の少なくとも一部分が置き換える。

10

【0111】

一部の実施形態では、本明細書のゲノム編集の方法では、置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物を使用する。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物は、表2の核酸配列と少なくとも90%相同な核酸配列を有する。

【0112】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患を処置する方法では、標的化エンドヌクレアーゼを使用する。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ、TALENヌクレアーゼ、DNAによりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、Cas9、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(c2c1)、Cas12c(c2c3)、Cas12g、Cas12i、Cas14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Casf1、Cas13a(c2c2)、Cas13b(c2c6)、Cas13c(c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8、c2c9、c2c10、Cas10、CASTおよびTn6677からなる群より選択されるCRISPRヌクレアーゼである。

20

【0113】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患を処置する方法は、細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドはガイドRNAである。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドまたはガイドRNAは、表3の核酸配列と少なくとも90%同一の配列を有する。

30

【0114】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患を処置する方法では、ゲノム配列と置き換えるための配列を含有する置換え配列を使用する。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムと比較して单一ヌクレオチド差異を含む。一部の実施形態では、一塩基差異は、置換、挿入、および欠失のうちの1つから選択される。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムと比較して、置換、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む。一部の実施形態では、置換え配列は、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある当該遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む。

40

【0115】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患を処置する方法により、細胞のゲノムを編集する。これだけに限定されないが、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臍ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T細胞、B細胞、NK細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、関門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臍脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの1つまたは複数から選択される細胞を含めた任意の細胞が本明細書の方法における使用のために意図されている。

50

【0116】

本明細書の遺伝子疾患を処置する方法では、ゲノム編集に必要な構成成分を含む構築物、例えばDNA構築物を使用する。例えば、一部の実施形態では、構築物は、構築物内にコードされている単一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスを含めたウイルス構築物である。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、ミニサークルまたはプラスミドを含めた非ウイルス構築物である。

【0117】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患を処置する方法を、細胞を接触させることによって実施する。一部の実施形態では、細胞を *in vivo* で接触させる。一部の実施形態では、細胞を *in vitro* で接触させる。一部の実施形態では、細胞は被験体由来のものである。一部の実施形態では、被験体は、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ラット、またはマウスである。一部の実施形態では、被験体は置換え配列と相同な遺伝子に変異を有する。

10

【0118】

遺伝子疾患を処置する方法は、これだけに限定されないが、遺伝子疾患を処置することを含み、ここで、遺伝子疾患は、軟骨無形成症、アルファ1アンチトリプシン欠損症、アルツハイマー病、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性囊胞腎、乳がん、がん、シャルコー・マリー・トゥース、結腸がん、ネコ鳴き症候群、クローン病、囊胞性線維症、ダーカム病、ダウン症候群、デュアン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第V因子ライデン血栓形成傾向、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱X症候群、ゴーケ病、ヘモクロマトーシス、血友病、全前脳症、ハンチントン病、クラインフェルター症候群、レーバー先天黒内障、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、ヌーナン症候群、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、ポーランド異常、ポルフィリン症、早老症、前立腺がん、網膜色素変性症、重症複合免疫不全症（SCID）、鎌状赤血球症、皮膚がん、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、ティ・サックス、サラセミア、トリメチルアミン尿症、ターナー症候群、口蓋心顔面症候群、WAGR症候群、およびウィルソン病から選択される。一部の実施形態では、遺伝子疾患は早老症を含む。

20

【0119】

さらなる態様では、遺伝子疾患の処置に使用するための組成物が提供される。一部の実施形態では、いくつかのそのような方法は、遺伝子疾患の処置に使用するための（i）置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む単一相同アーム構築物、および（ii）標的化エンドヌクレアーゼを含み、ここで、置換え配列は標的ゲノムと比較して少なくとも1つのヌクレオチドの差異を含み、標的ゲノムは標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む。一部の実施形態では、単一相同アーム構築物により遺伝子の少なくとも一部分が置き換えられる。

30

【0120】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物には、置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む単一相同アーム構築物を使用する。一部の実施形態では、単一相同アーム構築物は、表2の核酸配列と少なくとも90%相同的な核酸配列を有する。

40

【0121】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物には、標的化エンドヌクレアーゼを使用する。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、CRISPRヌクレアーゼ、TALENヌクレアーゼ、DNAによりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、Cas9、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(c2c1)、Cas12c(c2c3)、Cas12g、Cas12i、

50

Cas14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Casf1、Cas13a(c2c2)、Cas13b(c2c6)、Cas13c(c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8、c2c9、c2c10、Cas10、CASTおよびTn6677からなる群より選択されるCRISPRヌクレアーゼである。

【0122】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物は、細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドはガイドRNAである。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドまたはガイドRNAは、表3の核酸配列と少なくとも90%同一の配列を有する。

【0123】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物には、ゲノム配列と置き換えるための配列を含有する置換配列を使用する。一部の実施形態では、置換配列は、標的ゲノムと比較して單一ヌクレオチド差異を含む。一部の実施形態では、一塩基差異は、置換、挿入、および欠失のうちの1つから選択される。一部の実施形態では、置換配列は、標的ゲノムと比較して、置換、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む。一部の実施形態では、置換配列は、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む。一部の実施形態では、置換配列は、標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある当該遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む。

【0124】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物により、細胞のゲノムを編集する。これだけに限定されないが、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臓ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T細胞、B細胞、NK細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、関門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臓脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの1つまたは複数から選択される細胞を含めた任意の細胞が本明細書の方法における使用のために意図されている。

【0125】

本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物には、ゲノム編集に必要な構成成分を含む構築物、例えばDNA構築物を使用する。例えば、一部の実施形態では、構築物は、構築物内にコードされている単一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、アデノ隨伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスを含めたウイルス構築物である。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、ミニサークルまたはプラスミドを含めた非ウイルス構築物である。

【0126】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物を、細胞を接触させることによって実施する。一部の実施形態では、細胞をin vivoで接触させる。一部の実施形態では、細胞をin vitroで接触させる。一部の実施形態では、細胞は被験体由来のものである。一部の実施形態では、被験体は、ヒト、非ヒト靈長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ラット、またはマウスである。一部の実施形態では、被験体は置換配列と相同な遺伝子に変異を有する。

【0127】

遺伝子疾患の処置に使用するための組成物は、これだけに限定されないが、遺伝子疾患を処置することを含み、ここで、遺伝子疾患は、軟骨無形成症、アルファ1アンチトリプシン欠損症、アルツハイマー病、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性囊胞腎、乳がん、がん、シャルコー・マリー・トゥース、結腸がん、ネコ鳴き症候群、クローン病、囊胞性線維症、ダーカム病、ダウン症候群、デュアン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第V因子ライデン血栓形成傾向、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱X症候群、ゴーシエ病、ヘモクロマトーシス、血友病、全前脳症、ハンチント

10

20

30

40

50

ン病、クラインフェルター症候群、レーバー先天黒内障、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、ヌーナン症候群、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、ポーランド異常、ポルフィリン症、早老症、前立腺がん、網膜色素変性症、重症複合免疫不全症（S C I D）、鎌状赤血球症、皮膚がん、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、ティ・サックス、サラセミア、トリメチルアミン尿症、ターナー症候群、口蓋心顔面症候群、W A G R 症候群、およびウィルソン病から選択される。一部の実施形態では、遺伝子疾患は早老症を含む。

【 0 1 2 8 】

追加的な態様では、遺伝子疾患の処置に使用するための、（i）置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む、相同組換え修復のために構成された单一相同アーム構築物、および（ii）標的化エンドヌクレアーゼを含む組成物であって、置換え配列が、標的ゲノムと比較して少なくとも1つのヌクレオチドの差異を含み、標的ゲノムが、標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む、組成物が提供される。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物は、表2の核酸配列と少なくとも90%相同的な核酸配列を有する。

10

【 0 1 2 9 】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物には、標的化エンドヌクレアーゼを使用する。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、C R I S P R ヌクレアーゼ、T A L E N ヌクレアーゼ、D N A によりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、C a s 9 、C a s 1 2 a (C p f 1) 、C a s 1 2 b (c 2 c 1) 、C a s 1 2 c (c 2 c 3) 、C a s 1 2 g 、C a s 1 2 i 、C a s 1 4 、C a s 1 0 、C a s 3 、C a s X 、C a s Y 、C s f 1 、C a s 1 3 a (c 2 c 2) 、C a s 1 3 b (c 2 c 6) 、C a s 1 3 c (c 2 c 7) 、c 2 c 4 、c 2 c 5 、c 2 c 8 、c 2 c 9 、c 2 c 1 0 、C a s 1 0 、C A S T およびT n 6 6 7 7 からなる群より選択されるC R I S P R ヌクレアーゼである。

20

【 0 1 3 0 】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物は、細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドはガイドR N A である。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドまたはガイドR N A は、表3の核酸配列と少なくとも90%同一の配列を有する。

30

【 0 1 3 1 】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物には、ゲノム配列と置き換えるための配列を含有する置換え配列を使用する。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムと比較して单一ヌクレオチド差異を含む。一部の実施形態では、一塩基差異は、置換、挿入、および欠失のうちの1つから選択される。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムと比較して、置換、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む。一部の実施形態では、置換え配列は、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む。一部の実施形態では、置換え配列は、標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある当該遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む。

40

【 0 1 3 2 】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物により、細胞のゲノムを編集する。これだけに限定されないが、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臓ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T 細胞、B 細胞、N K 細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、関門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臓脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの1つまたは複数から選択される細胞を含めた任意の細胞が本明細書の方法における使用のために意図されている。

【 0 1 3 3 】

50

本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物には、ゲノム編集に必要な構成成分を含む構築物、例えばDNA構築物を使用する。例えば、一部の実施形態では、構築物は、構築物内にコードされている単一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスを含めたウイルス構築物である。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、ミニサークルまたはプラスミドを含めた非ウイルス構築物である。

【0134】

一部の実施形態では、本明細書の遺伝子疾患の処置に使用するための組成物を、細胞を接觸させることによって実施する。一部の実施形態では、細胞を *in vivo* で接觸させる。一部の実施形態では、細胞を *in vitro* で接觸させる。一部の実施形態では、細胞は被験体由来のものである。一部の実施形態では、被験体は、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ラット、またはマウスである。一部の実施形態では、被験体は置換え配列と相同な遺伝子に変異を有する。

10

【0135】

遺伝子疾患の処置に使用するための組成物は、これだけに限定されないが、遺伝子疾患を処置することを含み、ここで、遺伝子疾患は、軟骨無形成症、アルファ1アンチトリプシン欠損症、アルツハイマー病、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性囊胞腎、乳がん、がん、シャルコー・マリー・トゥース、結腸がん、ネコ鳴き症候群、クローン病、囊胞性線維症、ダーカム病、ダウン症候群、デュアン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第V因子ライデン血栓形成傾向、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱X症候群、ゴーシエ病、ヘモクロマトーシス、血友病、全前脳症、ハンチントン病、クラインフェルター症候群、レーバー先天黒内障、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、ヌーナン症候群、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、ポーランド異常、ポルフィリン症、早老症、前立腺がん、網膜色素変性症、重症複合免疫不全症(SCID)、鎌状赤血球症、皮膚がん、脊髄性筋萎縮症、タルガルト病、ティ・サックス、サラセミア、トリメチルアミン尿症、ターナー症候群、口蓋心顔面症候群、WAGR症候群、およびウィルソン病から選択される。一部の実施形態では、遺伝子疾患は早老症を含む。

20

【0136】

30

本明細書に開示される方法および組成物によって処置する遺伝子疾患としては、これだけに限定されないが、無セルロプラスミン血症、I型軟骨無発生症、軟骨無形成症、急性間欠性ポルフィリン症、アデニロコハク酸リアーゼ欠乏症、副腎白質ジストロフィー、ALADヒドロターゼ欠乏症、アラジール症候群、白皮症、アレキサンダー病、アルカブトン尿症、アルファ1-アンチトリプシン欠損症、アルストレーム症候群、アルツハイマー病、エナメル質形成不全症、筋萎縮性側索硬化症、アンドロゲン不応症、貧血、アンジエルマン症候群、アペール症候群、毛細血管拡張性運動失調症、ペア・スティーブンソン脳回転状皮膚症候群(Bearre-Stevenson cutis gyrata syndrome)、ベンジャミン症候群、ベータサラセミア、ビオチニダーゼ欠損症、膀胱がん、ブルーム症候群、骨疾患、乳がん、パート・ホッグ・デュベ症候群、CADASIL症候群、CGD慢性肉芽腫症(Chronic granulomatous disorder)、屈曲肢異形成症、カナバン病、がん、シャルコー・マリー・トゥース病、チャージ症候群、コケイン症候群、コフィン・ローリー症候群、II型およびXI型コラーゲン異常症(collagenopathy)、結腸直腸がん、結合組織病、カウデン症候群、ネコ鳴き症候群、クローン病(線維性狭窄(fibrostenosing))、クルーゾン症候群、クルーゾン皮膚骨格症候群(Crouzonodermoskeletal syndrome)、変性神経疾患、発達障害、ディジョージ症候群、遠位遺伝性運動神経障害、小人症、エーラース・ダンロス症候群、赤芽球増殖性プロトポルフィリン症、ファブリー病、顔面の傷害および障害、第V因子ライデン血栓形成傾向、家族性腺腫性ポリポーシス、家族性自律神経障害、FG症候群、脆弱X症候群、フリードライヒ失

40

50

調症、G 6 P D 欠乏症、ガラクトース血症、ゴーシェ病、遺伝学的脳障害、道化師様魚鱗癬 (Harlequin type ichthyosis)、頭部および脳形成異常、聴覚障害および聴覚消失、小児の聴覚の問題、ヘモクロマトーシス、血友病、肝造血性ポルフィリン症、遺伝性コプロポルフィリン症、遺伝性出血性毛細管拡張症 (HHT)、遺伝性多発性外骨腫症、遺伝性非ポリポーシス大腸がん、ホモシスチン尿症、ハンチントン病、原発性高シウ酸尿症、高フェニルアラニン血症、軟骨形成低下 (Hypochondrogenesis)、低軟骨形成症、色素失調症、乳児発症型上行性遺伝性痙性対麻痺 (infantile-onset ascending hereditary spastic paraparesis)、不妊症、ジャクソン・ワイズ症候群、ジユベール症候群、クラインフェルター症候群、レーバー先天黒内障、クニースト形成異常、クラッペ病、レッシュ・ナイハン症候群、白質ジストロフィー、リー・フラウメニ症候群、家族性リポタンパク質リバーゼ欠損症、男性性器疾患、マルファン症候群、マッキューン・オールブライト症候群、マクラウド症候群、MEDNIK、家族性地中海熱、メンケス病、代謝障害、ベータ-グロビン型メトヘモグロビン血症、メチルマロン酸血症 (methylmalonic academia)、ミクロ症候群 (Micro syndrome)、小頭症、運動障害、モワット・ウイルソン症候群、ムコ多糖症 (MPS I)、ムエンケ症候群 (Muenke syndrome)、筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよびベッカー型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、I型神経線維腫症、II型神経線維腫症、神経疾患、神経筋障害、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ 1 S M P D 1、非症候性聴覚消失、ヌーナン症候群、オグデン症候群、骨形成不全症、感音性難聴を伴う軟骨形成異常、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症、ペンドレッド症候群、ポイツ・ジェガース症候群、ファイファー症候群、フェニルケトン尿症、多嚢胞性腎疾患、ポルフィリン症、プラダー・ウィリー症候群、原発性線毛機能不全症 (PCD)、原発性肺高血圧症、早老症、プロピオン酸血症 (propionic academia)、プロテイン C 欠乏症、プロテイン S 欠乏症、偽性ゴーシェ病、弾力線維性仮性黄色腫、網膜障害、網膜芽細胞腫、レット症候群、ルビンシュタイン・テイビ症候群、シュワルツ・ヤンペル症候群、発育遅延および黒色表皮腫を伴う重症軟骨無形成症 (SADDAN)、鎌状赤血球貧血、シデリウス X 連鎖精神遅滞症候群、皮膚色素沈着障害 (Skin pigmentation disorder)、スミス・レムリ・オビツ症候群、スミス・マゲニス症候群、発語およびコミュニケーション障害、球脊髄性筋萎縮症、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、脊髄小脳失調症、ストラドウィック型脊椎骨端骨幹端異形成 (Strudwick type spondyloepimetaphyseal dysplasia)、先天性脊椎骨端異形成症 (spondyloepiphysial dysplasia congenital)、ステイックラー症候群、ティ・サックス病、テトラヒドロビオブテリン欠乏症 (tetrahydrobiopterin deficiency)、致死性骨異形成症、甲状腺疾患、トリーチャー・コリンズ症候群、アッシャー症候群、異型ポルフィリン症、フォンヒッペル・リンダウ病、ワールデンブルグ症候群、ワイゼンバッハ・ツヴァイミュラー症候群、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、ウォルフ・ヒルシュホーン症候群、色素性乾皮症、X 連鎖重症複合免疫不全、または X 連鎖鉄芽球性貧血が挙げられる。

【0137】

1 アーム相同組換え修復の方法

別の態様では、細胞内の標的ゲノムを編集するための 1 アーム相同組換え修復の方法が提供される。いくつかのそのような方法は、一部の実施形態では、細胞を (i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物、および (ii) 標的化エンドヌクレアーゼと接触させるステップを含み、ここで、置換え配列は標的ゲノムと比較して少なくとも 1 つのヌクレオチドの差異を含み、標的ゲノムは標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含み、置換え配列が相同組換え修復および未知のタンパク質を使用して標的ゲノムに組み込まれる。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物により標的ゲノムの少なくとも一部分が置き換えられる。

10

20

30

40

50

【0138】

一部の実施形態では、本明細書の1アーム相同組換え修復の方法では、置換配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物を使用する。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物は、表2の核酸配列と少なくとも90%相同的な核酸配列を有する。

【0139】

一部の実施形態では、本明細書の1アーム相同組換え修復の方法では、標的化エンドヌクレアーゼを使用する。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、C R I S P R ヌクレアーゼ、T A L E N ヌクレアーゼ、D N A によりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、C a s 9 、C a s 1 2 a (C p f 1) 、C a s 1 2 b (c 2 c 1) 、C a s 1 2 c (c 2 c 3) 、C a s 1 2 g 、C a s 1 2 i 、C a s 1 4 、C a s 1 0 、C a s 3 、C a s X 、C a s Y 、C s f 1 、C a s 1 3 a (c 2 c 2) 、C a s 1 3 b (c 2 c 6) 、C a s 1 3 c (c 2 c 7) 、c 2 c 4 、c 2 c 5 、c 2 c 8 、c 2 c 9 、c 2 c 1 0 、C a s 1 0 、C A S T およびT n 6 6 7 7 からなる群より選択されるC R I S P R ヌクレアーゼである。

10

【0140】

一部の実施形態では、本明細書の1アーム相同組換え修復の方法は、細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドはガイドR N A である。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドまたはガイドR N A は、表3の核酸配列と少なくとも90%同一の配列を有する。

20

【0141】

一部の実施形態では、本明細書の1アーム相同組換え修復の方法では、ゲノム配列と置き換えるための配列を含有する置換配列を使用する。一部の実施形態では、置換配列は、標的ゲノムと比較して单一ヌクレオチド差異を含む。一部の実施形態では、一塩基差異は、置換、挿入、および欠失のうちの1つから選択される。一部の実施形態では、置換配列は、標的ゲノムと比較して、置換、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む。一部の実施形態では、置換配列は、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む。一部の実施形態では、置換配列は、標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある当該遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む。

30

【0142】

一部の実施形態では、本明細書の1アーム相同組換え修復の方法により、細胞のゲノムを編集する。これだけに限定されないが、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臓ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T細胞、B細胞、N K 細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、関門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臓脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの1つまたは複数から選択される細胞を含めた任意の細胞が本明細書の方法における使用のために意図されている。

【0143】

本明細書の1アーム相同組換え修復の方法では、ゲノム編集に必要な構成成分を含む構築物、例えばD N A 構築物を使用する。例えば、一部の実施形態では、構築物は、構築物内にコードされている单一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスを含めたウイルス構築物である。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、ミニサークルまたはプラスミドを含めた非ウイルス構築物である。

40

【0144】

一部の実施形態では、本明細書の1アーム相同組換え修復の方法を、細胞を接触させることによって行う。一部の実施形態では、細胞をi n v i v oで接触させる。一部の実

50

施形態では、細胞を *in vitro* で接触させる。一部の実施形態では、細胞は被験体由来のものである。一部の実施形態では、被験体は、ヒト、非ヒト靈長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ラット、またはマウスである。一部の実施形態では、被験体は置換配列と相同な遺伝子に変異を有する。

【0145】

組成物およびキット

追加的な態様では、(i) 置換配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および(ii) 標的化エンドヌクレアーゼを含む組成物であって、置換配列が、標的ゲノムと比較して少なくとも 1 つのヌクレオチドの差異を含み、標的ゲノムが、標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む、組成物が提供される。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物は、表 2 の核酸配列と少なくとも 90 % 相同な核酸配列を有する。

10

【0146】

一部の実施形態では、本明細書の組成物は、細胞を含む。一部の実施形態では、細胞は哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、細胞はヒト細胞である。一部の実施形態では、細胞は、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臍ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、関門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臍脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの 1 つまたは複数から選択される。

20

【0147】

本明細書の組成物は、ゲノム編集に必要な構成成分を含む構築物、例えば DNA 構築物を含む。例えば、一部の実施形態では、構築物は、構築物内にコードされている单一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および標的化エンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスを含めたウイルス構築物である。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、ミニサークルまたはプラスミドを含めた非ウイルス構築物である。

30

【0148】

一部の実施形態では、本明細書の組成物は、薬学的に許容される緩衝液または賦形剤を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、これだけに限定されないが、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノール、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム、およびこれらの組合せを含む。

【0149】

一部の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、標的化エンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、CRISPR ヌクレアーゼ、TALEN ヌクレアーゼ、DNA によりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、標的化エンドヌクレアーゼは、Cas9、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(c2c1)、Cas12c(c2c3)、Cas12g、Cas12i、Cas14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Csf1、Cas13a(c2c2)、Cas13b(c2c6)、Cas13c(c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8、c2c9、c2c10、Cas10、CAST および Tn6677 からなる群より選択される CRISPR ヌクレアーゼである。

40

【0150】

一部の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、ガイドオリゴヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドはガイド RNA である。一部の実施形態では、ガイドオリゴヌクレオチドまたはガイド RNA は、表 3 の核酸配列と少なくとも 90 % 同一の配列を有する。

50

【0151】

本明細書に記載の少なくとも1つの組成物および本明細書で提供される少なくとも1つの方法における使用についての指示を含むキットが本明細書でさらに提供される。

【0152】

送達用の組成物

本開示の組成物を送達するために使用するために任意の適切な送達方法が意図されている。一部の実施形態では、S A T I 系の個々の構成成分（例えば、ヌクレアーゼおよび/または外因性D N A配列）を同時にまたは時間的に隔てて送達する。遺伝子改変の方法の選択は、形質転換される細胞型および/または形質転換が行われる状況（例えば、*in vitro*、*ex vivo*、または*in vivo*）に依存する。これらの方10法の一般的な考察は、Ausubel, et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd. ed, Wiley & Sons, 1995に見いだされる。

【0153】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、相補鎖核酸（例えば、g R N A）、部位特異的改変ポリペプチド（例えば、C a s タンパク質）、および/または外因性D N A配列をコードするヌクレオチド配列を含む1つまたは複数の核酸を標的D N Aに接触させるまたは細胞（または細胞の集団）に導入するステップを伴う。相補鎖核酸および/または部位特異的改変ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む適切な核酸としては発現ベクターが挙げられ、その場合、相補鎖核酸および/または部位特異的改変ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターは組換え発現ベクターである。

【0154】

送達方法または形質転換の非限定的な例としては、例えば、ウイルスまたはバクテリオファージ感染、トランスフェクション、コンジュゲーション、プロトプラスト融合、リポフェクション、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンイミン（P E I）媒介性トランスフェクション、D E A E - デキストララン媒介性トランスフェクション、リポソーム媒介トランスフェクション、パーティクルガン技術、リン酸カルシウム沈殿、直接微量注射、およびナノ粒子媒介性核酸送達が挙げられる（例えば、Panyam et., al *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 Sep. 13. pii: 50169-409X (12)00283-9. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.023を参照されたい）。

【0155】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載の1つもしくは複数のベクターなどの1つもしくは複数のポリヌクレオチド、1つもしくは複数のその転写物、および/またはそれから転写される1つもしくは複数のタンパク質を宿主細胞に送達するステップを含む方法を提供する。一部の態様では、本開示は、そのような方法によって作製される細胞、およびそのような細胞を含むまたはそれから生じる生物体（例えば、動物、植物、または真菌など）をさらに提供する。一部の実施形態では、ヌクレアーゼタンパク質を相補鎖配列と組み合わせて、必要に応じて相補鎖配列との複合体として細胞に送達する。従来のウイルスに基づく遺伝子移入方法およびウイルスに基づかない遺伝子移入方法を哺乳動物細胞または標的組織に核酸を導入するために使用することが意図されている。そのような方法を使用して、S A T I 系の構成成分をコードする核酸を培養物中または宿主生物体内の細胞に投与する。非ウイルスベクター送達系としては、D N A プラスミド、R N A（例えば、本明細書に記載のベクターの転写物）、ネイキッド核酸、および、リポソームなどの送達ビヒクルと複合体を形成した核酸が挙げられる。ウイルスベクター送達系としては、D N AおよびR N Aウイルスが挙げられ、これは、細胞への送達後にエピソームを有し得るかまたはゲノムに組み込まれ得る。遺伝子治療手順の概説については、Anderson, *Science* 256: 808-813 (1992); Nabel & Felgner, *TIBTECH* 11: 211-217 (1993); Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11: 162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11: 167-175 (1993); Miller, *Nature* 357: 455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6 (10): 1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8: 35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, *British Medical B* 40

10

20

30

40

50

ulletin 51 (1): 31-44 (1995); Haddada et al., in *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler and Bohm (eds) (1995); および Yu et al., *Gene Therapy* 1: 13-26 (1994)を参照されたい。

【0156】

核酸のウイルスによらない送達の方法としては、リポフェクション、ヌクレオフェクション、微量注射、電気穿孔、微粒子銃 (biolistic)、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、ナノ粒子、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、人工ビリオン、および作用物質により増強されるDNAの取り込みを挙げることができる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号；および同第4,897,355号) に記載されており、リポフェクション試薬は商業的に販売されている(例えば、Transfectam (商標) および Lipofectin (商標))。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適したカチオン性および中性脂質としては、Felgner, WO 91/17424; WO 91/16024のものが挙げられる。送達は細胞(例えば、in vitroまたはex vivo投与)または標的組織(例えば、in vivo投与)へのものであることが意図されている。

10

【0157】

免疫脂質複合体などの標的化リポソームを含めた脂質：核酸複合体の調製が周知である(例えば、Crystal, *Science* 270: 404-410 (1995); Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* 2: 291-297 (1995); Behr et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 382-389 (1994); Remy et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 647-654 (1994); Gao et al., *Gene Therapy* 2: 710-722 (1995); Ahmad et al., *Cancer Res.* 52: 4817-4820 (1992); 米国特許第4,186,183号、同第4,217,344号、同第4,235,871号、同第4,261,975号、同第4,485,054号、同第4,501,728号、同第4,774,085号、同第4,837,028号、および同第4,946,787号を参照されたい)。

20

【0158】

RNAまたはDNAウイルスに基づく系を使用して、体内の特定の細胞を標的とし、ウイルスペイロードを細胞の核に輸送する。あるいは、ウイルスペクターを直接投与(in vivo)するか、またはウイルスペクターを使用して細胞をin vitroで処理し、改変された細胞を必要に応じて投与する(ex vivo)。ウイルスに基づく系としては、これだけに限定されないが、遺伝子移入のためのレトロウイルスペクター、レンチウイルスペクター、アデノウイルスペクター、アデノ随伴ベクター、および単純ヘルペスウイルスペクターが挙げられる。宿主ゲノムへの組込みは、一部の実施形態では、レトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルス遺伝子移入方法を用いて行い、一部の実施形態では、それにより、挿入された導入遺伝子の長期にわたる発現がもたらされる。多くの異なる細胞型および標的組織において高い形質導入効率が観察される。

30

【0159】

ある特定の実施形態では、外来エンベロープタンパク質を組み入れ、潜在的な標的細胞の標的集団を増大させることによってレトロウイルスの向性を変更する。レンチウイルスペクターは、非分裂細胞に形質導入または感染することができ、高いウイルス力値を生じるレトロウイルスペクターである。レトロウイルス遺伝子移入系の選択は標的組織に依存する。一部の実施形態では、レトロウイルスペクターは、最大6~10 kbの外来配列のパッケージング能を有するシス作用性の長い末端リピートを含む。一部の実施形態では、ベクターの複製およびパッケージングのために最小シス作用性LTRで十分であり、それにより、治療用遺伝子を標的細胞に組み込んで恒久的な導入遺伝子発現をもたらすことができる。レトロウイルスペクターは、これだけに限定されないが、マウス白血病ウイルス(MuLV)に基づくもの、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)に基づくもの、サル免疫不全ウイルス(SIV)に基づくもの、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に基づくもの、およびこれらの組合せを含む(例えば、Buchscher et al., *J. Virol.* 66: 27

40

50

31-2739 (1992) ; Johann et al., J. Virol. 66: 1635-1640 (1992) ; Somm
nerfelt et al., Virol. 176: 58-59 (1990) ; Wilson et al., J. Virol. 63: 2
374-2378 (1989) ; Miller et al., J. Virol. 65: 2220-2224 (1991) ; PCT
/ U S 9 4 / 0 5 7 0 0 を参照されたい)。

【0160】

一部の実施形態では、アデノウイルスに基づく系を使用する。一部の実施形態では、アデノウイルスに基づく系により、導入遺伝子の一過性発現が導かれる。アデノウイルスに基づくベクターは、細胞に高効率で形質導入することができ、一部の実施形態では、細胞分裂を必要としない。アデノウイルスに基づくベクターを用いると高い力価およびレベルの発現が可能である。一部の実施形態では、例えば、核酸およびペプチドの *in vitro* 產生、ならびに *in vivo* および *ex vivo* 遺伝子治療手順のために、アデノ 10 随伴ウイルス（「AAV」）ベクターを使用して細胞に標的核酸を形質導入する（例えば、West et al., Virology 160: 38-47 (1987)；米国特許第4,797,368号；WO 93/24641；Kotin, Human Gene Therapy 5: 793-801 (1994)；Muzyczka, J. Clin. Invest. 94: 1351 (1994)を参照されたい。組換えAAVベクターの構築は、米国特許第5,173,414号；Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3251-3260 (1985)；Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4: 2072-2081 (1984)；Hermonat & Muzyczka, PNAS 81: 6466-6470 (1984)；およびSamulski et al., J. Virol. 63: 03822-3828 (1989)を含めたいいくつかの刊行物に記載されている。 20

【0161】

一部の実施形態では、パッケージング細胞を使用して、宿主細胞に感染することができるウイルス粒子を形成する。そのような細胞は、これだけに限定されないが、293細胞（例えば、アデノウイルスのパッケージング用）、および.psi.2細胞またはPA317細胞（例えば、レトロウイルスのパッケージング用）を含む。ウイルスベクターは、核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージングする細胞株を產生することによって生成される。一部の場合では、ベクターは、パッケージングおよびその後の宿主への組込みに必要な最小のウイルス配列を含有する。一部の場合では、ベクターは、発現力セットによって発現させるポリヌクレオチド（複数可）に置き換えられる他のウイルス配列を含有する。一部の実施形態では、欠如しているウイルスの機能がパッケージング細胞株によってトランスで供給される。例えば、一部の実施形態では、AAVベクターは、パッケージングおよび宿主ゲノムへの組込みに必要なAAVゲノム由来のITR配列を含む。ウイルスDNAを、他のAAV遺伝子、すなわちrepおよびcapをコードするヘルパープラスミドを含有するが、ITR配列を欠く細胞株にパッケージングする。あるいは、細胞株にアデノウイルスをヘルパーとして感染させる。ヘルパーウイルスにより、AAVベクターの複製およびヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現が促進される。アデノウイルスの夾雜を、例えば、アデノウイルスの感受性がAAVよりも高い加熱処理によって減少させる。 30

【0162】

あるいは、宿主細胞に本明細書に記載の1つまたは複数のベクターを一過性にまたは非一過性にトランスフェクトする。一部の実施形態では、細胞が被験体に天然に存在するように細胞にトランスフェクトする。一部の実施形態では、細胞を被験体から取得するかまたは細胞は被験体に由来し、トランスフェクトする。一部の実施形態では、細胞を、細胞株などの、被験体から取得した細胞に由来する。一部の実施形態では、本明細書に記載の1つまたは複数のベクターをトランスフェクトした細胞を使用して、1つまたは複数のベクター由来配列を含む新しい細胞株を樹立する。一部の実施形態では、本明細書に記載のCRISPR系の構成成分を一過性にトランスフェクトし（例えば、1つまたは複数のベクターの一過性トランスフェクション、またはRNAを用いたトランスフェクションによってなど）、CRISPR複合体の活性によって改変した細胞を使用して、改変を含有するがいかなる他の外因性配列も有さない細胞を含む新しい細胞株を樹立する。 40 50

【0163】

本発明の方法での使用のために宿主細胞に適合する任意の適切なベクターが意図されている。真核生物宿主細胞のためのベクターの非限定的な例としては、pXT1、pSG5、pSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVLSV40が挙げられる。

【0164】

一部の実施形態では、相補鎖核酸および/または部位特異的改変ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、制御エレメント、例えば、プロモーターなどの転写制御エレメントに作動可能に連結している。一部の実施形態では、転写制御エレメントは、真核細胞、例えば哺乳動物細胞、または原核細胞（例えば、細菌もしくは古細菌細胞）のいずれかにおいて機能的なものである。一部の実施形態では、相補鎖核酸および/または部位特異的改変ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、原核細胞および/または真核細胞における相補鎖核酸および/または部位特異的改変ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする複数の制御エレメントと作動可能に連結している。

10

【0165】

利用する宿主/ベクター系に応じて、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーター、転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含めたいいくつかの適切な転写および翻訳制御エレメントのいずれかを発現ベクターに使用することができる（例えば、U6プロモーター、H1プロモーターなど；上記を参照されたい）（例えば、Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology*, 153: 516-544を参照されたい）。

【0166】

20

一部の実施形態では、相補鎖核酸および/または部位特異的改変ポリペプチドをRNAとして提供する。そのような場合では、相補鎖核酸および/または部位特異的改変ポリペプチドをコードするRNAを直接化学合成によって作製するか、または、*in vitro*において相補鎖核酸をコードするDNAから転写することができる。相補鎖核酸および/または部位特異的改変ポリペプチドをコードするRNAを*in vitro*においてRNAポリメラーゼ酵素（例えば、T7ポリメラーゼ、T3ポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼなど）を使用して合成する。合成されたら、RNAを標的DNAと直接接触させるか、または、核酸を細胞に導入するための任意の適切な技法（例えば、微量注射、電気穿孔、トランスフェクションなど）を使用して細胞に導入する。

【0167】

30

相補鎖核酸（DNAまたはRNAのいずれかとして導入される）および/または部位特異的改変ポリペプチド（DNAまたはRNAとして導入される）および/または外因性DNA配列をコードするヌクレオチドを細胞に適切なトランスフェクション技法を使用して提供する；例えば、Angel and Yanik (2010) *PLoS ONE* 5 (7): e11756、およびQiagenから市販されているTransMessenger（登録商標）試薬、STEMgentのStemfect（商標）RNA Transfection Kit、およびMirus Bio LLCのTransIT（登録商標）-mRNA Transfection Kitを参照されたい。相補鎖核酸および/または部位特異的改変ポリペプチドおよび/またはキメラ部位特異的改変ポリペプチドおよび/または外因性DNA配列をコードする核酸をDNAベクターで提供することができる。核酸の標的細胞への移入に有用な多くのベクター、例えば、プラスミド、コスミド、ミニサークル、ファージ、ウイルスなどが利用可能である。一部の実施形態では、核酸（複数可）を含むベクターは、例えば、プラスミド、ミニサークルDNA、サイトメガロウイルス、アデノウイルスのようなウイルスなど、エピソームとして維持されるか、または、例えば、MMLV、HIV-1、およびALVなどのレトロウイルス由来ベクターなど、標的細胞ゲノムに相同組換えもしくはランダムな組込みによって組み込まれる。

40

【0168】

核酸分子

追加的な態様では、置換配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物を含む核酸分子が提供される。一部の実施形態では、置換配列は、標的ゲ

50

ノムと比較して少なくとも 1 つのスクレオチドの差異を含む。一部の実施形態では、单一相同アーム構築物は、表 2 の核酸配列と少なくとも 90 % 相同な核酸配列を有する。

【 0 1 6 9 】

一部の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、ガイドオリゴスクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドオリゴスクレオチドはガイド RNA である。一部の実施形態では、ガイドオリゴスクレオチドまたはガイド RNA は、表 3 の核酸配列と少なくとも 90 % 同一の配列を有する。

【 0 1 7 0 】

一部の実施形態では、本明細書で提供される核酸は、標的化エンドスクレアーゼをコードする配列をさらに含む。一部の実施形態では、標的化エンドスクレアーゼは、CRISPR ヌクレアーゼ、TALEN ヌクレアーゼ、DNA によりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される。一部の実施形態では、標的化エンドスクレアーゼは、Cas9、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (c2c1)、Cas12c (c2c3)、Cas12g、Cas12i、Cas14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Csf1、Cas13a (c2c2)、Cas13b (c2c6)、Cas13c (c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8、c2c9、c2c10、Cas10、CAST および Tn6677 からなる群より選択される CRISPR ヌクレアーゼである。

10

【 0 1 7 1 】

一部の実施形態では、本明細書で提供される核酸は、ゲノム編集に必要な構成成分を含む構築物、例えば DNA 構築物を含む。例えば、一部の実施形態では、構築物は、構築物内にコードされている单一相同アーム構築物、ガイドオリゴスクレオチド、および標的化エンドスクレアーゼを含む。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスを含めたウイルス構築物である。一部の実施形態では、構築物は、これだけに限定されないが、ミニサークルまたはプラスミドを含めた非ウイルス構築物である。

20

【 0 1 7 2 】

追加的な態様では、本明細書で提供される少なくとも 1 つの核酸および本明細書で提供される少なくとも 1 つの方法に従った使用についての指示を含むキットが提供される。

30

40

50

【表 1 - 1】

表1:構築物の配列

構築物	配列	配列番号
pAAV-CjPVCGaMP-SAT1	Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcactgaggcccccggcaaaagccccggcgccccggaccc ggtcgccccggcctcagtgcggcggcggcggcggactccatcacttaggggtccggcggcggcgg cgccgcacggcgtGCCAACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGAAAAAAA GCACCGA C T C G G T G C C A C T T T C A A G T G A T A A C G G A C T A G C C T A T T T A A C T T G C T A T T T C A G C T C T A A A A C A C T G T A T C T T T G C T C A T C G G T G T T C G T C C T T C A C A A G A T A T A A G C C A A G A A A T C G A A A T A C T T C A A G T T A C G G T A A G C A T A T G A T A G T C C A T T T A A A C A T A A T T T A A A A C T G C A A A C T A C C C A A G A A A T T A T T A C T T T C A C G T C A C G T A T T T G T A C T A A T A T C T T G T T A C A G T C A A A T T A C T T C A A T T A T C T C T C A A C A G C C T T G T A T C G T A T A T G C A A A T A T G A A G G A A T C A T G G G A A A T A G G C C C T T C C T G C C C G A C C T T A G A G G G C G T T A A A C C C T A C T G T A T C T T T G C T T C A T C A C T C A C T C T C T G G G T C T C C T G C A G C A G A C G C A A G A C C C C A A A G A A A G C A C C A C C C A G G G T C T C A C A G T A A G G T G A A C A G T C T C T T T G C A C C C C C G C C T G A C T C A C T T C C T T T G T C A T T T C T C T G C A G A A T T C T C C A C T C T G G T G G C T G A A A G C G T G G C C G A G T C A G G A A G C G G A G G C T A C T A A C T T C A G C C T G C T G A A G C A G G C T G G A G A C G T G G A G G A A C C C T G G A C C T a t g g g t c t c a t c a t c a t c a t g g t a t g g c t a g c a t g a c t g g g a c a g c a a t g g g t c g g g a t c t g a c g a c g a t a g g a t c t g c c a c c a t g g t c a c t c a t c a c t g c t g a a g a a g a c a g g t c a c g c a g g c a g a g c t a g g t c g g g t c a g g c t c a c t c g a g a a c g t c t a t a t c a a g g c c g a c a a g c a g a a g a a c g g c a t c a a g g c g a a c t c a a g a t c c c c c a a c a t c g a g g a c g c g g c g t g c a g c t c g c c t a c c a c t a c c a c g a c a a c a c c c c a t c g c g a c g g c c c c g t c t g c t g c c c g a c a a c c a c t a c t g a c g c t g c a g t c c a a a c t t c g a a a g a c c c c a a c g a a g a c g c g a t c a c a t g g t c c t g c t g g a g t t c g t g a c c g c c g c c g g g a t c a c t c t c g c a f g g a c g a g c t g t a c a a g g g c g g t a c c g g a g g g a g c a t g g t g a g c a a g g g c g a g g g a c t g t c a c c g g g t g g t g c c c a t c t g t c g a g g c t g g a c g g c g a c g t a a a c g g c c a c a a g t t c a g g t g t c e c g g g a g g g t g a g g g c g a t g c c a c c t a c g g c a a g g c t g a c c c t g a a g t t c a t c t g c a c c a c c g g c a a g t c g c c c t g c c c t g c a c c c t g a c c t a c g g c t g c a g t g c t t c a g c c c g c t a c c c c g a c c a c a t g a a g c a g c a c g a c t c t c a a g t c c g c c a t g c c c g a a g g c t a c a t c c a g g a g c g c a c c a t c t c t c a a g g a c g c a c g c a a c t a c a a g a c c c g c c c g a g g t g a a g t t c g a g g g c g a c a c c t g g t g a a c c g c a t c g a g g c t g a a g g g a c t c a g g a c g g c a a c a t c t c g g g c a c a a g c t g g a g t a c a a c c t g c c g g a c c a c t g a c t g a a g a g c a g a t c g c a g a a t t a a g a g g a a t t c c c t a t t g a a g g a c g g g g a t g g g a c a a t a a c a a c c a a g g a g g c t g g g g a c g g t g a t g c g g g t c t g g g g c a g a a c c c c a c a g a a g c a g a g c t g a c g g a c a t g a t g a a g t a g t g c c g a c g g t g a c g g c a c a a t c g a c t c c c t g a g g t t c c t g a c a a t g a t g c a a g a a a a a t a a a t a c a g g g a c a g c g a a g g a a a a t t a g a a g a a g c t t c e g t t e f t t o a a a g g a t 	1

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

【表 1 - 3】

【表 1 - 4】

【表 1 - 5】

【表 1 - 6】

【表 1 - 7】

【表 1 - 8】

【表 1 - 9】

【表 1 - 10】

	<p>AGACAACCCCCTTGGGGTCAGGGAGGGAGAGGAAGGCCAGCCA CTGCTGTCACACCTCTGCCTCTTCTCTAGAGCTCCAGAA CTGCAGCATCATGAACTGGGACCTGCCAGGCAGGGCTGGGGCA GAGGCCACCTGCTCCCCCTCACACATGCCACCTCCTGTCTGCC TTAGGAGAGCAGGCCTGAAGCAAAGAAAAATTATCCCTGCC TGGTTTTTTTTCTTTCTAGAGAAGTTATTTCTACAGTGGTT TATACTGAAGGAAAAACTCAAGCaaaaaaaaaaaaaTCTTATCTCAATC CTAAGTCCTCCCTTCTTCTGTATCTGCCTTAAACCAAAGG GCTTCTCTAGGAGCCCAGGGAAAGGACTGCTTTATAGAGCTAG ATTTTGCTGCTGCCCTGGCTTACCCCATCCCAGGACCCGTG ACAATGGCTGCTGAGAGGCAGGCATGGAGTTCTCTCACAGCCTC CTCCAACAGCTGGCCACTGCCACGCCAGCTGCAGAGAAATGGGGC GCAGAGAGGATGACTGAGAAGGTCAAGCCCCCGGCACTACA CGAGGCCAGGGCTCTGCCCTTACCTCTTCTGCCCTTCCC TAGCCTGGGGCAGTGGATTCCAGAGGCAATCTGCCGTGCTGC TTTTCTATATTAGACAAGAGATGGGAATGACGGGGAGG AGAAGGAAAGATCAGTTGAGCCTACCTTCCAGCTCTGAGCC TGGTGGCTCTGTCTCAATGATGGAGGGCAATGTCAAGTGGGATAC AGGGAAGAGTGGGGGACGAAGGCTCCAGAGATGGGGAGAACCTG CTGGGGCTGGTAGAAGTCTAGAGGTGCGGCCATTGGTGGCTACAG CAAACACTAAGGAACCTTCAACCCATTCCATCTGCACCTCTGCT CTCCCCTCAAATCAATACACTAGTTGTTCCATCCCAGATGCTGTG GTGCTCTTGTGGTGTGATGTTGTTTCAAGGGCAGACACATG CACACAGAGGTGCCACACATTCACTATATTCACCTACCCAGCTAT AAAGGTGTATGAGGGAGACTCTAGAAAGGTCAAGTGTGG GGTGAGCGAGGGGTGCTCTTCAATCCATCCATCCAGCAGC TAAAAGGGGCAAGCAATCCACATGTCATCAGACACAGGAGCACA GAGAGACGGAGGGTAGAGTAGGGGAGAAGTGGGCCGGCCAA CTGGGGTAACCTTGTAGTCTCTCAGTGGGGTAATCAGCATCAT GATGTTGTTACACATCATGATGTCGATTATAAGAATGCCGCC CACTCTAGTGATCTGAGTTAATAATTCAAGAGAACTCGTCAAGA AGGCATAGAAGCGATCGCTCGAATCGGAGCGGATACCG TAAAGCACGAGGAAGCGGTCAAGCCATTGCCCGCAAGCTTCA CAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGCC ACCCAGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTC ACCATGATATTGGCAAGCAGGCATGCCATTGGTCACGACGAGAT CCTCGCCGTGGCATGTCGCTTGGCAGCTGGCAACAGTTC TGGCGCAGCCCTGATGCTCTCGTCCAGATCATCTGATCGACA AGACCGGCTTCCATCCGAGTAGCTGCTCGTCAAGCGATGTTG CTTGGTGGTCAATGGCAGGTAGCCGATCAAGCGTATGCG CCGCATTGATCAGGCATGATGGATACTTCTCGCAGGAGCAAGG TGTAGATGACATGGAGATCTGCCCCGGCACTCGCCAAATAGCAG CCAGTCCCTCCCGCTCAGTGACAAACGTCGAGCAGCTGCGCAA GGAACGGCCCGTGGCCAGGCAAGGATAGCGGCC GCAGTTCATCGGGCAGGGACAGGTGGCTTGA CAGGAGGAAACAGCGGCC CGGGCGCCCTGCGCTGACAGCGGAACACGGCGCATCAGAGCA GCGGATTGTCGTTGCCCCAGTCAGCGAATAGCG ACCATCTGCTCC AAGCGGCCGGAGAACCTGCGTCAATCCATCTGTC AACCGATCCTCATCCTGCTCTTGTATCAGAGCTGATCC ATCAGATCCTGGCGGGAGAAAGCCATCCAGTTACTTGCAGGG CTTCCCAACCTTACAGAGGGCGCCCAAGCTGGCAATTCC CTTGCTGTC CACTGCAAGCTACCTGCTTCTCTTGC AGATAGCCCAGTAGCTGACATTCA CGGACTGGCTTCTACGTGCTCGAGGggGgg GGCTGTTTGGCGGATGAGAGAAGATTT AATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATA AAAACAGAATTTGCC TGGCG 10 20 30 40 </p>
--	--

【表 1 - 11】

	GCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCATGCCGAACTCAGAAGT GAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGTCTCCCATGCGAGA GTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAA AGACTGGGCCTTCGTTTATCTTGTGTTGTCGGTGAACGCTCTCC TGAGTAGGACAAATCCGCCGGAGCGGATTGAACGTCGAGCAGC AACGGCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCATAAACTGCCA GGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCTTTG GTTCTACAAACTCTTTGTTATTTCTAAATACATTCAAATATGT ATCCGCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTCGTTCCACTGA GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTCTGAGATCCTT TTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAAACAAAAACCCACCGCT ACCAGCGGTGGTTGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTC CGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGCTC TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACACTCAAGAACCTGTAGCA CCGCTACATACCTCGCTGCTAACTCTGTTACCACTGGCTGCTGC CAGTGGCGATAAGCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAG TTACCGGATAAGGCGCAGCGTCGGCTGAACGGGGGTTCGTGC ACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGGCCACGCTTCCGAAGGGAGA AAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAG CGCACGAGGGAGCTTCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTATAGTC CTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTGTGATGC TCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACCGCGGC TTTTACGGTTCCCTGGCTTTGCTGGCTTTGCTCACATGTTCTT CCTGCGTTATCCCTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTGA GTGAGCTGATAACCGCTGCCGAGCCGACCGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTC CTTACGCATCTGTGCGTATTCACACCGCATATGGTCACTCTCAG TACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAACCGCATACACTCCGCT ATCGCTACGTGACTGGGTATGGCTCGCCCCGACACCCGCCAAC CCCGCTGACGCCCTGACGGCTGTCTGCTCCGGCATCCGCTTA CAGACAAGCTGTGACCGTCTCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGTT TCACCGTCATACCGAACCGCGAGGCAGCAGATCAATTGCGCG CGAAGGCGAACCGCATGCATAATGTGCTGTCAAATGGACGAAG CAGGGATTCTGCAAACCCATGCTACTCCGTCAAGCCGTCATTGT CTGATTCTGTTACCAATTATGACAACCTGACGGCTACATCATTCACTT TTTCTTCACAAACGGCACCGAACCTGCTGGCTGGCCCCGGTGCA TTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATGTCAAACCAACA TTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCATCCGGTGGTGCTAAAGACGCT AATCCCTAACTGCTGGCGAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGA CAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGAT		10
pMC-mOct4-SAT1	ACATTACCCGTATCCCTAGATGACATTACCCGTATCCAGATG ACATTACCCGTATCCCTAGATGACATTACCCGTATCCCTAGAT GACATTACCCGTATCCCTAGATGACATTACCCGTATCCAGA TGACATTACCCGTATCCCTAGATACATTACCCGTATCCAGAT GACATTACCCGTATCCCTAGATGACATTACCCGTATCCAGATG ACATTACCCGTATCCCTAGATACATTACCCGTATCCAGATGA CATACCCGTATCCCTAGATGACATTACCCGTATCCAGATGAC ATTACCCGTATCCCTAGATACATTACCCGTATCCAGATGACA TACCCGTATCCCTAGATGACATTACCCGTATCCAGATGACAT TACCCGTATCCCTAGATACATTACCCGTATCCAGATGACATA CCCTGTTATCCCTAGATGACATTACCCGTATCCAGATGACATTA CCCTGTTATCCCTAGATACATTACCCGTATCCAGATGACATACC CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCGTATCCAGATGACATTACC CTGTTATCCCTAGATACATTACCCGTATCCAGATGACATACCC GTTATCCCTAGATGACATTACCCGTATCCAGATAAACTCAATGA	6	30
			40

【表 1 - 12】

	<p>TGATGATGATGATGGTCGAGACTCAGCGGCCGCGGTGCCAGGGCGT GCCCTTGGGCTCCCCGGCGCACTATCCAGCACTAGACGGGGTTC TGGCCCCCTTCAGAGCCCCTTCAGTAACCCCTGGCTCTGGGCCA CATCCAGTCATGCTCCCTAGCACAATCCCTAGCGGTTGTTCTT CAGTCCCCTACAGCAGATCACTCACATGCCAATCAGCTTGGGCTAGA GAAGGATGTGAGTCCAAGATCCTGCCCTGTGGTACCTGGATGTT CCCTGTTCCCATCcccccacccccccccccccccccACCGCCGCCACCGCTG ACTGCAGCATTCCAGAGCTATGATCTGATGTCATCTGTGCCCA TCCTAGGTGGTCGAGTATGGTCTGTAACCGGCCAGAAGGGCA AAAGATCAAGTATTGAGTATTCCAACGAGAAGAGTATGAGGCTAC AGGGACACCTTCCCAGGGGGCTGTATCCTTCTGCCCA GGTCCCCACTTGGCACCCAGGCTATGGAAGCCCCACTTCACCA CACTCTACTCAGTCCCTTCTGAGGGCGAGGCCTTCCCTCTGTT CCCGTCACTGCTCTGGCTCTCCATGCATTCAACCCtgcgcgtcaatgtat ccgtatgtgcggattatgcggtagcaaggcgaggaggatacatggccatcatcaaggagttcatgc gettcaagggtgcacatggagggtcgtaacggccacgagttcgagatcgaggcgaggcgaggcg ccctacgaggcaccagccagccaaatgtcaagggtgaccaagggtgcggccctgcgcctggacatc ctgtccctcagttcatgcggcattacgtcaaggctacgtgaagcaccgcgcacatccgactactgt tccttccccagggttcataatggagcgcgtagatgcacttcgaggacggcgccgtgtgaccgtgacccag gactctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtaagctgcggccaccaacttccctccgacggcc ccgtaatgcagaagaagaccatgggctggaggccctcccgagggatgtaccccgaggacggcgecc aaggcgagatcaagcagaggctgaaggacggcgccactacgacgtgaggtaagaccaccta caaggccaagaagccgtgcacgtgcggccctacaacgtcaacatcaaggtaatggacatcacccacaa cgaggactacaccatgttgcacagtacgaacggcgaggccgcacccacccggcgcatggacag ctgtacaaatgAGGCACCAGCCCTCCCTGGGATGCTGTGAGGCCAAGGC AAGGGAGGTAGACAAGAGAACCTGGAGCTTGGGTTAAATTCTT TACTGAGGAGGATAAAAGCACACAAGGGGTGGGGGTGGGATG GGGAAAGAAGCTCAGTGAATGCTGATCAGGAGCCTGCCCTGTCT GTCACTCATCATTTGTTCTAAATAAAGACTGGGACACACAGTAG ATAGCTGAATTITGTTCTTCAGTTCTAGAGAGCCTGCCGTGG AGAAAAGCCAGTAATGGATTCTCAAACCCAGGTGATCTCAAACA GGGCCATTGAAACCATTGGAGTCCACAAATGCCAGGGATAGT TGGGTTGGAGCCAACCTATAGAGGAAGGCATTGCAATTGCCA TGGGCCGCCAACACTGGGTAACCTTGAGTTCTCAGTTGGG GTAATCAGCATCATGATGTTGACCATCATGATGCTGATTATAA GAATGCGGCCAACACTCTAGTGGATCTCGAGTTAATAATTAGA AGAACTCGTAAGAAGGCATAGAAGGCATGCGCTCGAATCGG GAGCGCGATACCGTAAGCACGAGGAAGCGGTAGCCACGCTATGTCCTG CGCCAAGCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTG ATAGCGGCCATTCCACACCCAGCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAA AACCGGCCATTCCACCATGATATTCCGCAAGCAGGCATGCCAT GGGTACGACGAGATCCTCGCGTGGGATGCTCGCTTGAGCCT GGGCAACAGTTGGCTGGCGAGGGCTGATGCTTCTGTCAGA TCATCCTGATCGACAAGACGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCT CGATGCGATTTGCTGGTGGTCAATGGCAGGTAGCCGGATC AACCGTATGCAAGCCGCCATTGCAATGCCATGATGGATACTTTC TCGCAGGAGCAAGGTGAGATGACATGGAGATCCTGCCCGGCA CTTGCCAATAGCAGCAGTCCCTCCGCTTCACTGACAACGTC GAGCACAGCTCGCAAGGAACGCCGTCGTGCCAGCCACGATAG CCGCGCTGCCCTCGTCTGCAAGTCATTCAAGGGCACGGACAGGTG GTCTTGACAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAA ACGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGCTGTTGCCCCAGTCATAGC CGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAATCC </p>
	10
	20
	30
	40

【表 1 - 13】

	<p>ATCTTGTCAATCATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCTTTGATCAG AGCTTGTATCCCCTGCGCCATCAGATCCTTGGCGCGAGAAAGCCAT CCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCAAACCTTACCGAGGGCGCCCCA GCTGGCAATTCCGGTTCGCTTGTGTCATAAAACCGCCAGTCTA GCTATGCCATGTAAGCCACTGCAAGCTACCTGCTTCTTGTGCG CTTGCGTTTCCCTTGTCCAGATAGCCAGTAGCTGACATTATCCG GGGTCAGCACCGTTCTCGGACTGGCTTCTACGTGCTCGAGgggG gccAAACGGTCTCCAGCTGGCTTGGCGATGAGAGAAGATT TCAGCCTGATAACAGATTAACAGAACGCAAGAGCGGCTGTGATAAA ACAGAATTGCGCTGGCGCAGTAGCGCGTGGTCCCACCTGACCCC ATGCCGAACTCAGAAGTGAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTG GGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGAAACTGCCAGGCATCAAATAAA ACGAAAGGCTCAGTCAAGAAAGACTGGCCTTTCGTTTATCTGTTGTT TGTGCGTGAACGCTCTCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGA TTGAACGTTGCGAAGCAACGCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACG CCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAGCAGAACGGCATCTG ACGATGGCCTTTCGCTTCTACAAACTCTTGTGTTATTTCTA AATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGACCAAATCCCTAACGT GAGTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAG GATCTCTTGAGATCTTTCTCGCGTAATCTGCTGCTGCAA ACAAAAAAAACCCCGCTACAGCGGTGGTTTGTGCGGATCAAG AGCTACCAACTCTTCTCGAAGGTAACTGGCTTCAAGCAGAGCGCA GATACCAAATACTGCTTCTAGTGTAGCGTAGTTAGGCCACCAC TTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTGTAATCCT GTTACCAACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGG TTGACTCAAGACGATAAGTACCGGATAAGGCCAGCGGTGGCT GAAACGGGGGTTCTGCAACACAGCCAGCTGGAGCGAACGACCT ACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTAGCTATGAGAAAGCGCA CGCTTCCCAGGGAGAAAGCGGAGCAGGTATCCGTAAGCGGCA GGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTCCAGGGGGAAACG CCTGGTATTTAGTCTGCTGCGTACAGGGTTCTGCCACCTCTGACTTGA CGTCGATTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGAGCCTATGGAAA ACGCCAGCAACCGGCCCTTACGGTTCTGCCCTTGTGCGCT TTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTTGATAAC CGTATTACCGCCCTTGACTGAGCTGATAACCGCTCGCCGAGCCGAA CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCC TGATGCGGTATTTCTCTTACGCATCTGTCGCGTATTCACACC ATATGGTGCACCTCAGTACAATCTGCTGATGCCGATAGTTAA GCCAGTATAACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTGATGGCTGCG CCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCCCTGACGGCTTGT TGCTCCGGCATCGCTTACAGACAAGCTGACCGTCTCCGGGAG CTGATGTGTCAGAGGTTTACCGTCATCACGAAACGCCGAGG CAGCAGATAATTGCGCGAAGCGGAAGCGGATGCGATAATGT GCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCCCTATGCTACT CCGCTCAAGCCGTCATTGCTGATTGCTTACCAATTATGACAACCTG ACGGCTACATCATTCACTTTCTTACAACCCGCCAGGAACCTGCT CGGGCTGGCCCGGTGCAATTAAATACCCCGAGAAATAGAGT TGATCGTCAAAACCAACATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCATCC GGGTGGTGCTAAAGCAGCTTCGCCCTGGCTGATACGTTGGCTCTC GCGCCAGCTTAAGACGCTAATCCCTAATGCTGGCGAAAAGATGT GACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGCGACGCTGGCG AT</p>	
pMC-mTubb3- LIKIGFP	<p>ACATTACCTGTTATCCCTAGATGACATTACCTGTTATCCAGATG ACATTACCTGTTATCCCTAGATGACATTACCTGTTATCCCTAGAT GACATTACCTGTTATCCCTAGATGACATTACCTGTTATCCAGA TGACATTACCTGTTATCCCTAGATACATTACCTGTTATCCAGAT GACATACCTGTTATCCCTAGATGACATTACCTGTTATCCAGATG</p>	7

10

20

30

40

50

【表 1 - 14】

	<p>ACATTACCTGTTATCCCTAGATACATTACCCCTGTTATCCCAGATGA CATAACCTGTTATCCCTAGATGACATTACCCCTGTTATCCCAGATGAC ATTACCCCTGTTATCCCTAGATACATTACCCCTGTTATCCCAGATGACA TACCCCTGTTATCCCTAGATGACATTACCCCTGTTATCCCAGATGACAT TACCCCTGTTATCCCTAGATACATTACCCCTGTTATCCCAGATGACATA CCTGTTATCCCTAGATGACATTACCCCTGTTATCCCAGATGACATTA CCTGTTATCCCTAGATACATTACCCCTGTTATCCCAGATGACATACC CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCCTGTTATCCCAGATGACATTACC CTGTTATCCCTAGATACATTACCCCTGTTATCCCAGATGACATACCCCT GTTATCCCTAGATGACATTACCCCTGTTATCCCAGATAAACTCAATGA TGATGATGATGATGGTCGAGACTCAGCGCCGCGGTGCCAGGGCGT GCCCTTGGGCTCCCCGGCGCGACCCCTGGATAAATAGTCAGCCTT CGCCCAGGTCTTATCCCAGATCCCATTCCTGTTAGAGGTCTCTGCA AGCAGGGACCCCCCTGCACTCAACAGTGTGCCCAGGGTGGAAATGA GATGTTATGCACTGAGACATTATAGAATAACAAGGAAACCAACT TTCTCTAGAGGAGAGAGCGGTTGCAGGTCTAGAGGTCTCTGCA CTGTAACACCCCGACCTTACCTTACCTGCTCTCTCATA GGTCAAGAGTGGTCTGGCAACAACACTGGCCAAGGGCACTATACG GAGGGCGCGAGCTGGACTCAGTCTAGATGTCGTGCGGAAA GAGTGTGAGAATTGTACTGCCTGAGGGCTTCCAGCTGACACACT CACTGGGTGGGGGACAGGCTCAGGCATGGGACACTGCTCATCAG CAAGGTGCGTGGAGGAGTACCCGACCGCATCATGAACACCTTCAGC GTGGTGCCTTCACCCAAAGTGTGGACACTGTGGTGGAGCCCTACA ACGCCACCCCTGTCATCCACCAGCTAGTGGAGAACACAGACGAGAC CTACTGCATCGACAATGAAGCCCTACGACATCTGCTTCCGCACC CTCAAGCTGGCACACCCACCTATGGGACCTCAACCACCTGTGT CTGCCACCATGAGTGGAGTCACCACCTCCCTGATTCCTGGTCAG CTCATGCCGACCTCCGCAAGCTGGCTGTGAACATGGTGCCTTCC CACGTCTCCACTTCTTCATGCCCGGCTCGCCCCACTTACAGCCCG GGCAGCCAGCAGTACCGTGCCTGACGGTGCCTGAGCTCACGCGAC AGATGTTCGATGCCAAGAACATGATGGTGCCTGTGACCCGGCCA CGGTCGCTACCTGACCGTGGCACTGTCTTCCGTGGCGCATGTCTA TGAAGGAGGTGGACGAGCAGATGCTGGCCATCCAGAGTAAGAAC GCAGCTACTTCGTGGAGTGGATCCCCAACAACGTCAAGGTAGCCGT GTGTGACATCCCACCCCGTGGCTCAAATGTCATCCACCTTCATTG GCAACAGCACGGCCATCAGGAGCTGTTCAAACGCATCTGGAGCA GTTCACAGCCATGTTCCCGCGCAAGGCCCTCTGCACTGGTACACG GGGGAGGGCATGGATGAGATGGAGTACCGAGTACCAAGGACGCCACTG ATGAATGACCTGGTGTCCAGTACCGAGTACCAAGGACGCCACTG CGGAGGAGGAGGGGAGATGTATGAAGATGATGACGAGGAATCGG AAGCCCAaGGGCCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CTGTTACCGGGGTGGTGCCTCATCTGGTCAGCTGGACGGCGACG TAAACGGCCACAAGTTCAAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATG CCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCCACGGCAA GCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTGTCGACCCCTGACCTACGGC GTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCGACCCATGAAAGCAGCACGACT TCTTCAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCAT CCTCTTCAGGACGACGCAACTACAAGACCCCGCCGAGGTGAA GTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATC GACTTCAAGGAGGAGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTAC AACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGGGCACAAGCAGAAC AACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCAACATCGAGGAC GGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCAACTACCAGCAGAACACCCCCATCG GCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCAACTACCTGAGCACCCCA GTCCGCCCTGAGCAAAGACCCAAACGAGAAGCGCGATCACATGGT CCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGATCACTCTGGCATGGAC GAGCTGTACAAGTAAagtgcgtcgacgtgggtgtggggccaagtggcagggccaaga</p>	
		10
		20
		30
		40

【表 1 - 15】

	<p>caagcagcaatcgccccccagagccatclagctactgacactgcccccaagccttgcctcaccagctcaatgg ggctccaggtaaaatgccttcagttttatggccaccccaactccatgtgagtcacttggctgtccctccccatt ttggccacccctgtatattatgtgttgcatttcgtctgtttatgtgtttttatgtgtttatatttcggggg gagggtataacttaataaaatgttactgtgtcagataccctgtcggatgtggatggagatttttttttttt gccccttt gggagaaatgttagatctaaagggttggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg atttgtcagtaaagccgtcagggttgcaggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg attaaatccactgcagaacccctggaatatctttactcagaaggcagccaccctgttccatgttcc ggtgactcatatccagcatttcctgtctactgaaatgtaaatgtaaatgtaaatgtaaatgtaaatgtaa ccagagacttgcactggagagacggggagggagagaaaaaaacgcaggaaaggctgggacttggcttt gagaaggcttgcggggctagggtgggctaaacgaaataacgagggggggggggggggggggggggg ccggcggcagggcaggggggggggggggggggggggggggggg aacttcagaatgcctgtatccagtcagtcagaaggcttgcggcc ctccctcaggagaactaaaccaagagagacacttttagagatcc gaaagcagaacttgcgttgcggccatgttgcggccatgttgcggcc ctatgttgcggccatgttgcggccatgttgcggccatgttgcggcc GAGTTCTCTCAGTTGGGGTAATCAGCATCATGATGTGGTACCA TCATGATGCTGATTATAAGAATGCGGCCCACTGTGGTACCA TCGAGTTAATAATTCAAGAAACTCGTCAAGAAGGGCGATAGAAGG CGATGCGCTCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAGCACGAGGA AGCGGTTCAGCCCATTGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGT AGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCA CAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTCACCATGATATTG GCAAGCAGGCATGCCATTGGTCACGACGAGATCTCGCGTCGG CATGCTCGCCTTGAGCCTGGCAACAGTTCGGCTGGCGAGCCCC TGATGCTCTCGTCCAGATCATCCTGATGACAAGACCGGCTTCCAT CCGAGTACGTGCTCGATGCGATGTTGCGTTGGTGGTGAAT GGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCGCCGCCGATTGCGATCAG CCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGTAGATGACATGG AGATCCTGGCCGGCACTTCGCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCG CTTCACTGACAACTCGAGCACAGTGCAGGCAAGGAACGCCGTCG GGCAGCCACGATAGCGCGCTGCGCTTGCAGTTCATTCAGG GCACCGGACAGGTGGCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGC GCTGACAGCCGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCAGTGTCTGTT GTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCAAGCGGCCGGAGA ACCTGCGTCAATCCATTTGTCATCATGCGAACGATCCTCATC CTGTCCTGATCAGAGCTTGTACGAGCTTGCAGGGCTTCCAAACCTTAC GGCAGGAAAGCCATCCAGTTACTTGCAGGGCTTCCAAACCTTAC CAGAGGGCGCCCAAGCTGGCAATTCCGGTTCGCTGTCATAA AACCGCCCAGTCTAGCTATGCCATGTAAGCCACTGCAAGCTACC TGCTTCTCTTGCCTGCGTTGCGTTTCCCTTGTCCAGATAGCCCAGTA GCTGACATTCATCCGGGGTCAGCACCGTTCTGCGGACTGGCTTCT ACGTGCCTGAAGGGGAGGAAACGGCTCCAGCTGGCTGTTGGCGG ATGAGAGAAAGATTTCTGGCTGATACAGATTAATCAGAACGCGAGA AGCGGTCTGATAAAACAGAATTGGCTGGCGAGTAGCGCGGGTGG TCCCACTGACCCCCATGCCAATCAGAAGTAAACGCCGTAGCGC CGATGGTAGTGTGGGCTTCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAG GCATCAAATAAAACGAAAGGCTAGTCAGAACAGACTGGGCCCTTCGT TTTATCTGTTGTTGCGGTGAACGCTCTCTGAGTAGGACAAATCC GCCGGGAGCGGATTGACGTTGCGAAGCAACGGCCGGAGGGTG GCGGGCAGGAGCAGCCGCCATAAAACTGCCAGGGCATCAAATTAAGCA GAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTGCGTTCTACAAACTTTT TGTTTATTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGACCAA AATCCCTAACGTGAGTTCGTTCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG AAAAGATCAAAGGATCTCTTGAGATCCTTTTCTGCGCGTAATC TGCTGCTTGCAAACAAAAACACCACCGCTACCAGCGGTGGTTGTT TGCCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTCCGAAGGTAACTGGCTT</p>	
		10
		20
		30
		40

【表 1 - 1 6】

【表 1 - 17】

【表 2 - 1】

表2:置換元配列

名称	配列	配列番号
CjPVCGaMP-SATI (AAV用)	CCTACTGTATCTTTGCTTCATCACTCACTCTGGGTCTCCTGCAGCAGACGCAAGACCCAAAGAAGCACCACCCAGGGTCTCACAGTAA GGTGAACAGTCTCTTGCACCCCCGCCTCTGACTCACTTCCCTTGTCATTTCTCTGCAGAACTCTCCACTCTGGTGGCTGAAAGC(N) _n GA AGCACTGACTGCCCAAGGTCTCCACCTCTGCCCTGAACACCCAA ATCTCAGACCCCTTACCAACCCTCCTGCATTCTGTTCAAGTTGTTA	9

【表 2 - 2】

	TGTATTTTACTCCCCATCCCTGTATCCCTAATGACACCA TTCTCTGGAAAATGCTGAGAAGCAATAAAGGCTGTACAGTCAG ACTCTGCATGCTCAGGAAGACCCAGGCCTGGTCAGGACTGGCTTT CTAGATGCATCTGGAGGGGTGGGGCGGATTCAACAGCTAG AAAAGATGTGATAGGAGGAATGAAAGGAACACCCCTTTTCCA CAActaagactaagcatggactctacagaggtaaccactactcccaaaaaccacccataaggtaggtgat gaaactccattctgaaaaactaagactcgagagggaaagtgagatgtcaagcccaaaaaacagaatttg ttatgttgggttgaatgcaggctgTAGATGGGTAGGtgatCCTACTGTATCTTCTGTCATC	
mLMNA-SAT1 (AAV用)	GCCTAAAGTGTCTAACGATTGTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTATCAACTTGTAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTTTTCTAGACCCAGCTTCTGTACAAAGTTGCGCTTTAA ACCTGAATCTTAGACACTTATGGCCAGGCCACAGGTCTCCCAAGTC CCCACACTTGGTGTCTGGTACAGACAGAGGTACCTTCTGCCC AATGCCAGGAAGCTCAAAGAGCCCACAGCCTAGGTGCCGTCTA AGAAGTCAGTCCCAAACTCGCTGCTCCCTCTGAGCCTGTCTCCCT CCCAGGGTCTCCACTGCAGCGCTGGGGACCCCGCTGAGTACAA CCTGCCTCACGCACCGTGCTGTGCCGGACGTGTGGGAGCCTGCT GACAAGGCTGCCGGTGGAGCGGGAGCCCAGGTGGGGATCCATCT CCTCTGGCTCTGCCTCAGTGTCAAGTCACACTCGAAGCTTCCGC AGTGTGGGGGAGTGGGGTGGCAGCTCAGGGACAACTAGTC ACCCGCTCCTACCTCTGGCAACTCCAGTCCCCGGAGCCAGGTGA GTCATCTCTGCCCTACAGCAGGACACTGCTACTGAGCAGCAGGGC AGGGCAGCCAAGGGAGTGGGGTCCCCCTCTGAGTCCCTTCTG CATCCTGCCCTCTGTCTGAACCCAGACTCGAGGTCAAGGGCAAG GCCAGAGTGTGAGGGTGGGGAGACAACCCCTTGGGTCAAGG GAGGGAGAGGAAGGCCAGCCACTGCTCACACCTCTGCTTCT CTTCTCTTAAAGCTCCAGCAACTGCAGCATATGTAATCTGGGAC CTGCCAGGCCAGGGCTGGGGCAGAGGCCACCTGCTCCCCCTCAC ACATGCCACCTCTGTCTGCTCCTAGGAGAGCAGGCCCTGAAGCCA AAGAAAAATTATCCCTGCCCTTGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGA GAAGTTATTTCTACAGTGGTTTATACTGAAGGAAAAACTCAAGCa aaaaaaaaaaaaaCTTTATCTAATCTAACGCTTCCCTTCTTCTT GTATCTGCCTAAAACCAAAGGGCTCTCTAGGAGGCCAGGGAAAG GACTGCTTTTATAGAGTCTAGATTTTGTCTGCTGCTGCTGGCTTA CCCTCATCCCAGGACCCGTGACAATGGTGCCTGAGAGGCAGGCAT GGAGTTCTCTCACAGCCTCCTCAACAGCTGGCCACTGCCACG CCAGCTCAGAGAAATGGGGCGAGAGAGGATGACTGAGAAGGTC AAAGCCCTCCCGGCACTACACGAGGCCAGGCCCTCTGCTGCC TTACCTTCTCTGCCCTCCCTAGCCTGGGGAGTGGATTCCCAG AGGCAAATCTGCCGTCTGCTTTCTATATTTATTTAGACAAGA GATGGGAATGACGGGAAGGAGAAGGAAGATCAGTTGAGCCTA CCTTCTCCAGCTCTGAGCCTGGGGCTCTGCTCAATGATGGAG GGCAATGTCAAGTGGGATACAGGGAAAGGTGGGGAGGAAGGCTC CCAGAGATGGGGAGAACCTGCTGGGGCTGGTGAGAAGTCTAGAGG TGCCTGCTTGGGCTACAGCAAACACTAAGGAACCCCTCACCCCC ATTTCCATCTGCACCTCTGCTCTCCCTCCAAATCAATACACTAGT TGTTTCCATCCCAGATGCTGTGGTGTCTTGTGGGTGTGATGTG TGTTTCAAGGGCAGACACATGCACACAGAGGTGCCACACATTAC TATATATTCACTACCCAGCTATAAAAGGTGTATGAGGGAGACTTC TAGAAAGGTCAAGCATATGTGGGGTGAAGCGAGGGGTGCTCTTCT CCCTCATCCATCCAGCACCTTAAAGGGCCAGCAATCCACATG TGCATCAGACACAGGAGCACAGAGAGACGGAGGGTAGAGTAGGGG CCAGAAGTCTGAATCTAGACACTTATGGC	10
mTubb3GFP-SAT1 (AAV用)	CCTGGATAATAGGTCAAGCCTCGCCAGGTCTTATCCAGATCCC CATCCCTGTTCAAGAGCATCTGCAGCAGGGACCCCTGCACTCAAC AGTGTGATGCCAGGGTGAATGAGATGTTATGCAGTGCAGACATT	11

【表 2 - 3】

【表 2 - 4】

	GTCCTGTgggggtggggggAGCGCCTTCTCCTCCGAGCCGGGGAGT GGGAGCCTCCTCCCGAGCCAATATCCTAGACAGTCACTCCTGC GTCCTGCCCTCCTGTCTGAGCCCCAggctggaggcagggcaggctcaggga agggaggcGGGTTGGGCTGGTACGCCACTCACATCTCCCCCTTC TTCTCTCTCTTCTAGAGCCCCAGAACCTGAGCATCATGTAATCTGG GACCTGCCAGGCAGGGGTGGGGTGGAGGCCTCCGCTCCTCCTC ACCTCATGCCACTCCTGCCACTACACCTCAAGGAAAGGGCTTGAA GCCAAAGAAAAAAACTCCTTGGGttttttttttttttttttttt GAAGTTATTTCTACAGTGGTTTATATTGAAGGAAAACACAAGC AAAaaaaaaaGCATCTATCTCAAATTCCCCTCCTTCCCCTGCTT CCAGGAAACTCCACATCTGCCCTAAACCAAAAGAGGGAGCCAAG GGAAAGGATGCTTTACAGAGCCTAGTTCTGCTTTCTGCTGCC CGCCGCCCATCCGGGACCTGTGACATGGTGCCTGAGGGCA GGTGTGGAGTCTCCGCCAGCCTCAAGGGAGGGCTGAGGCC AGCCCTGGGCCGGCCCCATCCACTACACCTGGCTGAGGCTC CTCCGCTGccccgtcccccccccccccccccccccccccccc CCCAGGTACCACTGACTGCTTTCTGATGTTATTAGACAAG AGATGGGAATGAGGTGGAGGTGGAAGGAGGGGGAGAAAAGGTG AGTTTGAGCCTGCCTTCACTTGAgggggggGGGCTCTGCCAGTCAC TGGAGGTGAGGTCAAGTGGGTGAGGAGGGAGAGGGAGGCC TACAGAAAGAGGAGACCTGCTGGGGCCCCACCGCAGAGGAAGA AACTGAGAACGATGGAGGGTGTGCGGCTGTGGGTTGGCGAAC ACTAAGGAGCCCCCTGCCTCGTGTCCATCTGCATCCCTCT CCTCCCCGAATCAAACTACACTAGTTCTATCCCTGGCTGCCGTGG TGCTCTGTTGGTGAACGTCACCGTGTGCTGAGGGGcacacac acgtgtggcacgtgaacacacacacacacacaAAATGTTGCCGGTCACCCGCA TCCGTGACGCCACAGAAAACGGGGG		10
mLMNA-SATI- ドナーのみ (ミニサークル用)	CCTGAATCTTAGACACTTATGCCAGCCACAGGTCTCCCAAGTCCC CATCACTTGGGTCTGGGTACAGACAGAGGTACCTCTGCCA ATGGCCAGGAAGCTCCAAGAGCCCACAGCCTAGGTGCCGTCTAA GAAGTCAGTCCAAAACCTCGCTGTCCCTCCTGAGCTTGTCTCCCTC CCAGGGTCTCCACTGCAGCGCTGGGGACCCGCTGAGTACAAC CTGCCTCACCGTGTGCTGCGGGACGTGTTGGCAGCCTGCTG ACAAGGCTGCCGTGGAGCGGGACCCAGGTGGGNGGATCCATCT CCTCTGGCTCTCTGCTCCAGTGTCAAGTCACACTCGAAGCTTCCGC AGTGTGGGGGGCAGTGGGGTGGCAGCTCGGGGACAACCTAGTC ACCCGCTCCTACCTCTGGCAACTCCAGTCCCCGGAGCCAGGTGA GTCATCTCTGCCCTACAGCAGGACACTGCTACTGAGCAGCAGGGC AGGGCAGCCCAAGGGAGTGGGTCCCCCTCTGAGTCCCTT CATCTGCCCTCTGTCTGAACCCAGACTCGAGGTAGGGCAAG GCCAGAGTGTGAGGGTGGGGAGACAACCCCTTGGGTAGGG GAGGGAGAGGAAGGGCAGCCACTGCTGTCACACCTCTGCCCT CTTCTCTTAAAGCTCCAGACTGAGCATCATGTAATCTGGGAC CTGCCAGGGCAGGGCTGGGGCAGAGGCCACCTGCTCCCCCTCAC ACATGCCACCTCTGTCTGCCCTAGGAGAGCAGGCCCTGAAGCCA AAGAAAATTTATCCCTGCCCTGGGttttttttttttttttttt GAAGITATTCTACAGTGGTTTATACTGAAGGAAAACCTCAAGCa aaaaaaaGCATCTCTTAAACCAAGGGCTCTCTAGGAGCCCAGGGAAAG GACTGCTTTTATAGAGTCTAGATTTTGTCTGCTGCCCTGGCTTA CCCTCATCCCAGGACCTGTGACAATGGTGCCTGAGAGGCAGGCAT GGAGTTCTTCACCAAGCCTCCAAACAGCTGGCCACTGCCACG CCAGCTCAGAGAAATGGGGCGCAGAGAGGATGACTGAGAAGGTC AAGCCCCCTCCCGCACTACACGAGGCCAGGGCTCTGCCCT TTACCTTCTCTGCCCTCCCTAGCCTGGGGCGAGTGGATTCCCAG AGCAGGAAATCTGCCGTGCTTGTCTTCTATATTATTAGACAAGA GATGGGAATGACGGGGAGGAGAAGGAAGATCAGTTGAGCCTA	13	20

【表 2 - 5】

	CCTTTCCCAGCTCTGAGCCTGGTGGCTCTGCTCAATGATGGAG GGCAATGTCAAGTGGGATACAGGGAGAGTGCGGGGACGAAGGCTC CCAGAGATGGGGAGAACCTGCTGGGGCTGGTGAGAAGTCTAGAGG TGCAGCGATTGGTGGCTACAGCAAACACTAAGGAACCCCTCACCC ATTCCCACATCTGCACCTCTGCTCTCCCCTCAAATCAATACACTAGT TGTTTCCATCCCAGATGCTGTGGTGTCTTGTGGGTGTGATGTG TGTTTCAAGGGGAGACACATGCACACAGAGGTGCCACACATTAC TATATATTCACTACCCAGCTATAAAGGTGTATGAGGGAGACTTC TAGAAAGGTCAGCATATGTGGGGTGAGCGAGGGGTGTCTTCCAT CCCTCATCCATCCAGCACCTTAAAGGGGCCAGCAATCCACATG TGCATCAGACACAGGAGCACAGAGAGACGGAGGGTAGAGTAGGGG CCAGAAGTGGGCCCGCCCCACTGGGTAACCTTGGCTCCCCGG GCGGAC		10
mOct4-SAT1 (ミニサークル用)	CCAGCACTAGACGGGGTTCTGGCCCCCTTCCAGAGCCCCTTCACT AACCCCTGGCTCTGGGGCACATCCAGTCATGCTCCCTAGCACA ATCCCTAGCGGTTGTTCTCAGTCCATCTCAAGGTGGGCTGTT GCCAGTCAAATACTAAAGTTGCTTGTGCGCCCCATCTTCCCTG CCCAGATATGCAAATCGAGACCCCTGGTGCAGGGCCGGAAGAGAA AGCGAACTACGATTGAGAACCGTGTGAGGTGGAGTCTGGAGACCA TGTTTCTGAAGTGGCGAACGCCCTCCACAGCAGATCACTCACAT CGCCAATCAGCTGGGCTAGAGAAGGATGTGAGTGCAAGATCTG CCCTGTGGTACCTGGATTTCCCTGTTCCATTcccccccccccccccc ccccccACCGCCGCCACCGCTGACTGCAGCATCCCAGAGCTTATGATC TGATGTCCATCTGTGCCCCATCCTAGGTGGTTCAGTATGGTCTG TAACCGGCGCCAGAACGGGAAAGAGTCAGTATTGAGTATTCCA ACGAGAAGAGTATGAGGCTACAGGGACACCTTCCAGGGGGGC TGTATCCTTCTGTGCCCCAGGTCCCCACTTGGCACCCAGGCT ATGGAAGCCCCCCTTCAACCACACTCACTCAGTCCCTTCTGAG GGCGAGGCCTTCCCTGTTCCCGTCACTGCTCTGGGCTCTCCAT GCATTCAAAC(N) _n TGAGGCACCAGCCCTCCCTGGGATGCTGTGAG CCAAGGCAGGGAGGTAGACAAGAGAACCTGGAGCTTGGGTTA AATTCTTACTGAGGAGGGATTAAGACACAACAGGGGTGGGG GTGGGATGGGAAAGAACGCTCAGTGATGCTGTTGATCAGGAGCCT GGCCTGTCTGCACTCATCACTTGTCTTAAATAAAAGACTGGGACA CACAGTAGATAGCTGAATTGTTCTCAGTCCCTAGAGAGCCT GCGGTTGGAGAACGCCAGTAATGGATTCTAAACCCCAGGTGATCT TCAAAACAGGCGCCATTGAAACCATTGGAGTCCACAAAATGCCA GGGATAGTTGGGTTGGAGCCAAACCTATAGAGGAAGGCATTGCA ATTGCCATGGGCCGCCCCACTGGGTAACCTTGGCTCCCCG GGCGCACTAT	14	20
mTubb3- LIKIGFP (ミニサークル用)	CCTGGATAAAATAGGTCAAGCCTTCGCCAGGTCTTATCCCAGATCCC CATTCCTGTTCAAGAGCATCTGCAGCAGGGACCCCTGCACTCAAC AGTGTGCCAGGGTGGATGAGATGTTATGAGTCAGTGCAGACATTT ATAGAATAACAAGGGAAACCAACTTCTCTAGAGGAGAGCGGGTTG GCAAGTCCTAGAGGTCTGCACTGTAACACCCGACCTTACCTCTT ACCTGCCTTCTCTCATAGGTCAAGAGTGGTGTGCGAACAACT GGGCCAAAGGGCACTATACGGAGGGCGCGAGCTGGTGGACTCAG TCCTAGATGTCGTGCGGAAAGAGTGTGAGAATTGTGACTGCCTGCA GGGCTTCCAGCTGACACACTCACTGGTGGGGCACAGGCTCAGGC ATGGGCACACTGCTCATCGCAAGGTGCGTGAGGAGTACCCGACC GCATCATGAACACCTTCAGCGTGGTGCCTTCACCCAAAGTGTGGA CACTGTGGTGGAGCCCTACAACGCCACCCCTGTCATCCACCAAGCTA GTGGAGAACACAGACGAGACCTACTGCATGACAATGAAGCCCTCT ACGACATCTGCTTCCGACCCCTCAAGCTGCCACACCCACCTATGG GGACCTCAACCACCTTGTGTCTGCCACCATGAGTGGAGTCACCACC TCCCTCGATTCCCTGGTCAGCTCAATGCCACCTCCGCAAGCTGGC TGTGAACATGGTGCCGTTCCCACGTCTCCACTCTTCATGCCGGCT	15	30

【表 2 - 6】

	<p>TCGCCCACTTACAGCCGGGCAGCCAGCAGTACCGTGCCCTGAC GGTGCCTGAGCTACGCAGCAGATGTCGATGCCAAGAACATGATG GCTGCCTGTGACCCGCGCCACGGCTCGTACCTGACCGTGGCCACTG TCTTCCGTGGCGCATGTCTATGAAGGAGGTGGACGAGCAGATGCT GGCCATCCAGAGTAAGAACAGCAGCTACTTCGTGGAGTGGATCCCC AACAAACGTCAAGGTAGCCGTGTGACATCCCACCCGTGGCTCA AAATGTCATCCACCTCATTGGCAACAGCAGCCATCCAGGAGCT GTTCAAACGCATCTGGAGCAGTTACAGCCATGTTCCGGCGCAAG GCCTTCCTGCACTGGTACACGGCGAGGGCATGGATGAGATGGAGT TCACCGAGGCCGAGAGCAACATGAATGACCTGGTGTCCGAGTACCA GCAGTACCAAGGACGCCACTCGGGAGGAGGGAGGGAGATGTATGA AGATGATGACGAGGAATCGGAAGC_(N)AAAGGCCAAG agttgcgc agctgggtgtggggccaagtggcagccaggccaagacaaggcagcatctgtccccccagagecatctg ctactgacactgccccagcttgcctcaccagctcattagggctccaggtaaagtccctcgtatattatggcc accccccactccatgtgagtcacttggctgtctccatattagccacccctctgtatattatgttgccttattcgtctgtt ttatgtttgtttttactgggtgtttatattcgggggaggggtataacttaataaagtactgtctgtc agataccctgcctgtattggagattctttttatctttctgcctcttaaaaaaaaaaaaaagacaaggat gacacggaaagcatgttcatagaaataagggttttttttgcctggaaagagaatgttagatctaaagggtga gaacaattaaaggctgtccattatcccccgtctgacgaagattgtcagtaagcggctcagggtgtatccag ggagtcagggagggaaactagagaagaaagctgcgtgattaaattccactgcagaacccctggaaatctt ttgactcagaaggcagccaccctgttctggcttccacaaaggactcataccageattctctctgtct cactgaaagtcaaatgtaaagcagccatataaagacgctgaaaccagagacttgaactggagagacggggagg ggaagagaaaaaaacgcaggaaaggctggacttggcttggacttggctaccctgagggttaggtggct aacgaaataacgagggggggtgggtggggcggcaaccgcggcagcggcagcgggtggctaggattca accctgtactggctccatgtgccccctagtggtgttccacaacttcagaatgcctgtatccactcagtc aagcttgcgcctccagagaggcttgcctccagcgttctccctccctcaggagaagactaaaccaagag accaactttagagatccacagacttgcgtacagagctgggtgaaagcagaacttctaaacccagacgcctgt gcccactccctttaggtcaagggtgttgcctaaagtttgccctacccttgcctggcacctgaaagaatG GGCCCGCCCCAACTGGGTAACCTTGGCTCCCCGGCGCGAC </p>	
--	--	--

(N)は任意の配列を示すために使用される。

【表 2 - 7】

表2:ガイド配列		
名称	配列	配列番号
pAAV-C _j PVGCaMP-SATI	GATGAAGCAAAAGATA <u>CAGTAGG</u>	16
tGFP	G(or C)AGCTCGACCAGGAT <u>GGGCACGG</u>	17
pAAV-pLMNA-SATI	GTGCACGCCACAGAAA <u>ACGGGG</u>	18
pAAV-mLMNA-SATI	G(or C)CCATAAGTGT <u>CTAAGATTCA</u> <u>GGG</u>	19
pMC-mLMNA-SATI-ドナー	G(or C)CCATAAGTGT <u>CTAAGATTCA</u> <u>GGG</u>	20
pMC-mOct4-SATI	G(or C)CCCAGAAC <u>CCCGTCTAGTG</u> <u>GG</u>	21
pMC-mTubb3-	GAAGGCTGAC <u>CTATT</u> <u>ATCCAGG</u>	22

10

20

30

40

50

【表2-8】

LIKIGFP		
pAAV-mTubb3GFP-SAT1	GAAGGCTGACCTATTTATCC <u>AGG</u>	23

【0173】

ヌクレアーゼ

一部の実施形態では、本明細書の方法および組成物にヌクレアーゼを使用する。標的化配列を認識するヌクレアーゼは当業者には公知であり、それらとして、これだけに限定されないが、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）、クラスター化された規則的な配置の短い回文配列リピート（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）（CRISPR）ヌクレアーゼ、およびメガヌクレアーゼが挙げられる。組成物中に見いだされ、本明細書に開示される方法において有用なヌクレアーゼを以下により詳細に記載する。

10

【0174】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）

「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」または「ZFN」は、Fok Iの切断ドメインと3つまたはそれよりも多くのジンクフィンガーモチーフを含有するDNA認識ドメインの融合物である。DNA内の特定の位置における2つの個々のZFNの的確な配向および間隔でのヘテロ二量体形成により、DNAの二本鎖切断が導かれる。一部の場合では、ZFNは切断ドメインと各ジンクフィンガードメインのC末端が融合している。2つの切断ドメインが二量体を形成し、DNAを切断することを可能にするために、2つの個々のZFNがDNAの対向する鎖にC末端で、ある特定の距離を置いて結合する。一部の場合では、ジンクフィンガードメインと切断ドメインの間のリンカー配列は各結合性部位の5'末端が約5~7bp離れていることを必要とする。本発明において有用である例示的なZFNは、これだけに限定されないが、Urnov et al., *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11: 636-646; Gaj et al., *Nat Methods*, 2012, 9 (8): 805-7; 米国特許第6,534,261号; 同第6,607,882号; 同第6,746,838号; 同第6,794,136号; 同第6,824,978号; 同第6,866,997号; 同第6,933,113号; 同第6,979,539号; 同第7,013,219号; 同第7,030,215号; 同第7,220,719号; 同第7,241,573号; 同第7,241,574号; 同第7,585,849号; 同第7,595,376号; 同第6,903,185号; 同第6,479,626号; および米国特許出願公開第2003/0232410号および同第2009/0203140号に記載されているものを含む。

20

【0175】

一部の実施形態では、ZFNにより、標的DNAに二本鎖切断が生じ、その結果、遺伝子改变の導入を可能にするDNA切断修復がもたらされる。一部の実施形態では、DNA切断修復は、非相同末端結合（NHEJ）または相同組換え修復（HDR）によって起こる。一部の実施形態では、ZFNはジンクフィンガーニッカーゼであり、これは、一部の実施形態では、部位特異的一本鎖DNA切断またはニックを誘導する操作されたZFNである。ジンクフィンガーニッカーゼの説明は、例えば、Ramirez et al., *Nucl Acids Res*, 2012, 40 (12): 5560-8; Kim et al., *Genome Res*, 2012, 22 (7): 1327-33に見いだされる。

30

【0176】

TALEN

「TALEN」または「TALEN-エフェクターヌクレアーゼ」は、DNA結合性タンデムリピートの中心ドメイン、核局在化シグナル、およびC末端転写活性化ドメインを含有

40

50

する操作された転写活性化因子様エフェクタースクレアーゼである。一部の場合では、D N A 結合性タンデムリピートは、33～35アミノ酸長を含み、12位および13位に1つまたは複数の特定のD N A 塩基対を認識する2つの超可変アミノ酸残基を含有する。T A L E Nは、T A L エフェクターD N A 結合性ドメインとD N A 切断ドメインを融合することによって作製される。例えば、T A L E タンパク質を野生型もしくは変異したF o k I エンドスクレアーゼなどのスクレアーゼまたはF o k I の触媒ドメインと融合することができる。T A L E Nに使用するためのF o k I に対するいくつかの変異、例えば、切断特異性または活性を改善するものが作出されている。そのようなT A L E Nは、任意の所望のD N A 配列に結合するように操作される。

【0177】

10

T A L E Nは、多くの場合、標的D N A 配列に二本鎖切断を創出し、今度は二本鎖切断がN H E J またはH D R を受けることによって遺伝子変異を生じさせるために使用される。一部の場合では、H D R を促進するために一本鎖のドナーD N A 修復鑄型を提供する。

【0178】

T A L E Nおよびそれらの遺伝子編集のための使用に関する詳細な説明は、例えば、米国特許第8,440,431号；同第8,440,432号；同第8,450,471号；同第8,586,363号；および同第8,697,853号；Scharenberg et al., Curr Gene Ther, 2013, 13 (4): 291-303；Gaj et al., Nat Methods, 2012, 9 (8): 805-7；Beurdeley et al., Nat Commun, 2013, 4: 1762；およびJoung and Sander, Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14 (1): 49-55に見いだされる。

20

【0179】

D N A によりガイドされるスクレアーゼ

「D N A によりガイドされるスクレアーゼ」は、一本鎖D N A 相補スクレオチドを使用して、別の核酸、例えば、細胞のゲノム内の標的核酸とハイブリダイズすることによってスクレアーゼをゲノムの正確な場所に方向付けるスクレアーゼである。一部の実施形態では、D N A によりガイドされるスクレアーゼは、アルゴノートスクレアーゼを含む。一部の実施形態では、D N A によりガイドされるスクレアーゼは、T t A g o 、P f A g o 、およびN g A g o から選択される。一部の実施形態では、D N A によりガイドされるスクレアーゼはN g A g o である。

【0180】

30

メガスクレアーゼ

「メガスクレアーゼ」は、ある特定の実施形態では高度に特異的であり、少なくとも12塩基対の長さ、例えば、12塩基対から40塩基対まで、または12塩基対から60塩基対までの長さにわたるD N A 標的部位を認識するレアカッティングエンドスクレアーゼまたはホーミングエンドスクレアーゼである。一部の実施形態では、メガスクレアーゼは、エンドスクレアーゼの少なくとも1つの触媒ドメインおよび核酸標的配列を特定する少なくとも1つのD N A 結合性ドメインまたはタンパク質を含む任意の融合タンパク質などのモジュラーD N A 結合性スクレアーゼである。一部の実施形態では、D N A 結合性ドメインは、一本鎖D N A または二本鎖D N A を認識する少なくとも1つのモチーフを含有する。あるいは、メガスクレアーゼは単量体または二量体である。

40

【0181】

一部の場合では、メガスクレアーゼは、天然に存在する（天然に見いだされる）ものまたは野生型のものであり、他の場合では、メガスクレアーゼは、非天然のもの、人工のもの、操作されたもの、合成されたもの、合理的に設計されたもの、または人造のものである。ある特定の実施形態では、本発明のメガスクレアーゼは、I - C r e I メガスクレアーゼ、I - C e u I メガスクレアーゼ、I - M s o I メガスクレアーゼ、I - S c e I メガスクレアーゼ、そのバリエント、その変異体、およびその誘導体を含む。

【0182】

これだけに限定されないが、I - S c e l 、I - S c e l l 、I - S c e I I I 、I - S c e I V 、I - S c e V 、I - S c e V I 、I - S c e V I I 、I - C e u l 、I - C

50

e u A I I P、I - C r e l、I - C r e p s b I P、I - C r e p s b l l P、I - C r e p s b I I I P、I - C r e p s b I V P、I - T l i l、I - P p o l、P I - P s p I、F - S c e l、F - S c e l l、F - S u v l、F - T e v I、F - T e v I I 10、I - A m a l、I - A n i l、I - C h u l、I - C m o e l、I - C p a l、I - C p a I I、I - C s m l、I - C v u l、I - C v u A I P、I - D d i l、I - D d i I I、I - D i r l、I - D m o l、I - H m u l、I - H m u I I、I - H s N I P、I - L l a l、I - M s o l、I - N a a l、I - N a n l、I - N c I I P、I - N g r I P、I - N i t l、I - N j a l、I - N s p 2 3 6 I P、I - P a k l、I - P b o I P、I - P c u I P、I - P c u A I、I - P c u V I、I - P g r l P、I - P o b I P、I - P o r l、I - P o r I I P、I - P b p I P、I - S p B e t a I P、I - S c a l、I - S e x I P、I - S n e I P、I - S p o m l、I - S p o m C P、I - S p o m I P、I - S p o m I I P、I - S q u I P、I - S s p 6 8 0 3 I、I - S t h P h i J P、I - S t h P h i S T 3 P、I - S t h P h i S T e 3 b P、I - T d e I P、I - T e v l、I - T e v I I、I - T e v I I I、I - U a r A P、I - U a r H G P A I P、I - U a r H G P A 1 3 P、I - V i n I P、I - Z b i I P、P I - M t u I、P I - M t u H I P P I - M t u H I I P、P I - P f u I、P I - P f u I I、P I - P k o I、P l - P k o I I、P I - R m a 4 3 8 1 2 I P、P I - S p B e t a I P、P I - S c e I、P I - T f u I、P I - T f u I I、P I - T h y l、P I - T l i l、P I - T l i I I、あるいは任意のその活性なバリエントまたは断片を含めた任意のメガヌクレアーゼが、本明細書で使用されることが意図されている。 20

【0183】

C R I S P R

C R I S P R (クラスター化された規則的な配置の短い回文配列リピート) / C a s (C R I S P R 関連タンパク質) ヌクレアーゼ系は、ゲノムの操作のために使用される細菌系に基づく操作されたヌクレアーゼ系である。C R I S P R / C a s ヌクレアーゼ系は、多くの細菌および古細菌の適応免疫応答に一部に基づく。ウイルスまたはプラスミドが細菌に侵入すると、「免疫」応答によってインベーダーのDNAのセグメントがC R I S P R RNA (c r R N A) に変換される。次いで、c r R N A が t r a c r R N A と称される別の型のRNAと部分的に相補性の領域を通じて会合して、C a s (例えば、C a s 9) ヌクレアーゼを「プロトスペーサー」と称される標的DNA内のc r R N Aと相同な領域にガイドする。C a s (例えば、C a s 9) ヌクレアーゼによりDNAが切断されて、c r R N A 転写物に含有される20ヌクレオチドの相補鎖配列によって特定される部位における二本鎖切断において平滑末端が生じる。一部の実施形態では、C a s (例えば、C a s 9) ヌクレアーゼは、部位特異的DNA認識および切断のためにc r R N Aとt r a c r R N Aの両方を必要とする。この系は、現在操作されており、したがって、ある特定の実施形態では、c r R N Aとt r a c r R N Aを組み合わせて1つの分子(「単一ガイドRNA」または「s g R N A」)にし、単一ガイドRNAのc r R N A等価部分を、C a s (例えば、C a s 9) ヌクレアーゼを任意の所望の配列を標的とするようにガイドするように操作する(例えば、Jinek et al. (2012) Science 337: 816-821; Jinek et al. (2013) eLife 2:e 00471; Segal (2013) eLife 2: e00563を参照されたい)。したがって、C R I S P R / C a s 系を、細胞のゲノム内の所望の標的において二本鎖切断を創出し、細胞の内因性機構を利用して、誘導された切断を相同組換え修復(H D R)または非相同末端結合(N H E J)によって修復するように操作することができる。 30

【0184】

一部の実施形態では、C a s ヌクレアーゼはDNA切断活性を有する。一部の実施形態では、C a s ヌクレアーゼにより、標的DNA配列内の場所における一方の鎖または両方の鎖の切断が方向付けられる。例えば、一部の実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、標的DNA配列の一本鎖を切断する1つまたは複数の不活性触媒ドメインを有するニッカーゼである。 40

10

20

30

40

50

【0185】

Casヌクレアーゼの非限定的な例としては、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (Csn1およびCx12としても公知)、Cas10、Cpf1、C2c3、C2c2およびC2c1、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Cs a5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Cpf1、Csb1、Csb2、Csb3、Cs x17、Cs x14、Cs x10、Cs x16、CasX、Cs x3、Cs x1、Cs x15、Cs f1、Cs f2、Cs f3、Cs f4、そのホログ、そのバリエント、その変異体、およびその誘導体が挙げられる。Casヌクレアーゼには3種の主要な型 (I型、I I型、およびI I I型)、および5種のI型、3種のI I型、および2種のI I I型タンパク質を含む10種の亜型が存在する (例えば、Hochstrasser and Doudna, Trends Biochem Sci, 2015: 40 (1): 58-66を参照されたい)。I I型Casヌクレアーゼは、これだけに限定されないが、Cas1、Cas2、Csn2、およびCas9を含む。これらのCasヌクレアーゼは当業者に公知である。例えば、*Streptococcus pyogenes* 野生型Cas9ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えばNCBI 参照配列番号NP_269215に記載されており、*Streptococcus thermophilus* 野生型Cas9ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えばNCBI 参照配列番号WP_011681470に記載されている。

10

【0186】

一部の実施形態では、Casヌクレアーゼ、例えばCas9ポリペプチドは、これだけに限定されないが、*Veillonella atypical*、*Fusobacterium nucleatum*、*Filifactor alocis*、*Solobacterium moorei*、*Coprococcus catus*、*Treponema denticola*、*Peptoniphilus duerdenii*、*Catenibacterium mitsuokai*、*Streptococcus mutans*、*Listeria innocua*、*Staphylococcus pseudintermedius*、*Acidaminococcus intestine*、*Olsenella ulti*、*Oenococcus kitaharae*、*Bifidobacterium bifidum*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus gasseri*、*Finegoldia magna*、*Mycoplasma mobile*、*Mycoplasma gallisepticum*、*Mycoplasma ovipneumoniae*、*Mycoplasma canis*、*Mycoplasma synoviae*、*Eubacterium rectale*、*Streptococcus thermophilus*、*Eubacterium dolichum*、*Lactobacillus coryniformis* subsp. *Torquensis*、*Ilyobacter polytropus*、*Ruminococcus albus*、*Akkermansia muciniphila*、*Acidothermus cellulolyticus*、*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium dentium*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Elusimicrobium minutum*、*Nitratifactor salsuginis*、*Sphaerochaeta globus*、*Fibrobacter succinogenes* subsp. *Succinogenes*、*Bacteroides fragilis*、*Capnocytophaga ochracea*、*Rhodopseudomonas palustris*、*Prevotella micans*、*Prevotella ruminicola*、*Flavobacterium columnare*、*Aminomonas paucivorans*、*Rhodospirillum rubrum*、*Candidatus Puniceispirillum marinum*、*Verminephrobacter eiseniae*、*Ralstonia syzygii*、*Dinoroseobacter shibae*、*A*

20

30

40

50

zospirillum、*Nitrobacter hamburgensis*、*Bra*
dyrhizobium、*Wolinella succinogenes*、*Campy*
lobacter jejuni subsp. *Jejuni*、*Helicobacter*
mustelae、*Bacillus cereus*、*Acidovorax ebreu*
s、*Clostridium perfringens*、*Parvibaculum la*
vamentivorans、*Roseburia intestinalis*、*Nei*
sseria meningitidis、*Pasteurella multocida*
subsp. *Multocida*、*Sutterella wadsworthensis*
s、*proteobacterium*、*Legionella pneumophila*
、Parasutterella excrementihominis、*Woline*
lla succinogenes、および*Francisella novicida*を
含めた種々の細菌種に由来するものである。

【0187】

「Cas9」は、RNAによりガイドされる二本鎖DNA結合性ヌクレアーゼタンパク質またはニッカーゼタンパク質を指す。野生型Cas9ヌクレアーゼは、異なるDNA鎖をカットする2つの機能性ドメイン、例えばRuvCおよびHNHを有する。Cas9は両方の機能的ドメインが活性な場合にゲノムDNA(標的DNA)における二本鎖切断を誘導し得る。一部の実施形態では、Cas9酵素は、*Corynebacter*、*Sutterella*、*Legionella*、*Treponema*、*Filifactor*、*Eubacterium*、*Streptococcus*、*Lactobacillus*、*Mycoplasma*、*Bacteroides*、*Flavivola*、*Flavobacterium*、*Sphaerochaeta*、*Azospirillum*、*Gluc*
onacetobacter、*Neisseria*、*Roseburia*、*Parvib*
aculum、*Staphylococcus*、*Nitratirfractor*、および
*Campylobacter*からなる群に属する細菌に由来するCas9タンパク質の1つまたは複数の触媒ドメインを含む。一部の実施形態では、Cas9は融合タンパク質であり、例えば、2つの触媒ドメインが異なる細菌種に由来する。

【0188】

Cas9ヌクレアーゼの有用なバリエントとしては、RuvC⁻またはHNH⁻酵素またはニッカーゼなどの単一の不活性触媒ドメインが挙げられる。Cas9ニッカーゼは活性な機能的ドメインを1つのみ有し、一部の実施形態では、標的DNAの一方の鎖のみをカットし、それにより、一本鎖切断またはニックを創出する。一部の実施形態では、少なくともD10A変異を有する変異体Cas9ヌクレアーゼはCas9ニッカーゼである。他の実施形態では、少なくともH840A変異を有する変異体Cas9ヌクレアーゼはCas9ニッカーゼである。Cas9ニッカーゼに存在する変異の他の例としては、限定することなく、N854AおよびN863Aが挙げられる。対向するDNA鎖を標的とする少なくとも2つのDNA標的化RNAを使用した場合、Cas9ニッカーゼを使用して二本鎖切断が導入される。2重ニック形成誘導二本鎖切断がNHEJまたはHDRによって修復される。この遺伝子編集戦略では、HDRが有利であり、オフターゲットDNA部位におけるインデル変異の頻度が減少する。一部の実施形態では、Cas9ヌクレアーゼまたはニッカーゼを標的細胞または標的生物体のためにコドン最適化する。

【0189】

一部の実施形態では、Casヌクレアーゼは、RuvC1およびHNHヌクレアーゼドメインの2つのサイレンシング変異(D10AおよびH840A)を含有するCas9ポリペプチドであり、dCas9と称される。一実施形態では、*Streptococcus pyogenes*由来のdCas9ポリペプチドは、D10位、G12位、G17位、E762位、H840位、N854位、N863位、H982位、H983位、A984位、D986位、A987位、またはこれらの任意の組合せに少なくとも1つの変異を含む。そのようなdCas9ポリペプチドおよびそのバリエントの説明は、例えば、国際特許公開第WO2013/176772号に提示されている。一部の実施形態では、dC

10

20

30

40

50

a s 9 酵素は、D 1 0 、E 7 6 2 、H 9 8 3 、またはD 9 8 6 の変異、ならびにH 8 4 0 またはN 8 6 3 における変異を含有する。一部の場合では、d C a s 9 酵素は、D 1 0 A またはD 1 0 N 変異を含有する。また、d C a s 9 酵素は代替的に変異H 8 4 0 A 、H 8 4 0 Y 、またはH 8 4 0 N を含む。一部の実施形態では、本発明のd C a s 9 酵素は、D 1 0 A およびH 8 4 0 A ；D 1 0 A およびH 8 4 0 Y ；D 1 0 A およびH 8 4 0 N ；D 1 0 N およびH 8 4 0 A ；D 1 0 N およびH 8 4 0 Y ；またはD 1 0 N およびH 8 4 0 N 置換を含む。あるいは、置換は、C a s 9 ポリペプチドを触媒として不活性にし、標的D N A に結合することができるようとする保存的または非保存的置換である。

【 0 1 9 0 】

ゲノム編集方法に関しては、一部の実施形態では、C a s ヌクレアーゼは、d C a s 9 と連結したI I S 型制限酵素F o k I の触媒ドメインを含むポリペプチドなどのC a s 9 融合タンパク質を含む。F o k I - d C a s 9 融合タンパク質(f C a s 9)は、2つのガイドR N A を使用して標的D N A の一本鎖に結合して二本鎖切断を生じさせることができる。

【 0 1 9 1 】

特に他の指示がなければ、本明細書において使用される全ての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。さらに、本明細書に記載の方法または材料と同様または等価の任意の方法または材料を本発明の実施に使用することができる。本発明の目的に関して、以下の用語を定義する。

【 0 1 9 2 】

「1つの(a)」、「1つの(a n)」、または「その(the)」という用語は、本明細書で使用される場合、1つのメンバーを伴う態様を含むだけでなく、1つよりも多くのメンバーを伴う態様も含む。例えば、単数形である「1つの(a)」、「1つの(a n)」、および「その(the)」は、文脈により明確に別段の規定がなされない限り、複数の指示対象を包含する。したがって、例えば、「1つの(a)細胞」への言及は複数のそのような細胞を含み、「その(the)作用物質」への言及は当業者に公知の1つまたは複数の作用物質への言及を含む、などである。

【 0 1 9 3 】

「核酸」、「ヌクレオチド」、または「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖形態、二本鎖形態または多重鎖形態のいずれかのデオキシリボ核酸(D N A)、リボ核酸(R N A)およびそのポリマーを指す。この用語は、これだけに限定されないが、一本鎖、二本鎖もしくは多重鎖D N A もしくはR N A 、ゲノムD N A 、c D N A 、D N A - R N A ハイブリッド、またはプリン塩基および/もしくはピリミジン塩基もしくは他の天然の、化学修飾された、生化学的に改変された、非天然の、合成の、もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーを包含する。一部の実施形態では、核酸は、D N A 、R N A 、およびその類似体の混合物を含み得る。特に限定がない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する天然のヌクレオチドの公知の類似体を含有し、天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で代謝される核酸を包含する。別段の指定のない限り、特定の核酸配列は、保存的に改変されたそのバリエント(例えば、縮重コドン置換)、対立遺伝子、オルソログ、一塩基多型(S N P)、および相補配列ならびに明示的に示されている配列も暗黙のうちに包含する。特に、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された(または全ての)コドンの第3の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによって達成することができる。核酸という用語は、遺伝子、遺伝子によってコードされるc D N A 、およびm R N A と互換的に使用される。

【 0 1 9 4 】

「遺伝子」または「ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列」という用語は、ポリペプチド鎖の产生に関するD N A のセグメントを意味する。D N A セグメントは、遺伝子産物の転写/翻訳および転写/翻訳の調節に関するコード領域の前後の領域(リーダーおよびトレーラー)、ならびに個々のコードセグメント(エクソン)の間の介在配列(インtron)を含み得る。

10

20

30

40

50

【0195】

「被験体」、「患者」および「個体」という用語は、本明細書では互換的に使用され、ヒトまたは動物を含む。例えば、動物被験体は、哺乳動物、靈長類（例えば、サル）、家畜動物（例えば、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、またはヤギ）、伴侶動物（例えば、イヌ、ネコ）、実験動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、鳥類）、獣医学的に意義のある動物、または経済的に意義のある動物であり得る。

【0196】

本明細書で使用される場合、「投与すること」という用語は、被験体への経口投与、局部接触、坐薬としての投与、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、病巣内投与、髄腔内投与、鼻腔内、または皮下投与を含む。投与は、非経口および経粘膜（例えば、頬側、舌下、口蓋、歯肉、鼻、脣、直腸、または経皮）を含めた任意の経路によるものである。非経口投与としては、例えば、静脈内、筋肉内、小動脈内（*intra-arteriole*）、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、および頭蓋内が挙げられる。他の送達方式としては、これだけに限定されないが、リポソーム製剤の使用、静脈内注入、経皮パッチなどが挙げられる。

10

【0197】

「処置すること」という用語は、これだけに限定されないが、治療的利益および／または予防的利益を含めた有益なまたは所望の結果を得るための手法を指す。治療的利益は、処置下にある1つまたは複数の疾患、状態、または症状のあらゆる治療的に関連性のある改善またはそれに対する効果を意味する。予防的利益に関しては、特定の疾患、状態、もしくは症状が発生するリスクがある被験体、または、疾患、状態、もしくは症状がまだ顕在化していない可能性があるにもかかわらず疾患の生理的症状の1つまたは複数が報告されている被験体に組成物を投与することができる。

20

【0198】

「有効量」または「十分な量」という用語は、有益なまたは所望の結果をもたらすために十分な作用物質（例えば、DNAヌクレアーゼなど）の量を指す。治療有効量は、処置される被験体および疾患状態、被験体の体重および年齢、疾患状態の重症度、投与の様式などのうちの1つまたは複数に応じて変動し得、これは当業者が容易に決定することができる。特定の量は、選択される特定の作用物質、標的細胞型、被験体内の標的細胞の場所、従う投薬レジメン、他の化合物と組み合わせて投与するかどうか、投与のタイミング、および運ばれる物理的送達系のうちの1つまたは複数に応じて変動し得る。

30

【0199】

「薬学的に許容される担体」という用語は、作用物質（例えば、DNAヌクレアーゼなど）の細胞、生物体、または被験体への投与を助ける物質を指す。「薬学的に許容される担体」は、組成物または製剤に含めることができ、患者に対する著しい有害な毒物学的影響を引き起こさない担体または賦形剤を指す。薬学的に許容される担体の非限定的な例としては、水、NaCl、通常の生理食塩溶液、乳酸加リンゲル、通常のスクロース、通常のグルコース、結合剤、充填剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング、甘味剤、矯味矯臭剤および着色剤などが挙げられる。他の医薬担体も本発明において有用であることが当業者には理解されよう。

【0200】

「約」という用語は、参照数値との関連では、その値のプラスまたはマイナス10%の値の範囲を含み得る。例えば、「約10」という量は、参照数9、10、および11を含めて9から11までの量を含む。「約」という用語は、参照数値との関連では、その値のプラスまたはマイナス10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%の値の範囲も含み得る。

40

【0201】

図1A～1Hは、非分裂性初代ニューロンにおける单一相同アームドナー媒介性遺伝子ノックインを示す。

【0202】

図1Aは、イントロン3における標的化のための单一相同アームを有するSATI（細

50

胞間直線化单一相同アームドナー媒介性イントロン標的化組込み)ドナーによるT u b b 3遺伝子座における標的化G F Pノックインの略図を示す。淡紅色の五角形はイントロン3 g R N A 標的配列である。g R N A 標的配列内の黄色のはさみまたは黒い線はC a s 9切断部位である。淡青色の台形は標的とドナーの相同配列である。

【0203】

図1Bは、エクソン4を標的とする非相同性H I T I ドナーによるT u b b 3遺伝子座における標的化G F Pノックインの略図を示す。淡青色の五角形はエクソン4 g R N A 標的配列である。五角形内の黒い線はC a s 9切断部位である。

【0204】

図1Cは、エクソン4を標的とする2つの相同アームを有する従来のH D R ドナーによるT u b b 3遺伝子座における標的化G F Pノックインの略図を示す。淡青色の五角形はエクソン4 g R N A 標的配列である。淡青色の平行四辺形は標的とドナーの相同配列である。

【0205】

図1Dは、イントロン3を標的とする2つの相同アームを有するH M E J ドナーによるT u b b 3遺伝子座における標的化G F Pノックインの略図を示す。望ましくない組換えを回避するために、赤色の棒(ラットT u b b 3遺伝子由来のスプライシングアクセプターおよび下流の配列)ならびに挿入されるカセット(すなわち、エクソン4、G F Pおよび3' U T R)はいかなる相同配列も有さない。淡紅色の五角形はイントロン3 g R N A 標的配列である。淡青色の平行四辺形は標的とドナーの相同配列である。

【0206】

図1Eは、培養された初代ニューロンにおけるG F Pノックインの実験スキームを示す。

【0207】

図1Fは、抗-I I I チューブリン抗体(赤紫色)、b m C h e r r yシグナル(赤色)、抗G F P抗体(緑色)、D A P Iシグナル(青色)およびE d Uシグナル(白色)によって検出された、C a s 9、1アームS A T I ドナーおよびi n t 3 g R N A - m C h e r r yをトランスフェクトしたニューロンの代表的な免疫蛍光画像を示す。スケールバー: 10 μm。

【0208】

図1Gは、g R N Aとドナーの異なる組合せを用いてトランスフェクトされた細胞(m C h e r r y+)当たりのノックイン細胞(G F P+)のパーセンテージを示す。各値は、トランスフェクトされた細胞の中のG F P陽性細胞のパーセンテージを示す。データはひげを有する四角として表されており、全ての入力データポイントが緑色のドットとして、平均が四角の中の線として表されている。分析はボンフェローニの多重比較検定を伴う一元配置ANOVA、****P < 0.0001。

【0209】

図1Hは、1アームS A T I ドナーを初代ニューロンにトランスフェクトした後のH I T I 媒介性G F Pノックインとo a H D R 媒介性G F Pノックインの比を示す。以下のドナーとg R N Aの組合せをトランスフェクトした(ドナーカット: M C - T u b b 3 i n t 3 - スクランブルおよびm S c r a m b l e g R N A - m C h e r r y; 染色体カット: M C - T u b b 3 i n t 3 - スクランブルおよびi n t 3 g R N A - m C h e r r y; ドナー+染色体カット(S A T I): M C - T u b b 3 i n t 3 - S A T I およびi n t 3 g R N A - m C h e r r y)。分析数が上部に示されている。

【0210】

図2A~2Gは、i n v i t r o およびi n v i v o における早老症マウスのS A T I 媒介性遺伝子補正後のo a H D R またはH I T I 媒介性遺伝子ノックインプロファイルを示す。

【0211】

図2Aは、S A T I 媒介性遺伝子補正ドナーを用いたL m n a G 6 0 9 G (c. 1 8 2 7 C > T)遺伝子補正の略図を示す。赤色の四角は单一の点変異体を伴うエクソン11を示

10

20

30

40

50

す。NHEJ 媒介性 HITI によって媒介される遺伝子補正後、補正された変異を含む標的化配列がインtron 10、変異したエクソン 11 の直前に挿入される（左側）。oa HDR によって媒介される遺伝子補正後、点変異以外は、別のゲノム配列の変化を伴わずに変異が補正される（右側）。エクソン 1 ~ 10 から転写されるラミン C の発現レベルは Lmna c . 1827C > T 変異の影響を受けない。遺伝子補正後、プロジェリン発現の代わりにラミン A タンパク質が発現される。淡紅色の五角形は Lmna イントロン 10 gRNA 標的配列である。gRNA 標的配列内の黄色のさみまたは黒い線は Cas9 切断部位である（図 12A を参照されたい）。

【0212】

図 2B は、早老症 MEF（上のパネル、n = 48）、初代ニューロン（中央のパネル、n = 47）、および脳（下のパネル、n = 19）からの SATI 媒介性遺伝子補正後の標的化配列における HITI、oa HDR および未確定（大きな欠失に起因して）の比を示す。実際のノックイン比がグラフ（%）に示されている。

10

【0213】

図 2C は、早老症 MEF に対する Cas9 / Lmna - gRNA - mCherry / MC - 早老症 - SATI トランスフェクションと shRNA 遺伝子ノックダウンによる遺伝子補正後の標的化部位におけるインデルを伴うまたは伴わない HITI、oa HDR および未確定（大きな欠失に起因して）の比を示す。実際の標的化比がグラフ（%）に示されている。shRNA ノックダウンの各標的が下部に示されている。スクランブル対照、n = 48；Ku80、n = 19；Lig3、n = 32；Rad51、n = 17。

20

【0214】

図 2D は、Lmna G609G / G609G 早老症マウスモデルへの静脈内（IV）AAV 注射を介した AAV - 早老症 - SATI による in vivo 遺伝子補正の実験スキームを示す。AAV - 早老症 - SATI を AAV - Cas9 と共に新生仔（生後 1 日目、P1）マウスに注射する。表現型を各実験の示されている日に分析する。

【0215】

図 2E は、100 日目の、SATI で処置した（Pro + SATI）または Cas9 を伴わずにドナーのみで処置した（Pro + ドナー）早老症マウスにおける、示されている組織からの Lmna c . 1827C > T 優性点変異部位における遺伝子補正効率を示す。

30

【0216】

図 2F は、100 日目の、SATI で処置した（Pro + SATI）または Cas9 を伴わずにドナーのみで処置した（Pro + ドナー）早老症マウスにおける、示されている組織からの Lmna イントロン 10 gRNA 標的部位におけるインデルパーセンテージを示す。

40

【0217】

図 2G は、早老症マウスに対する全身性 AAV - 早老症 - SATI 注射による遺伝子補正後の標的化部位におけるインデルを伴うまたは伴わない HITI、oa HDR および未確定（大きな欠失に起因して）の比を示す。それぞれ肝臓（上）および心臓（下）から抽出した DNA を使用してディープシーケンシングを実施した。実際のノックイン比がグラフ（%）に示されている。

【0218】

図 3A ~ 3H は、SATI で処置した早老症マウスにおける老化表現型の防止および分子分析を示す。

【0219】

図 3A は、Lmna + / + マウス（WT）、SATI で処置した Lmna + / + マウス（WT + SATI）、Lmna G609G / G609G マウス（Pro）、SATI で処置した Lmna G609G / G609G マウス（Pro + SATI）、Lmna + / G609G ヘテロ接合性マウス（Het）、SATI で処置した Lmna + / G609G ヘテロ接合性マウス（Het + SATI）の生存プロットを示す。WT、n = 72；WT + SATI、n = 8；Het、n = 33；Het + SATI、n = 11；早老症、n = 25；早老症 + SAT

50

I、n = 15。ログランク（マンテル・コックス）検定に従って $P < 0.0001$ 。各群のメジアン生存および最大生存日が下部に示されている。

【0220】

図3Bは、示されている組織からのラミンAとラミンCの発現比（左側）およびプロジェリンとラミンAの発現比（右側）についてのRT-qPCR分析（n = 3）を示す。各遺伝子の発現レベルをまずGapdhによって正規化し、次いで、比を算出する。SATIによる処置後の相対的な値が示されている。データは平均 \pm s.e.m. で表されている。各P値は対応のないスチューデントのt検定に従って示されている。N.S.、有意でない。相対比が各グラフの上部に示されている。

【0221】

図3Cは、17週齢時のWTマウス、早老症マウス（Pro）、および早老症+SATIマウス（Pro+SATI）の代表的な写真を示す。

【0222】

図3D～3Gは、17週齢時の皮膚（図3D）、脾臓（図3E）、腎臓（図3F）および大動脈（図3G）の組織学的分析を示す。左側：ヘマトキシリン・エオシン（H&E）染色の代表的な写真。中央および右側：平均 \pm s.e.m. として表されている定量分析（図3D～3G）。皮膚、n = 39；脾臓、n = 20；腎臓糸球体、n = 20；腎臓尿細管、n = 50；大動脈、n = 9。スケールバー：皮膚、腎臓および大動脈は100 μm、脾臓は250 μm。黒色の矢じりは表皮の厚さの減少および角質化の増加（図3D）、ならびに、白脾臓におけるリンパ小結節（図3E）を示す。表皮の厚さは無処置のマウスでは有意に減少し、SATIで処置したマウスでは復活した（図3D）。胚中心の面積は無処置のマウスでは有意に減少し、SATIで処置したマウスでは復活した（図3E）。糸球体の面積（中央のパネル）および尿細管の直径（右側のパネル）は無処置のマウスでは有意に減少し、SATIで処置したマウスでは復活した（図3F）。大動脈核の密度は無処置のマウスでは有意に低下し、SATIで処置したマウスでは復活した（図3G）。P値が各グラフに示されている、チューキー多重比較検定を伴う一元配置ANOVA（図3D～3G）。

【0223】

図3Hは、WTマウス、Proマウス、およびPro+SATIマウスにおける92日目から110日目の間の心電図（ECG）分析を示す。心拍数が毎分拍動（bpm）として表されている、n = 7。P値が各グラフに示されている、チューキー多重比較検定を伴う一元配置ANOVA。

【0224】

図4A～4Cは、早老症の成体の前脛骨筋へのSATIによる筋肉内処置を示す。

【0225】

図4Aは、成体Lmnagen/G609G/G609G早老症の前脛骨（TA）筋への筋肉内（IM）AAV注射を介したAAV-早老症-SATIによるin vivo遺伝子修復の実験スキームを示す。10週齢の早老症マウスのTA筋にAAV（複数可）を注射し、3週間後に分析した。

【0226】

図4Bは、13週齢時のTA筋のH&E染色の代表的な写真を示す。上：対照としてPBSを注射した野生型（WT+PBS）、中央：AAV-Cas9を伴わずAAV-早老症-SATIのみによる処置（Pro-Cas9）、下：AAV-早老症-SATIおよびAAV-Cas9による処置（Pro+Cas9）。スケールバー：100 μm。

【0227】

図4Cは、13週齢時の早老症マウスにおけるTA筋の筋線維横断面積分布である。棒の各色は独立したマウスからの代表的な筋肉を示す。WT+PBS、n = 6；Pro-Cas9、n = 6；Pro+Cas9、n = 8。%線維の平均が右上の角に示されている。各トレンドラインが破線で示されている。データは平均 \pm s.e.m. で表されている。各P値は対応のないスチューデントのt検定に従って示されている。

10

20

30

40

50

【0228】

図5A～5Cは、HDR媒介性ノックイン方法およびHITI媒介性ノックイン方法の略図を示す。

【0229】

図5Aは、HDR媒介性遺伝子ノックイン方法の略図を示す。ドナーDNAは、標的ゲノムと同一である2つの相同アームを含む。HDRは既存の変異を置き換えることができるが、非分裂細胞においては活性でない。in vivoでの適用は分裂能を有する組織に限定される。

【0230】

図5Bは、HITI媒介性遺伝子ノックイン方法の略図を示す。ドナーDNAは、Cas9媒介性DSB誘導部位を含み、標的ゲノムとの相同性を含まない。ゲノムの標的配列とドナーDNAの両方において同時にDSBが創出され、それにより、ドナーのゲノムのDSB部位への組込みが可能になる。HITIは既存の変異を置き換えることはできないが、非分裂細胞においても活性である。

10

【0231】

図5Cは、HITIによる一方向遺伝子ノックインを示す。SpCas9とsgRNAの複合体により、染色体DNAにおいてPAM配列の3塩基対上流に二本鎖切断(DSB)が導入され、その結果、2つの平滑末端が生じる。同じsgRNA標的配列をドナーDNA上に逆方向に負荷する。細胞において標的化された染色体DNAおよびドナーDNAの両方がSpCas9/sgRNA複合体によって切断される。標的化された染色体DNAの平滑末端と直線化されたドナーDNAが細胞非相同末端結合(NHEJ)修復機構によってライゲーションし、ドナーDNAが標的部位に組み込まれる。ドナーDNAが正しい配向で組み込まれると(左側)、接合部の配列はSpCas9によるさらなる切断から保護される。ドナーDNAが逆の配向で組み込まれると(右側)、インタクトなsgRNA標的部位が存在することに起因して、組み込まれたドナーDNAがSpCas9によって削除される。この組込み系は相同性非依存性標的化組込み(HITI)と称される。青色の五角形はsgRNA標的配列である。青色の五角形内の黒い線はSpCas9切断部位である。GOIは目的の遺伝子である。

20

【0232】

図6A～6Cは、HMEJおよびイントロン標的化SATI方法の略図を示す。

30

【0233】

図6Aは、HMEJ媒介性イントロン遺伝子ノックイン方法の略図を示す。ドナーDNAは、挿入されるカセット、2つのDSB誘導部位、および2つの、標的ゲノムと同一である相同アームを含む。望ましくない組換えを回避するために、挿入されるカセット(すなわち、スプライシングアクセプター、エクソン(複数可)、GOIおよび3'UTR)はいかなる相同配列も有さないことが重要である。さらに、挿入断片がNHEJによって組み込まれる場合に望ましくないスプライシングを回避するために、左側の相同アームはスプライシングアクセプターを含むべきではない。HMEJにより、従来のHDRまたはNHEJによるDNAノックインが可能になる。上記のドナー設計に関する限定の下でも、HMEJ媒介性遺伝子ノックインは広範囲の変異および細胞型を標的とすることもできるが、分裂細胞では従来のHDRとの競合に起因して効率が低くなる。さらに、2つの相同アームを有することが必要であり、これにより、AAVの容量を超える、in vivoでの適用が限定される恐れがある。

40

【0234】

図6Bは、新しいイントロン遺伝子ノックイン方法であるSATIの略図を示す。ドナーDNAは、DSB誘導部位および標的ゲノムと同一である1つの相同アームを含む。SATIにより、単一相同アーム媒介性HDR(oaHDR)または相同性非依存性NHEJに基づくHITIによるDNAノックインが可能になり、それにより、広範囲の変異および細胞型を標的とすることが可能になる。

【0235】

50

図 6 C は、本試験で使用した遺伝子編集方法間の適応性の差異に関する概要を示す。赤色の丸は、「完全に適用可能」であることを意味し、赤色の三角形は「部分的に適用可能」であることを意味し、赤色のバツ印は「適用困難」を意味する。各遺伝子編集方法の弱点が注釈に示されている（右側）。

【 0 2 3 6 】

図 7 A ~ 7 D は、H I T I およびイントロンの標的化 S A T I 戦略の略図を示す。

【 0 2 3 7 】

図 7 A は、エクソン標的化 H I T I ドナーを用いて従来の H I T I 系によって挿入された D N A 配列を示すスキームを示す。赤色の五角形および黄色および淡青色のハイライトは、エクソン 4 g R N A 標的配列の 3' 末端である。赤色の五角形内の黒い線および赤色の破線の矢印は C a s 9 切断部位である。H I T I によりインデルを伴わずにドナー配列を挿入することができた場合、両末端の接合部の配列が左下に示されている通りであり、フレームシフトがないので、G F P が正常に発現し得る（左側）。元の H I T I がエクソンを標的とする場合、ドナー D N A は多くの場合に接合部位に小さなインデルを伴って組み込まれ、その結果、アウトオブフレーム変異がもたらされ、末端に G F P シグナルを発現することができない（右側）。

【 0 2 3 8 】

図 7 B は本試験における g R N A の種々の設計能力を示す。

【 0 2 3 9 】

図 7 C は、G F P 補正 H E K 2 9 3 株における I R E S m C h e r r y - M C ドナーおよび異なる C a s 9 を用いた H I T I による遺伝子標的化の略図を示す。I R E S m C h e r r y ドナーを標的領域に H I T I によって首尾よく組み込むことができた場合、m C h e r r y シグナルが検出される。

【 0 2 4 0 】

図 7 D は、H E K 2 9 3 における通常の S p C a s 9 (w t C a s 9) および N G P A M C a s 9 (C a s 9 - N G および x C a s 9) を用いた m C h e r r y ノックイン H I T I 効率（%）を示す。データは平均 \pm s . e . m . で表されている。分析はボンフェローニの多重比較検定を伴う一元配置 ANOVA、*** P < 0 . 0 0 1 。

【 0 2 4 1 】

図 8 A ~ 8 D は、初代ニューロンにおける新規の標的化遺伝子ノックイン方法の開発を示す。

【 0 2 4 2 】

図 8 A は、1つのアーム相同性および H I T I ドナーによって誘導されるカットパターンを認識することに関する、異なるドナーおよび g R N A を用いたトランスフェクトされていないニューロン培養物およびトランスフェクトされたニューロン培養物の代表的な写真を示す。共焦点顕微鏡を用い、20 × 対物レンズを使用して画像を取得した。スケールバー：100 μm。

【 0 2 4 3 】

図 8 B は、E d U + または E d U - ニューロンにおける総細胞 (D A P I +) またはトランスフェクトされた細胞 (m C h e r r y +) の中の G F P + 細胞のパーセンテージによって示される絶対的なノックイン効率および相対的なノックイン効率を示す。n = 7。各値は、総細胞の中の G F P 陽性細胞のパーセンテージ（黒色）またはトランスフェクトされた細胞の中の G F P 陽性細胞のパーセンテージ（薄い灰色）を示す。データは平均 \pm s . e . m . で表されている。

【 0 2 4 4 】

図 8 C は、1つの相同アームドナー (M C - T u b b 3 i n t 3 - S A T I) による T u b b 3 コード領域の 3' 末端における G F P ノックイン後の実際の配列の例を示す。破線の矢印は C a s 9 によるカット部位である。下線が引かれた配列は P A M 配列と対応する。黄色のハイライトは g R N A 配列を示す。緑色で示されている配列はドナーベクターに由来する挿入配列である。青色で示されている配列は標的化されたゲノム配列である。

10

20

30

40

50

【0245】

図8Dは、ニューロンにおけるGFPノックインの効率に対する影響を、SATIDナ- (MC-Tubb3int3-SATI、MC-Tubb3int3-スクランブル)、HITIDナー (Tubb3ex4-HITI) およびHDRドナー (Tubb3ex4-HDR) における野生型Cas9 (Cas9) とCas9ニッカーゼ (Cas9D10A、一本鎖切断を導入する) を比較することによって示す。データはひげを有する四角として表されており、全ての入力データポイントが緑色のドットとして含まれ、四角の中央に平均が含まれている。

【0246】

図9A～9Dは、分裂細胞におけるHDR媒介性遺伝子ノックイン効率、HITI媒介性遺伝子ノックイン効率およびoahDR媒介性遺伝子ノックイン効率を示す。

10

【0247】

図9Aは、GFP補正HEK293株およびhESC株におけるHDRによる遺伝子標的化およびoahDRによる遺伝子標的化の略図を示す。各細胞株が染色体レポーター構築物を安定に発現する。短縮されたGFP (tGFP) ドナーが標的配列に正確に組み込まれたら、GFPが発現し、検出することができる。ドナー配列がHITIによって挿入された場合、GFP発現は検出されない。

【0248】

図9Bは、Cas9、gRNAおよびtGFPドナーDNAを用いてトランスフェクトして実施したサーベイヤーヌクレアーゼアッセイを示す。異なるgRNA (gRNA1、gRNA2およびgRNA3) をそれぞれGFP補正HEK293株にトランスフェクトする。gRNAカット効率をバンドの強度から算出し、それが下部に示されている (%)。

20

【0249】

図9Cおよび9Dは、HEK293細胞 (図9C) およびhES細胞 (図9D) におけるGFPノックイン効率を示す。HDRのためのgRNA:gRNA1。ゲノムカットのみのgRNA:gRNA2。ドナーカットのみのgRNA:gRNA3。ゲノムおよびドナーカット両方のgRNA:gRNA2+3。3つの独立した実験からのデータにより、*P<0.05および**P<0.01の対応のないスチュードントのt検定がもたらされた (図9C、図9D)。データは平均±s.e.m.で表されている。

【0250】

30

図10A～10Eは、分裂細胞における細胞周期依存性oahDR活性の測定を示す。

【0251】

図10Aは、GFP補正HeLa株における2日間にわたるG1期における細胞周期阻害剤である20μMのロバスタチンを用いた / 用いない処理後のヨウ化プロピジウム (PI) 染色による細胞周期分析を示す。細胞周期の各期の効率がグラフ (%) に示されている。

【0252】

図10Bは、ロバスタチンによる処理を伴う、GFP補正HeLa株におけるoahDR媒介性遺伝子ノックインおよびHDR媒介性遺伝子ノックインのパーセンテージを示す。*P<0.05。3つの独立した実験からのデータ、対応のないスチュードントのt検定。データは平均±s.e.m.で表されている。

40

【0253】

図10Cは、野生型Cas9 (Cas9) 、G1期特異的Cas9 (Cas9-Cdt1) およびS-M期特異的Cas9 (Cas9-Geminin) の構造を示す。

【0254】

図10Dおよび10Eは、異なるCas9による処理を用いた、GFP補正HEK293株 (図10D) およびHeLa株 (図10E) におけるoahDR媒介性遺伝子ノックインおよびHDR媒介性遺伝子ノックインの%を示す。実際の効率 (%) が上に示されている。データは平均±s.e.m.で表されている。N.S.は対応のないスチュードントのt検定で有意でない。

50

【0255】

図11A～11Dは、異なる細胞型におけるH D R媒介性遺伝子ノックイン、H I T I媒介性遺伝子ノックインおよびo a H D R媒介性遺伝子ノックインを示す。

【0256】

図11Aは、G F P補正H E K 2 9 3株およびh E S C株におけるm C h e r r yレポータードナーを用いたH D RおよびH I T Iによる遺伝子標的化の略図を示す。H D Rドナー(I R E S m C h e r r y - H D R - 0 c)がH D Rによって挿入される(上)。H I T Iドナー(I R E S m C h e r r y - M C)がH I T Iによって挿入される(下)。

【0257】

図11Bおよび11Cは、H E K 2 9 3細胞(図11B)およびh E S細胞(図11C)におけるm C h e r r yノックイン効率を示す。***P < 0.001。対応のないスチュードントのt検定での3つの独立した実験からのデータ。データは平均±s.e.m.で表されている。

10

【0258】

図11Dは、異なる細胞型における、概念的に本発明者らの知見に由来するS A T Iの図式モデルを示す。

【0259】

図12Aおよび12Bは、in vitroおよびin vivoにおける早老症マウスのS A T I媒介性遺伝子補正後のo a H D RまたはH I T I媒介性遺伝子ノックインプロファイルについての実験設計を示す。

20

【0260】

図12Aは、S A T I媒介性遺伝子補正ドナーを有するプラスミド(M C - 早老症 - S A T I)またはA A V(A A V - 早老症 - S A T I)を用いたL m n a G 6 0 9 G(c. 1 8 2 7 C > T)遺伝子補正の略図を示す。N H E J媒介性H I T Iによって媒介される遺伝子補正後、補正された変異を含む標的化配列がイントロン10、変異したエクソン11の直前に挿入される(左側)。o a H D Rによって媒介される遺伝子補正後、点変異以外は他のゲノム配列の変化を伴わずに変異が補正される(右側)。青色の五角形はL m n aイントロン10 g R N A標的配列である。青色の五角形内の黒い線はC a s 9切断部位である。青色の半分の矢印はH I T Iのみを検出するためのP C Rプライマーである。黒色の半分の矢印は遺伝子補正の接合部位を検出するためのP C Rプライマーである。

30

【0261】

図12Bは、補正された遺伝子配列を評価するための実験スキームを示す。早老症M E F、初代ニューロン、および脳組織それぞれからゲノムD N Aを抽出する。補正された配列を富化するために、1回目のP C Rと2回目のP C Rの間に、未補正の変異のみを認識することができるB s t X I酵素消化を実施する。最終的なP C R産物をT O P Oクローニングベクターにクローニングし、配列決定を行って、H I T Iとo a H D Rの比を決定する。

【0262】

図13A～13Cは、o a H D RがD S B修復の複数のエレメントによって媒介される非標準のH D R経路であることを示す。

40

【0263】

図13Aは、本試験で使用したD N A修復に関連するs h R N Aの遺伝子一覧を示す。

【0264】

図13Bは、示されているs h R N Aの存在下でのS A T Iノックイン効率の影響を示す。n=4。a l t - N H E J、代替N H E J。データは平均±s.e.m.で表されている。入力データポイントが緑色のドットで示されている。各条件をp L K O - s h R N A - スクランブルプラスミドをトランスフェクトした対照と比較した分析についてのt検定。***P < 0.0001、***P < 0.001、**P < 0.01および*P < 0.05。

【0265】

50

図13Cは、o a H D R 経路およびN H E J 経路でのS A T I ドナー媒介性遺伝子ノックインのモデルを示す。D S BがC a s 9によって誘導されたら、K u 7 0 / 8 0 ヘテロ二量体により切断がライゲーションされる。一部の場合には、末端切除が未知の機構によって起こり、ゲノムおよび/または二本鎖ドナーが一本鎖として露出する。一本鎖アニーリング(S S A)またはマイクロホモロジーおよびL i g 3 媒介性代替N H E J (A l t N H E J)が起こり、G O I(目的の遺伝子)がo a H D R 機構として挿入される(左側)。R a d 5 1により露出した一本鎖D N Aが安定化されるので、R a d 5 1欠損により大きな欠失が引き起こされ得る。

【0266】

図14Aおよび14Bは、S A T Iによる処置を用いて遺伝子補正された早老症マウスのノックイン分析を示す。

10

【0267】

図14Aは、100日目の、A A V - 早老症 - S A T Iで処置したマウスの種々の組織由来のゲノム鋳型を使用したP C RによるH I T I媒介性遺伝子ノックインの検証を示す。図12Aの青色の半分の矢印がH I T Iを検出するために設計されたP C Rプライマーである。F a n c a 遺伝子が内部対照として示されている。

20

【0268】

図14Bは、100日目の、A A V - 早老症 - S A T IのI V 注射による肝臓細胞(左側)および心臓細胞(右側)の3'接合部位の配列決定分析を示す。破線の矢印はC a s 9によるカット部位である。黄色のハイライトはg R N A配列を示す。緑色で示されている配列はドナーベクターに由来する挿入配列である。青色で示されている配列は標的化されたゲノム配列である。赤色で示されている配列は挿入である。

20

【0269】

図15A～15Eは、S A T Iで処置したマウスにおけるN G S分析を示す。

【0270】

図15Aは、示されている器官からのディープシーケンシングによるリード計数(リード)およびゲノム編集(インデル、H I T Iおよび補正)効率(%)を示す。

30

【0271】

図15B、15C、および15Dは、肝臓(図15B)、心臓(図15C)、および筋肉(図15D)におけるインデルサイズの分布を示す。インデルのサイズ(b p)が下部に示されている。

30

【0272】

図15Eは、100日目の、早老症マウスの肝臓から単離されたゲノムD N Aを使用したS A T I媒介性ゲノム編集のインデル頻度を決定するために使用したオンターゲット部位(O n、L m n a イントロン10)およびオフターゲット部位(O T S)の一覧を示す。赤色で示されているヌクレオチド文字は予測されるオフターゲット部位の個々のミスマッチである。

40

【0273】

図16A～16Eは、100日目の、S A T Iで処置した早老症マウスの肝臓および心臓のゲノムワイドオフターゲット分析を示す。

40

【0274】

図16Aは、スプライシングアクセプターを含む「L m n aの遺伝子半分」をノックインするイントロンS A T I媒介性遺伝子標的化戦略を示す。ドナーのオフターゲット組込みにより、組込み部位の転写物が捕捉され、融合遺伝子として発現される。オンターゲットのL m n aエクソン10を含む捕捉されたエクソンおよび未知のオフターゲット遺伝子を5' R A C Eおよび配列決定を用いて決定した。青色の半分の矢印は5' R A C EのためのP C Rプライマーである。

50

【0275】

図16Bは、100日目の、S A T Iで処置したマウス由来の肝臓および心臓における捕捉されたエクソンの一覧を示す。データは2匹のマウス(#1および#2)から得たも

50

のである。

【0276】

図16Cは、8週齢のマウスの肝臓における主要なオフターゲット遺伝子であるA1bのクロマチン(H3K27AcおよびDNase I HS)および発現(RNAseq)の状態を示す。

【0277】

図16Dは、8週齢のマウスの心臓における主要なオフターゲット遺伝子であるMyh6のクロマチン(H3K27AcおよびDNase I HS)および発現(RNAseq)の状態を示す。

【0278】

図16Eは、100日目のSATIで処置したマウス由来の肝臓におけるアルブミンのGapdhに対する発現比(左側)およびラミンAのGapdhに対する発現比(右側)についてのRT-qPCR分析を示す(n=3)。データは平均±s.e.m.で表されている。

【0279】

図17A~17Gは、WT、早老症、およびSATIで処置した早老症マウスの表現型表示および分析を示す。

【0280】

図17Aは、早老症マウス(n=5)およびSATIで処置した早老症マウス(早老症+SATI)の体重の累積プロットを示す(n=5)。データは平均±s.e.m.で表されている。

20

【0281】

図17Bは、17週齢時点でのWT、早老症、および早老症+SATIで処置した脾臓の代表的な写真を示す。早老症マウスにおいてSATIによる処置で脾臓退縮の部分的なレスキューが観察される。

【0282】

図17Cは、野生型(WT)、早老症(NT)、およびSATIで処置した早老症(T)から単離した尾端線維芽細胞(HTTF)由来のゲノム鑄型を使用したPCRによるHTTI媒介性遺伝子ノックインの検証を示す。P1におけるIV注射後の70日目にHTTFが樹立される。100日目の、SATIで処置したマウスの肝臓から回収したゲノムDNAをノックイン対照として使用した。図12Aの青色の半分の矢印がHTTIを検出するために設計されたPCRプライマーである。Fanc a遺伝子が内部対照として示されている。

30

【0283】

図17Dは、野生型(WT)、早老症(NT)、およびSATIで処置した早老症(T)の培養したHTTFから検出されたラミンA(上のバンド)、プロジェリン(中央のバンド)、およびラミンC(下のバンド)のタンパク質レベルを示す。各バンドをアクチン密度によって正規化し、その後、プロジェリン/ラミンAレベルを算出し、NTに対して正規化し、それが下部に示されている。

【0284】

図17Eおよび図17Fは、SATIで処置した早老症マウスから単離した線維芽細胞における核の形態学的異常の表現型レスキューを示す。70日目の野生型マウス(WT)、早老症マウス(Pro)、およびSATIで処置した早老症マウス(Pro+SATI)から単離されたHTTFにおける核の形態学的異常。ラミンA/Cの免疫染色(左側、図17E)、DAPI(中央、図17E)、および形態学的異常の定量化(n=6、図17F)。矢じりは異常な核形態を示す。スケールバー、20 μm(図17E)。データは平均±s.e.m.で表されている。各P値はチューキー多重比較検定を伴う一元配置ANOVAに従って示されている(図17F)。

40

【0285】

図17Gは、17週齢のマウスの肝臓のヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色を示

50

す。下のパネルはそれぞれ上のパネルの四角で囲まれた領域の拡大図である。病理組織学的分析では、全身 AAV 注射の 17 週間後に肝臓の中心静脈および門脈領域の周囲に明白な炎症性の特色は観察されなかった（早老症 + SATI）。スケールバー、（黒色） 200 μm、（青色） 100 μm。

【実施例】

【0286】

以下の実施例は、本発明の種々の実施形態を例示する目的で提示され、本発明をいかなるようにも限定することを意図するものではない。本実施例は、本明細書に記載の方法と共に、好ましい実施形態の現在の代表的なものであり、例示的なものであり、本発明の範囲を限定するものではない。特許請求の範囲によって定義される本発明の主旨の範囲内に 10 包含される実施例の変化および他の使用が当業者には想起されよう。

【0287】

（実施例 1：有糸分裂後のニューロンにおける单一相同アームドナー媒介性遺伝子ノックイン方法の開発）

HITI 系では、HDR と比較して相対的に変異原性である形態の DNA 修復である内因性細胞 NHEJ 経路の利点を活用する。NHEJ を用いると、多くの場合、挿入される DNA と標的化されたゲノム遺伝子座の接合部に小さな挿入 / 欠失（インデル）が創出される。これにより、エクソンを標的とした場合にアウトオブフレーム変異が引き起こされ、それにより遺伝子不活性が導かれる可能性がある（図 7A）。この限定を克服するため 20 に、関連性のあるエクソン（または変異）の上流のイントロン配列を標的とし、スライスアクセプター、関連性のある下流のエクソン（複数可）、3' UTR、および GFP などの遺伝子エレメントをドナー DNA 内に含めた。理論的には、これにより、挿入部位の下流の内因性エクソン（複数可）ではなくドナーエクソン（複数可）の転写がもたらされ、それにより、正常な転写物（すなわち、変異の補正）または融合転写物（すなわち、GFP などの遺伝子エレメントのノックイン）を生じさせることが可能になる（図 6B）。重要なことに、イントロンに導入された小さなインデルが標的遺伝子機能に影響を及ぼす確率はより低い。

【0288】

この新しい手法の効果を評価するために、非分裂性の培養されたマウス初代ニューロンにおいて、チューブリンベータ 3 鎮、Tubb3 遺伝子を、一連のドナー DNA、gRNA、および *Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9 (SpCas9) を使用して標的とした（図 1A ~ 図 1D）。プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列 (5' - NGG - 3') は、一般に、野生型 SpCas9 によって認識され、哺乳動物のゲノム全体を通して豊富であるが、HITI を使用して全ての遺伝子を標的とするために必要な正確な位置に見いだされるとは限らない。最近、柔軟な PAM 配列 (5' - NG - 3') を標的とし得るいくつかの新規の Cas9 がタンパク質工学によって開発されている (Hu, J. H. et al. *Nature* 556, 57-63 (2018); Nishimatsu, H. et al. *Science* 361, 1259-1262 (2018))。これらの新しく開発された Cas9 を使用すると、その柔軟性に起因して、標的領域を拡大することができる（図 7B）。しかし、これらの新規の Cas9 の活性は元の SpCas9 で見られるものより高くなく、また、イントロンを標的とするので (gRNA の設計により大きな柔軟性がもたらされる)、野生型 SpCas9 (以降 Cas9) をさらなる実験のために使用した（図 7B ~ 7D）。ニューロン実験に関しては、ドナー DNA の大多数がミニサークル (MC) の形であった。MC は、組み込まれた導入遺伝子の安定性を増強する細菌骨格を欠く二本鎖 DNA である。Tubb3 遺伝子のイントロン 3 を、ドナー DNA、Tubb3int3 - SATI を使用して標的とした。このドナーは、エクソン 4、GFP、および Tubb3 3' UTR を含めた標的ゲノムと同一の配列を含み、したがって、標的部位に対する 1 つの相同アームを有するものであった。さらに、HITI に媒介性標的組込みの能力を付与するために、Cas9 切断部位をドナー配列を挟むように含めた。したがって、次いで、細胞内で直線化されたドナー DNA プラスミドを NHEJ 経路による修復に使用することができ、それ

10

20

30

40

50

により、ゲノムのD S B部位へのH I T Iを介した一方向組込みが可能になる(図1A;図6B)。2つの相同アームおよびカット部位を有する組合せベクターである、以前に開発されたエクソン標的化H I T I、従来のH D R、およびH M E Jを含めた一連のドナー(それぞれT u b b 3 e x 4 - H I T I、T u b b 3 e x 4 - H D R、およびT u b b 3 i n t 3 - H M E J)も比較のために構築した(図1B~D;図5A、5Bおよび6A)。

【0289】

ドナーD N A、m C h e r r y発現ベクターを伴うg R N A(g R N A - m C h e r r y)、およびC a s 9のセットをマウス初代ニューロンに同時トランスフェクトした。有糸分裂後のニューロンにおいて遺伝子編集が起こることを確実にするために、細胞をE d U中でインキュベートし、培養物中のニューロンが有糸分裂後になるタイミングおよびどの細胞集団がトランスフェクトされたかの検証を可能にした。トランスフェクションの5日後、正確な遺伝子ノックインを免疫細胞化学によって確認した(図1E、図1F;図8A)。イントロン3を標的とするドナー(T u b b 3 i n t 3 - S A T I)を使用すると、予測通り、細胞質内にT u b b 3 - G F P融合タンパク質が検出された。T u b b 3 - G F Pは、T u b b 3遺伝子の産物である-I I I - チューブリン/T u j 1と共に局在した。さらに、G F P陽性(G F P+)細胞はE d Uについて陰性であり(E d U-)、それにより、イントロン遺伝子ノックイン手法が非分裂性ニューロンにおいて機能したことが実証される(図1F;図8B)。

【0290】

組込み部位におけるG F Pノックイン効率およびドナー配列を異なるドナーとg R N Aの組合せについて比較した。以前の研究と同様に、ゲノムのカット部位に対する2つの相同アームを有する従来のH D Rドナー(T u b b 3 e x 4 - H D R)を使用したG F Pノックイン効率は非常に低かった(トランスフェクトされた細胞の約0.07%)(図1C、図1G)。非相同H I T Iドナー(T u b b 3 e x 4 - H I T I)では、以前のデータと一致してH I T Iによる効率的なN H E J媒介性G F Pノックインが達成された(トランスフェクトされた細胞の36.25%)(図1B、図1G)。T u b b 3 i n t 3 - S A T Iを使用すると、ゲノム内のイントロン3において標的のみがカットされた場合か、またはT u b b 3 i n t 3 - S A T Iドナーのみがカットされた場合のいずれかでノックイン事象が観察されたが、G F Pノックイン効率は低かった(トランスフェクトされた細胞当たり6.3%および2.7%)(図1A、図1G)。驚いたことに、標的化された遺伝子座におけるドナーと挿入されたG F Pの接合部位は標的化されたゲノム配列と同様にインタクトなままであった、すなわち、g R N A標的化配列の接合部位の配列はH I T Iの特色を示さなかった(図1H;図8C)。したがって、単一相同アームを使用した場合、未知の非標準のH D R経路によりドナーD N Aが挿入されることが推測された。この非標準のH D Rの利用は、1アームH D R(o a H D R)と称され、染色体のカット部位に対して2つの相同アームを利用する従来のH D Rとは区別される(図1A、図1C)。ゲノムと1つの相同アームドナーD N A(T u b b 3 i n t 3 - S A T I)を同時にカットすることにより、効率的なG F Pノックインが観察された(トランスフェクトされた細胞の約37%)(図1G)。効率はエクソンを標的とする非相同H I T Iドナー(T u b b 3 e x 4 - H I T I、約36%)と等しく、また、H M E Jドナーに関して見られた効率(T u b b 3 i n t 3 - H M E J、約40%)とも同等であった(図1G)。さらに、C a s 9を、一本鎖切断(S S B)を導入するC a s 9ニッカーゼ(C a s 9 D 1 0 A)で置き換えた場合、G F Pノックイン効率は非常に低く、これにより、H I T Iおよびo a H D RにはS S BではなくD S Bが必要であることが示唆される(図8D)。ドナーT u b b 3 i n t 3 - S A T Iおよび染色体上の標的の2重消化を用いたG F P組込み後の遺伝子編集事象の分析の間、g R N A標的部位の約95%でo a H D Rの特色が示され、これにより、G F P挿入以外はゲノム配列に差異がないことが示される(図1H;図8C)。G F Pノックイン事象のわずか5%しかH I T Iによって媒介されず、これにより、ドナーD N Aが、N H E Jに関連する経路およびH D Rに関連する経路の両方のエレメントの関与が必要であることが予想されるo a H D Rによって主に挿入されたことが示唆され

10

20

30

40

50

る。

【0291】

まとめると、これらの結果から、ニューロンにおいて、単一相同アームドナーにより少なくともドナーまたは染色体上の標的配列のいずれかがカットされた場合に非標準のHDRが起こることが示唆される。ドナーと染色体上の標的の両方がカットされることによりノックイン効率が有意に上昇する(図1G)。要約すると、ドナーと染色体上の標的の両方においてDSBを誘導し、HITIとoaHDRの両方の特色を利用する「細胞間直線化単一相同アームドナー媒介性イントロン標的化組込み(SATI)」と称されるゲノム標的化系が首尾よく開発された。この系を使用してイントロンを標的とすることにより、より広い範囲のゲノム配列に特異的なgRNAの設計に柔軟性がもたらされ、NHEJにより創出されるインデルの影響が最小限になる(図6B、6Cおよび7A、7B)。

【0292】

(実施例2:分裂細胞におけるoaHDRおよびHITIに基づくノックイン効率の測定)

標準のHDRによるDNA修復は、細胞周期のS~G2期にのみ効率的に起こり得、それにより標準のHDRが非分裂細胞には利用できないものになっている。SATIの潜在的な適用の範囲を試験するために、oaHDRがin vitroで分裂細胞において起こるかどうかを決定した。EF1プロモーターの下で発現する変異したGFP導入遺伝子を有する遺伝子改変されたヒトHEK293細胞およびヒト胚性幹(hES)細胞株を使用した。3種の機能的gRNA:gRNA1、gRNA2およびgRNA3を使用したHDR媒介性標的化組込みまたはoaHDR媒介性標的化組込みによるノックイン効率を比較した(図9A、図9B)。従来の2つの相同アームドナー媒介性HDRは、以前の報告と一致して、これらの細胞において活性である。興味深いことに、ゲノムDNAおよびドナーDNAの両方が同時にカットされた場合に非常にわずかなノックイン事象が観察され、これにより、分裂しているHEK293細胞およびhES細胞においてoaHDR媒介性組込みがほんのわずかだけ起こったことが示唆される(図9C、図9D)。分裂細胞におけるoaHDR効率を潜在的に上昇させるために、細胞周期の異なる期の間にノックインを実施した。ニューロンなどの非分裂細胞は高レベルのoaHDRを示し、G0/G1期には停止している。したがって、増殖性細胞をG0/G1で停止させることにより、oaHDR媒介性組込みを後押しすることができる事が推測された。この可能性を調査するために、細胞をG1において停止させたところ(ロバスタチンを使用してまたはG1期特異的Cas9、Cas9-Cdt1を発現させることによって)、G1期特異的ゲノム編集におけるoaHDR活性の増大は観察されず、これにより、oaHDR媒介性組込みがG1停止では後押しされないことが示唆される(図10A~10E)。

【0293】

対照的に、mCherryレポーターのHEK293細胞およびhES細胞へのノックインによって実証された通り、活発に分裂している細胞では、HITIの活性が従来のHDRよりも1桁大きかった(HEK293細胞において18.2%対1.4%；hESC 10⁶個当たり111.6対11.4)(図11A~11C)。したがって、SATI構築物を使用すると、非標準の1アームHDRによって(非分裂細胞)またはHITIによって(活発に分裂している細胞)組込みが優勢に進行し得、HDRと比較して効率が高い(図11D)。

【0294】

(実施例3: SATIを使用した優性変異の遺伝子補正)

標的化のためのSATI戦略の多用途性を示すために、早老症モデルマウスを使用し、SATIを使用してラミンA/C、Lmna遺伝子のエクソン11における優性変異(c.1827C>T；p.G1y609G1y)を補正した。この変異の結果、プロジェリンと称される異常な形態のラミンAタンパク質が産生される。プロジェリンの蓄積により、複数の組織において病理学的变化が引き起こされる^{19~21}。この優性変異を補正するために、SATI媒介性遺伝子補正ドナー(それぞれAAV-SATIおよびM

10

20

30

40

50

C - 早老症 - S A T I) を含有する A A V およびミニサークルベクターを構築した (図 2 A ; 図 12 A)。これらの早老症 - S A T I ドナーは、イントロン 10 g R N A 標的配列によって挟まれた 1 つの 1.9 k b の相同アーム (L m n a 遺伝子の野生型エクソン 1 1、エクソン 12、および 3' U T R を含む) を含有し、A A V - 早老症 - S A T I はイントロン 10 g R N A 発現力セットを含んだ。H I T I 媒介性標的化遺伝子ノックインおよび o a H D R 媒介性標的化遺伝子ノックインのどちらによっても野生型 L m n a 遺伝子転写物の产生がもたらされることが仮定された (図 2 A)。

【 0 2 9 5 】

c . 1 8 2 7 C > T 変異の遺伝子補正が上首尾であるかどうかを決定するため、および o a H D R 媒介性ノックインと H I T I 媒介性ノックインの比を決定するために、マウス胚線維芽細胞 (M E F) および初代ニューロンを早老症マウスから単離した (図 12 B)。注目すべきことに、M E F は、高度に増殖性であるにもかかわらず低 H D R 活性を示す。早老症 - S A T I ドナーをこれらの細胞にトランスフェクションまたは感染によって送達した。A A V - 早老症 - S A T I も A A V - C a s 9 と共に早老症マウスの成体の脳に注射した。ゲノム D N A を編集された早老症の細胞または脳組織から抽出した。これらの細胞および組織に対する D N A 送達効率は低いので、補正された配列をまず、補正されていない対立遺伝子を特異的に認識する B s t X I 酵素によってカットすることによって富化し、次いで、サンガーシーケンシングによって分析した。遺伝子補正事象が観察され、o a H D R (8 0 ~ 9 0 %) および H I T I (1 0 ~ 2 0 %) の両方が遺伝子補正された細胞において明らかであり、これにより、早老症を引き起こす優性点変異に対する S A T I 媒介性遺伝子補正が達成されたこと、およびこれらの細胞型において S A T I ドナーに関しては o a H D R 媒介性組込みが優勢であったことが示唆される (図 2 B)。

【 0 2 9 6 】

o a H D R 媒介性遺伝子ノックインおよび H I T I 媒介性遺伝子ノックインを担う経路を決定するために、T u b b 3 - G F P ノックイン S A T I 系 (T u b b 3 i n t 3 - S A T I ドナー、C a s 9 、二重カット g R N A) をトランスフェクトした野生型初代ニューロンを D S B 修復経路に関する遺伝子に対する s h R N A と一緒に試験した (図 13 A 、図 13 B)。S A T I ドナーの G F P ノックイン効率は、標準の N H E J (c N H E J) 経路 (K u 7 0 、および K u 8 0) 、代替 N H E J 経路 (a l t N H E J) (L i g 3 および X r c c 1) および H D R 経路 (R a d 5 0 および R a d 5 1) を含めた D S B 修復に関する遺伝子を標的とする s h R N A の影響を受けた。o a H D R と H I T I の比の変化を早老症 M E F において調査した (図 2 C)。K u 8 0 ノックダウンにより H I T I 媒介性ノックインが排除された。これは、H I T I が標準の N H E J 媒介性ノックイン機構であることが実証された本発明者らの以前の結果と一致する。対照的に、L i g 3 ノックダウンにより H I T I が中程度に増加し (対照における 1 2 . 6 % から 2 1 . 9 % まで) 、これにより、代替の末端結合 (a l t N H E J) が o a H D R 媒介性遺伝子ノックインに関することが示唆される。興味深いことに、R a d 5 1 ノックダウンにより大きな欠失がもたらされ、これにより、R a d 5 1 により S A T I 媒介性遺伝子変換の間のゲノムの構造が安定化され得ることが示唆される。これらの結果から、S A T I 系による遺伝子ノックインが多数の D S B 修復経路によって媒介されることが示される (図 13 C)。

【 0 2 9 7 】

(実施例 4 : i n v i v o における優性変異の S A T I 媒介性の全身性遺伝子補正) S A T I の i n v i v o において優性変異を補正する能力を試験するために、A A V - 早老症 - S A T I を、C a s 9 を発現する A A V と一緒に生後 1 日目 (P 1) の新生仔 L m n a G 6 0 9 G / G 6 0 9 G 早老症マウスに静脈内 (I V) 注射することによって全身送達した (図 2 D)。血清型 9 A A V の広範囲の組織に感染する能力に基づいて、血清型 9 A A V に S A T I ドナーをパッケージングした。1 0 0 日目におけるゲノム P C R およびサンガーパターン分析により、効率は変動したが、肝臓、心臓、筋肉、腎臓、および大動脈を含めたいいくつかの組織において、S A T I 媒介性標的化遺伝子ノックインが起きたこと

10

20

30

30

40

50

が明らかになった(図14A～14B)。100日目に、いくつかの器官におけるイントロン10内のgRNA標的部位におけるインデルの頻度および配列、ならびにSATI媒介性遺伝子補正の効率(肝臓において2.06%および心臓において0.34%)を次世代配列決定(NGS)を使用して決定した(図15A)。注目すべきことに、観察された事象がPCRアーチファクトに起因する可能性を排除するために、ドナーのみAAVを注射した対照早老症マウス(「Pro+ドナー」と表示される)をNGS実験に含めた。gRNA標的部位がLmna遺伝子のイントロン10内であったこと、およびインデルのサイズが小さかったこと、およびLmna転写物のスプライシングに影響を及ぼすことは予測されなかつたこと注目すべきである(図15B～15D)。

【0298】

in vivoにおけるSATIのオフターゲット効果を試験するために、Lmnaイントロン10 gRNAについての10カ所の最も順位が高いオフターゲット部位に関連する変異率を調査した。SATIで処理した肝組織をNGSによって分析し、それにより、コンピューターにより予測されたオフターゲット部位における最小インデルのみが明らかになった(図15E)。次に、ゲノムの他の領域におけるドナーDNAの潜在的なオフターゲット組込みを5' RACEおよび配列決定によって試験して、肝臓および心臓において組み込まれたドナーDNAから転写されたLmna mRNAのエクソン11の上流配列を同定した(図16A)。処置した早老症マウスの肝臓および心臓におけるLmna遺伝子座におけるオントーゲット組込みを検出した(図16B)。しかし、A1b遺伝子およびMyh6遺伝子のいくつかのエクソンがそれぞれ肝臓および心臓において捕捉され、これにより、ドナーDNAが開かれたクロマチン領域内にトラップされ得る(図16C、図16D)ことが示唆される。重要なことに、肝臓においてA1b遺伝子の発現レベルはLmna遺伝子の10,000倍を超えることにより、トラップされたドナー由来の融合転写物が野生型内因性A1b遺伝子転写物と比較して有意に少ないと、および、融合タンパク質により腫瘍形成が開始される場合を除き、この最小オフターゲット組込みは組織に影響を及ぼさないはずであることが示唆される(図16E)。

【0299】

100日目のin vivoにおけるSATI媒介性oahDRおよびHITIの効率を評価するために、gRNA標的部位およびc.1827C>T変異部位を含む約600bpを增幅し、ペアエンドシーケンシングによって効率を決定した。遺伝子補正のパーセンテージが、上記のNGSの結果と同様に、肝臓では2.07%であり、心臓では0.14%であったことが推定された(図2E、2F；図15A)。さらに、in vivoにおける全身SATI処置後にペアエンドシーケンシングによって分析した肝臓および心臓においてoahDR事象が観察された(図2G)。この数は低く見えるが、遺伝子補正された細胞が処理の100日後であってもいくつかの器官においてなお存在すること、および補正効率がいくつかの組織および器官においてSATI媒介性表現型レスキューアーを引き出すために十分なものであったことに注目することが重要である(以下を参照されたい)。

【0300】

(実施例5: SATIによる早老性症候群の表現型レスキューアー)

早老症マウスは、一般には、進行性の体重減少および寿命の短縮を示す。これらの表現型はSATIによる処置によって遅延し(図3A；図17A)、進行性の体重減少が減速し、メジアン生存時間が1.45倍に有意に延長された(無処置の動物およびSATIで処置した動物はメジアン生存でそれぞれ105日間および152日間生存した)。Lmna遺伝子はラミンAおよびラミンCタンパク質の両方をコードし、Lmna^{G609G/G609G}変異の結果、ラミンA転写物だけに異常なスプライシングが生じる(図2a)。SATIで処置した早老症マウスの定量的RT-PCR分析により、100日目に肝臓、心臓、および大動脈における総ラミンC転写物に対する野生型ラミンA転写物の増加(約3.5倍)および総ラミンA転写物に対するプロジェリン転写物の減少(約5.4分の1)が明らかになった(図3b)。

10

20

30

40

50

【0301】

3カ月齢の早老症マウスでは、一般には、皮膚、脾臓、および腎臓を含めた多数の器官において年齢に関連する病理学的变化が観察される。これらの老化表現型は、S A T Iによる処置を受けた17週齢の早老症マウスでは減弱した(図3C~3F;図17B)。S A T Iで処置したマウスでは、表皮の厚さの増大、脾臓における胚中心のレスキュー、および腎臓における尿細管萎縮の低減が示された。70日目のS A T Iで処置したマウス由来の樹立された尾端線維芽細胞(T T F)を使用して、これらの細胞におけるノックイン事象およびタンパク質レベルを試験したが、いかなるノックインもP C Rによって検出することはできなかった(図17C)。その代わりに、S A T Iによる処置により、プロジェリン/ラミンAタンパク質レベルがわずかに低下し、早老症において一般には観察される核膜異常が部分的にレスキューされた(図17D~17F)。早老症マウスは変異体対立遺伝子(c. 1827C>T; p. G1y 609G1y変異)を有し、これは、ヒトL M N A遺伝子におけるハッチンソン・ギルフォード早老症候群(H G P S)c. 1824C>T; p. G1y 608G1y変異と等価である。心血管の問題または脳卒中を含めたアテローム性動脈硬化症に関連する合併症がH G P S(または早老症)を有する患者の大多数の死亡の最終的な原因である。早老症マウスは、早老性症状に特徴的な組織学的および転写上の変更を示し、寿命の短縮および心血管異常を含めたヒトH G P Sの主要な臨床症状発現を暗示する。したがって、早老症マウスの大動脈および心拍数を分析した。S A T Iによる処置により、大動脈弓の平滑筋層内の核の数が無処置の対照と比較して増加した(図3G)。心電図(E C G)記録から、S A T Iによる処置により、早老症マウスにおいて通常は観察される徐脈の進行性の発生が防止されたことが明らかになった(図3H)。

10

【0302】

H G P Sを有するほとんど全ての患者が同じ優性c. 1824C>T変異についてヘテロ接合性であるので、ヘテロ接合性早老症マウス(L m n a + / G 6 0 9 G)もS A T Iで処置した。これらのヘテロ接合性マウスのメジアン生存もS A T Iによる処置後に改善された(無処置の動物およびS A T Iで処置した動物はメジアン生存でそれぞれ323日間および403日間生存した)(図3A)。重要なことに、S A T Iで処置した野生型マウスでは500日間を超えて形態学的/組織学的変更が観察されず(図17G)、これにより、観察されたオフターゲット組込みの有害作用はほとんど重要ではないことが示唆される。集合的に、これらのデータから、病理学的表現型の発生を防止するために、S A T Iを使用してi n v i v oで優性変異を補正することができる事が実証される。

20

【0303】

(実施例6:S A T Iを使用した成体組織におけるi n v i v o補正)

H G P Sを有する患者は、19カ月のメジアン年齢(3.5カ月齢~4.0歳の範囲)で診断される。同様に、優性変異によって引き起こされる多くの他の疾患は新生児期をはるかに超えてから診断される。より後期にS A T Iを送達することにより治療的利益をもたらすことができるかどうかを決定した。S A T I系を10週齢の早老症マウスに局所的な筋肉内(I M)注射によって送達した。骨格筋は早老症マウスにおける罹患組織の1つである(図4A)。注射の3週間後、注射した前脛骨筋の線維サイズ分布がS A T Iで処置した早老症マウスにおいて改善された(図4B、図4C)。成体の有糸分裂後のマウス脳におけるS A T Iによる上首尾の遺伝子ノックイン(図2B)と合わせて、これらの結果から、若年期または成人期の特定の組織における局所的な遺伝子修復により、優性変異を有する患者に対して補完的な処置選択肢をもたらすことができる事が示唆される。

30

【0304】

(実施例7:材料および方法)

プラスミドおよびミニサークルD N A

g R N A発現ベクターを構築するために、それぞれ20bpの標的配列をp C A G m C h e r r y - g R N A(A d d g e n e 8 7 1 1 0)またはg R N A _ C l o n i n g V e c t o r(A d d g e n e 4 1 8 2 4)にサブクローニングした。本試験で使用し

40

50

たC R I S P R - C a s 9 標的配列 (2 0 b p の標的および 3 b p の P A M 配列) を以下に示す : T u b b 3 イントロン 3 を標的とする g R N A (i n t 3 g R N A - m C h e r r y : G A A G G C T G A C C T A T T T A T C C A G G) 、 g R N A 2 (G G T C G C C A C C A T G G T G A G C A A G G) 、 g R N A 3 (C A G C T C G A C C A G G A T G G G C A C G G) 、 および L m n a イントロン 1 0 を標的とする g R N A (L m n a - g R N A - m C h e r r y : C C C A T A A G T G T C T A A G A T T C A G G) 。スクランブル - g R N A (m S c r a m b l e g R N A - m C h e r r y ; G C T T A G T T A C G C G T G G A C G A A G G) 、 g R N A 1 (C A G G G T A A T C T C G A G A G C T T A G G) 、 および T u b b 3 エクソン 4 を標的とする g R N A (e x 4 g R N A - m C h e r r y ; G C T T A G T T A C G C G T G G A C G A A G G) 発現プラスミドは以前に使用している。 h C a s 9 (A d d g e n e 4 1 8 1 5) および t G F P (A d d g e n e 2 6 8 6 4) は A d d g e n e から購入した。 C a s 9 の増強バージョン (p C A G - 1 B P N L S - C a s 9 - 1 B P N L S (A d d g e n e 8 7 1 0 8) および p C A G - 1 B P N L S - C a s 9 - 1 B P N L S - 2 A G F P (A d d g e n e 8 7 1 0 9) 、 I R E S m C h e r r y - H D R - 0 c 、 I R E S m C h e r r y - M C および T u b b 3 e x 4 - H D R 、 T u b b 3 e x 4 - H I T I (p T u b b 3 - M C : A d d g e n e 8 7 1 1 2) 。ミニサークル (M C) は、細菌骨格を欠く二本鎖 D N A であり、組み込まれた導入遺伝子の安定性を増強することが示されている。マウス T u b b 3 に対する S A T I ドナー (p M C - T u b b 3 i n t 3 - S A T I および p M C - T u b b 3 i n t 3 - スクランブル) を構築するために、 g R N A 標的配列および G F P を含む片側相同アームを p T u b b 3 - H R から増幅し、次いで、ミニサークル産生サーブラスミド (p M C . B E S P X 、 S y s t e m B i o s c i e n c e s # M N 1 0 0 B - 1) の A p a I 部位 (N E B # R 0 1 1 4 S) および S m a I 部位 (N E B # R 0 1 4 1 S) に I n - F u s i o n H D C l o n i n g k i t (C l o n t e c h # 6 3 9 6 5 0) を使用してサブクローニングした。マウス T u b b 3 に対する H M E J ドナー (p T u b b 3 i n t 3 - H M E J) を構築するために、コドン最適化されたエクソン 4 およびラットゲノムに由来する非翻訳配列を挿入することにより、不必要的相同配列を挿入されるカセットから除去した。マウス T u b b 3 エクソン 4 のコドン最適化および合成は I D T で行われた。スプライシングアクセプター部位、 3 ' U T R および下流を含むイントロン 3 の一部を、ブラウンノルウェーラットから単離されたラットゲノムから増幅した。2つの相同アーム (左アーム : 1 . 0 k b 、右アーム : 1 . 2 k b) をマウスゲノム D N A から増幅し、次いで、挿入されるカセットとアセンブルした。アセンブルされた断片を2つの g R N A 標的配列の間に挟み、上記の戦略に従って p C A G - f l o x S T O P プラスミドにサブクローニングした。早老症遺伝子補正のための S A T I ドナー (p M C - 早老症 - S A T I) を構築するために、 g R N A 標的配列、および c . 1 8 2 7 C を含む片側相同アームを野生型 C 5 7 B L / 6 マウスゲノム D N A から増幅し、次いで、上記の戦略に従って p M C . B E S P X にサブクローニングした。これらの親プレミニサークル D N A は、骨格 D N A から除去され、以前の論文に記載されている通り、ミニサークル D N A ベクターとして生成された。 N G P A M x C a s 9 (p C A G - 1 B P N L S - x C a s 9 - 1 B P N L S) を構築するために、 x C a s 9 3 . 7 (A d d g e n e 1 0 8 3 7 9) (A d d g e n e プラスミド # 1 0 8 3 7 9 ; h t t p : / / n 2 t . n e t / a d d g e n e : 1 0 8 3 7 9 ; R R I D : A d d g e n e _ 1 0 8 3 7 9) を P C R によって増幅し、次いで、 I n - F u s i o n H D C l o n i n g k i t を使用して p C A G - 1 B P N L S - C a s 9 - 1 B P N L S に挿入した。 N G P A M S p C a s 9 - N G (p C A G - 1 B P N L S - S p C a s 9 N G - 1 B P N L S) を構築するために、 S p C a s 9 - N G を I D T において合成し、次いで、 I n - F u s i o n H D C l o n i n g k i t を使用して p C A G - 1 B P N L S - C a s 9 - 1 B P N L S に挿入した。細胞周期特異的 C a s 9 を構築するために、 C d t 1 および G e m i n i n を I D T において合成し、次いで、 I n - F u s i o n H D C l o n i n g k i t を使用して p C A G - 1 B P N L S - C a s 9 - 1 B P N L S (A d d g e n e 8 7 1 0 8) 10

)に挿入した。生成されたpCAG-1BPNLS-Cas9-Cdt1およびpCAG-1BPNLS-Cas9-GemininはそれぞれG1期特異的Cas9発現プラスミドまたはS/G2/M期特異的Cas9発現プラスミドであった。ニッカーゼCas9(pCAG-1BPNLS-Cas9D10A-1BPNLS)を構築するために、In-Fusion HD Cloning kitを使用してD10A点変異をpCAG-1BPNLS-Cas9-1BPNLS(Addgene 87108)に挿入した。shRNA発現ベクター(pLKO-shRNA)はSigmaから購入した(図13A)。対照として、pLKO-shRNA-スクランブルを使用した。SATI媒介性早老症遺伝子補正のためのドナー/gRNA AAVを構築するために、c.1827Cを含む片側相同アームを野生型C57BL/6マウスゲノムDNAから増幅し、次いで、相同アームをCas9/gRNA標的配列で挟み、Lmnaイントロン10 gRNA発現カセットおよびmCherryKASH発現カセットをAddgene(Addgene 60958)から購入したPX552のITR間にサブクローニングし、pAAV-早老症-SATI.pAAV-nEFCas9(Addgene 87115)を生成した。

【0305】

AAV作製

AAV(AAV-早老症-SATIおよびAAV-nEFCas9)は全て血清型9を用いてパッケージングし、標準のプロトコールを使用して生成した。

【0306】

動物

ICRおよびC57BL/6をJackson laboratoryから購入した。Lmna G609G(c.1827C>T)変異(早老症)を有するハッチンソン・ギルフォード早老症候群(HGPS)のマウスモデルは、University of Oviedo, SpainのCarlos Lopez-Otinによって生成された。本試験で使用した全てのマウスは、性別混成、系統混成であり、E12.5齢~17カ月齢およびそれよりも年長であった。

【0307】

マウスニューロンの初代培養

マウスニューロンをE14.5 ICRマウス脳またはP0.5早老症マウス脳の皮質から得た。低温のPBS中2%グルコース溶液中で脳切開を実施した。次いで、Accutase(Innovative Cell Technologies#AT104)を用いて組織を解離させ、懸濁物を、40 μmの細胞濾過器を移動させて单一細胞懸濁物を得た。細胞を、5 mMのタウリン(Sigma#T8691-25G)、2%B27(Gibco#17504-044)および1×Glutamax(Gibco#35050-061)を追加補充したNeurobasal media(Gibco#21103-049)を伴う各12 mmポリ-D-リシンカバーガラス(Neuvitro#H-12-1.5-PDL)当たり細胞200,000個の比で播種した。培養物を標準の条件(加湿5%CO₂/95%空気中37)で維持した。培養培地の体積の半分を2日に1回交換した。初代培養物中に存在する増殖性ニューロン前駆体の消失を播種後毎日10 μMのEdU-パルスによって追跡した(Invitrogen#C10640キットのEdUを使用)。5日間培養した後、EdU+細胞のパーセンテージを基礎レベルまで低下させ、次いで、そのような有糸分裂後の細胞集団をさらなる実験のために用いて実験を進めた。

【0308】

in vitroで培養された初代ニューロンのトランスフェクションおよびAAV感染ミニサークルまたはプラスミドのトランスフェクションに関しては、CombiMag(OZBiosciences#CM20200)試薬をLipofectamine 2000(Invitrogen#P-N52758)と組み合わせて、製造者の指示に従ってマウス初代ニューロンにトランスフェクトするために使用した。5日間培養した後、Cas9、gRNA、およびshRNAのプラスミドを1 mL当たりそれぞれ1 μgの

10

20

30

40

50

比でトランスフェクトし、一方、ドナーは培養培地 1 mL当たり 2 μ g の比でトランスフェクトした。以下のドナーと gRNA の組合せを初代ニューロンにトランスフェクトした（単一相同アーム / 染色体カット：MC - Tubb3int3 - スクランブルおよびint3gRNA - mCherry；単一相同アーム / ドナーカット：MC - Tubb3int3 - スクランブルおよびmScramblegRNA - mCherry；単一相同アーム / ドナー - 染色体二重カット (SATI)：MC - Tubb3int3 - SATI およびint3gRNA - mCherry；エクソン4を標的とする HITI : Tubb3ex4 - HITI およびex4gRNA - mCherry；エクソン4を標的とする HDR : Tubb3ex4 - HDR およびex4gRNA - mCherry）；ならびにイントロン3を標的とする HMEJ : Tubb3int3 - HMEJ。AAV 感染に関しては、AAV 混合物 (AAV9 - nEFCas9 [2 × 10¹¹ ゲノムコピー (GC)] および AAV9 - 早老症 - SATI [2 × 10¹¹ GC]) を 5 日間培養した後に 6 ウェル規模で初代培養物に感染させた。トランスフェクションまたは感染の 5 日後に細胞を以下の方 10 法によって分析した。

【0309】

初代ニューロンの免疫細胞化学

4 % パラホルムアルデヒド溶液中で 15 分にわたって固定を行った。プロッキングおよび透過処理を PBS 中 5 % ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma # A1470 - 100) および 0.1 % Triton - X100 (EMD # TX1568 - 1) を用いて室温で 1 時間行った。一次抗体を PBS 中に希釈し、以下の濃度 [1 : 1, 000] 抗 GFP (Aves # GFP - 1020) または [1 : 250] 抗 II - チューブリン (Sigma # T2200 - 200UL) で湿式チャンバー中、4 度終夜インキュベートした。翌日、細胞を、二次抗体：[1 : 1, 000] Alexa - Fluor 488 または 647 (Thermo Fisher, # A11039 および # A21244) と一緒にインキュベートした。一次抗体および二次抗体のそれぞれのインキュベーション後に PBS 中 0.2 % の Tween 20 (Fisher # BP337 - 500) を用いた 5 回の洗浄ステップを実施して過剰な一次抗体および二次抗体を除去した。次いで、DAPI - Vector Shield 封入剤 (Vector # H - 1200) を使用して細胞を封入した。増殖の状態を決定するために、EdU を Click - iT EdU キットにより、製造者の指示 (Invitrogen # C10640) に従って検出した。 20 30

【0310】

初代ニューロンの画像の取得および処理

ニューロン初代培養物の免疫細胞化学試料を、GFP ノックイン効率の検出および定量化のために、Zeiss LSM 710 Laser Scanning Confocal Microscope (Zeiss) を使用して共焦点顕微鏡によって可視化した。定量化のために、GFP+ 細胞のパーセンテージを、カバーガラス当たりのトランスフェクトされた細胞 mCherry+ の総数に関して直接計数することによって算出した。Airyscan LSM 880 (Zeiss) を用いて代表的な写真を取得した。イメージングのために、各試料から少なくとも 5 枚の写真を得た。本発明者らの培養物は少なくとも 30 枚の異なる同腹仔に由来し、正確な n 値は各図に記載されている。画像を、ZEN 2 Black edition software (Zeiss)、ICY software for bio-imaging version 1.9.5.1 (http://icy.bioimageanalysis.org/)、および NIH Image J (Fiji) ソフトウェアにより、実験要件に従って処理した。 40

【0311】

培養された初代ニューロンの遺伝子型決定

培養された初代ニューロンにおける GFP ノックインを決定し、1 アーム HDR (o a HDR) 事象と HITI 事象を区別するために、Pico Pure DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific # KIT0103) または Blood & Tissue kit (QIAGEN # 69506) を使用して 50

製造者の指示に従ってゲノムDNAを抽出した。まず、gRNA標的部位を含むGFPノックイン配列を、PrimeSTAR GXL DNAポリメラーゼ(Takara #R050A)を用い、以下のプライマーを用いて増幅した：mTubb3GFP-F1: 5'-GCAGAACCTCCCAGCACCAATTTCAACCATGNNNNNNN 10
NACAGCCCTCATCTGACATCACAGTCTCAGC-3' およびmTubb3GFP-R1: 5'-GTTGCTTCTTTAACTTATGTGACTCCAGA
CAGTTGTTCTATGAAGGCTCCGTTACGTCGCCGTCCA
GCTCGACCAAG-3'。次いで、PCR産物を以下のプライマーおよび鑄型として第1のPCR産物を使用して入れ子状にした。mTubb3GFP-F2: 5'-GCAGAACCTCCCAGCACCAATTTCAACCATG-3' およびmTubb3GFP-R2: 5'-GTTGCTTCTTTAACTTATGTGACTCCAGACAG
TTGTTCTATGAAGGCT-3'。PCR産物を、pCR-Blunt II -TOPOベクターにZero Blunt TOPO cloning kit (Invitrogen #450245)を用いてクローニングした。ABI 3730xl sequencer (Applied Biosystems)を使用してアンプリコンの配列決定を行い、gRNA標的配列からoahDRとHITIの比を決定した。mTubb3GFP-F1プライマー内のNNNNNNNNが各起点を区別するためのバーコード配列であることに注目すべきである。PCRバイアスによる不正確さを回避するために、PCR産物が同じバーコード配列を含む場合には1つと計数した。

【0312】

GFP補正HEK293、HeLaおよびhES細胞株の生成および培養
分裂細胞におけるノックイン効率を評価し、HEK293細胞およびhES細胞におけるSATI方法を最適化するための変異したGFP遺伝子に基づくレポーター系が以前に確立された。HeLa細胞における変異したGFP遺伝子に基づくレポーター系を以前に使用されたプロトコールに従って確立した。hES細胞を以前に記載されている通り培養した。HEK293細胞およびHeLa細胞を、DMEM (Gibco #11995-040)、10%熱失活ウシ胎仔血清(FBS、Gibco #16000-044)、1×Glutamax、1×MEM非必須アミノ酸(Gibco #11140-050)および1×ペニシリンストレプトマイシン(Gibco #15140-122)を含有するHEK293培地を用いて培養した。

【0313】

GFP補正HEK293、HeLa、およびhES細胞株における標的化遺伝子ノックイン効率の測定

GFP補正HEK293、hESおよびHeLa細胞株におけるHDR、oahDRおよびHITIの標的化遺伝子ノックイン効率を測定するために、Lipofectamine 3000 (Invitrogen #L3000008) およびFuGENE HD (Promega #E2311)をそれぞれHEK293/HeLa由来細胞株およびヒトES由来細胞株へのトランスフェクションのために使用した。トランスフェクション複合体を製造者の指示に従って調製した。Cas9発現プラスミド(hCas9[HEK293およびHeLa細胞]またはpCAG-1BPNLS-Cas9-1BPNLS[hESC])、gRNA (gRNA1、gRNA2、および/またはgRNA3)およびドナ- DNA (tGFP)をトランスフェクションのために使用した。gRNA1を使用してHDR効率を測定した。gRNA2とgRNA3の同時トランスフェクションを使用してoahDR効率を測定した。gRNA2またはgRNA3の単一トランスフェクションを、それぞれゲノムDNAのみおよびDNAドナーのみをカットするための対照として使用した。GFP補正HEK293細胞株に対しては、Cas9、gRNAおよびドナーのプラスミドを12ウェル規模で反応当たり各々1μgの比でトランスフェクトした。GFP補正hES細胞株に対しては、Cas9発現ベクター0.5μg、gRNA発現プラスミドベクターそれぞれ0.5μgおよびドナーベクター1μgを6ウェル規模で同時トランスフェクトした。GFP補正HeLa細胞株に対しては、Cas9、gRNAおよびドナ- DNA (tGFP)をトランスフェクトした。

10

20

30

40

50

ーのプラスミドを 12 ウェル規模で反応当たり各々 0.5 μ g の比でトランスフェクトした。HEK293 細胞および hESC 細胞における HDR 効率と HITI 効率を比較するために、pCAG-1BPNLS-Cas9-1BPNLS、gRNA1 および ドナー-DNA (IRESmCherry-HDR-0c または IRESmCherry-MC) を同時トランスフェクトした。プロモーターレス IRESmCherry ミニサークル DNA (IRESmCherry-MC) を使用して HITI 効率を測定した。2つの相同アームプラスミドを伴うプロモーターレス IRESmCherry (IRESmCherry-HDR-HDR-0c) を使用して HDR 効率を測定した。HDR、oahDR および HITI を介した標的化遺伝子ノックインの効率を、トランスフェクションの 6 日後に、FACS LSR Fortessa (BD) または CytoFLEX S (Beckman Coulter) により、GFP+ または mCherry+ 細胞の数によって決定した。G1 期を停止させるために、以前の試験に従うことにより、HeLa において 20 μ M のロバスタチン (Sigma # 1370600) 処理を行った。細胞周期特異的ゲノム編集の効果を調査するために、pCAG-1BPNLS-Cas9-1BPNLS、pCAG-1BPNLS-xCas9-1BPNLS、pCAG-1BPNLS-SpCas9NG-1BPNLS、pCAG-1BPNLS-Cas9-Cdt1 および pCAG-1BPNLS-Cas9-Geminin を HEK293 または HeLa 細胞に hCas9 の代わりにトランスフェクトした。細胞周期をヨウ化プロピジウム (PI) (Sigma # P4170) 染色および FACS 分析により、以前の試験に従って決定した。

【0314】

サーベイアッセイ

生成された gRNA1、gRNA2 および gRNA3 の有効性を調査するために、HEK293 細胞においてサーベイアッセイを以前に記載されている通り実施した。

【0315】

早老症マウス胚線維芽細胞 (MEF) の樹立および維持

マウス胚線維芽細胞 (MEF) を E12.5 の早老症 (Lmna G609G/G609G) 胚から単離し、D MEM、10% 熱失活 FBS、1 x Glutamax、1 x MEM 非必須アミノ酸および 1 x ペニシリンストレプトマイシン中、標準の条件で維持した (加湿 5% CO₂ / 95% 空気中 37)。早老症 MEF (継代 5) に、pCAG-1BPNLS-Cas9-1BPNLS-2AGFP、pCAGmCherry-Lmna-gRNA、MC-早老症-SATI、および pLKO-shRNA を、Nucleofection P4 Kit (Lonza # V4XP-4024) を使用してトランスフェクトした。2 日後、トランスフェクトされた細胞をピューロマイシン (最終 1 μ g / mL, Gibco # A11138-03) で処理して、shRNA でトランスフェクトされた細胞を選択し、2 日後に、PicoPure DNA Extraction Kit を使用したゲノム DNA 抽出のために MEF を回収した。

【0316】

成体脳への定位 AAV 注射

8 週齢の早老症 (Lmna G609G/G609G) マウスに、AAV9-nEFFCas9 (5.33 x 10¹³ ゲノムコピー (GC) / mL) と AAV9-早老症-SATI (2.26 x 10¹³ GC / mL) の 1 : 1 混合物を用いて AAV 注射を行った。マウスに 100 mg / kg のケタミン (Putney) および 10 mg / kg のキシラジン (AnaSed Injection) カクテルを用いて腹腔内注射によって麻酔をかけ、外科手術および定位注射のために定位手術 (David Kopf Instruments Model 940 series) においてマウントした。V1 の中央に以下の座標を使用してウイルスを注射した：3.4 mm 吻側、ブレグマに対して 2.6 mm 外側および軟膜から 0.5 ~ 0.7 mm 腹側。AAV 3 μ L を、33 Gauge neurosyringe (Hamilton # 65460-06) を使用して注射した。ウイルス逆流を防止するために、注射した針を注射の完了後 5 ~ 10 分間、脳に残した。注射後、頭蓋骨および皮膚を閉じ、マウスを 37 の温暖なパッド上で回復させた。マウスを 2 週間飼

10

20

30

40

50

育して遺伝子ノックインさせた。3週間後、続く実験のために注射部位を回収し、かつ/またはBlood & Tissue kitを使用してゲノムDNAを抽出した。

【0317】

サンガーシーケンシングによる早老症マウスにおけるoahDR/HITI事象の評価
ゲノムDNAを早老症MEF、初代ニューロン、および脳組織からそれぞれ抽出する。
補正された配列を富化させるために、まず、gRNA標的部位を含む遺伝子ノックイン配
列の接合部位をPrimeSTAR GXL DNAポリメラーゼを用い、以下のプライマ
ーを用いて増幅した：LMNAex11NGS1-F: 5'-TGCATGCCTCTCC
TCAGATTTCCCTGCAACAA-3' およびLMNAex11NGS1-R: 5
'-GATGAGGGTAAAGCCAAGGCAGCAGGACAAA-3'。次いで、
PCR産物を以下のプライマーおよび鑄型として第1のPCR産物を使用して入れ子状に
した。mLMNAex11-F4: 5'-TCCTCAGATTTCCCTGCAACAA
TGTTCTCTTCCCTTGT-3' およびmLMNAex11-R4: 5'-
TGTGACACTGGAGGCAGAAGAGCCAGAGGAGA-3'。このPCR
産物を使用して、未補正の変異のみを認識し得るBstXI酵素(NEB#R0113S
)消化を37で実施した。BstXI消化産物を使用して、gRNA標的部位を含む遺
伝子のみがノックインされた配列の接合部位を以下のプライマーを用いて増幅した：LM
NAenrich2-F: 5'-AACAAATGTTCTCTTCCCTTGTC
CC-3' およびLMNAenrich2-R: 5'-CAGAAGAGCCAGAGGA
GATGGAT-3'。最終的なPCR産物をPCR-Blunt II-TOPOベクタ
ーにZero Blunt TOPOクローニングキットを用いてクローニングした。AB
I 3730×1 sequencer (Applied Biosystems)を使用
してアンプリコンの配列決定を行った。

【0318】

標的化ベクターの遺伝子送達のための静脈内(IV)AAV注射
新生仔(P1)LMNA G609G/G609G(早老症)、LMNA+/G609G(ヘテ
ロ接合性早老症)およびLMNA++(WT)マウスを以前の報告に従ったIV AAV
9注射のために使用した。簡単に述べると、P1マウスに麻酔をかけ、総計30μLのA
AV混合物(AAV9-nEFCas9(2×10¹¹ゲノムコピー(GC))およびA
AV9-早老症-SATI(2×10¹¹GC))を30ゲージのインスリンシリンジ(
Simple Diagnostics#SY139319)を使用し、側頭静脈を介して
注射した。注射後、綿棒を使用して圧力をかけることによって出血を止め、マウスを3
7の温暖なパッド上で回復させた。

【0319】

早老症組織におけるSATIによる補正の遺伝子型決定
SATI媒介性ノックイン事象をサンガーシーケンシングによって調査するために、Blood & Tissue kitを製造者の指示に従って使用してゲノムDNAを抽出した。HITI媒介性遺伝子ノックイン遺伝子座を、PrimeSTAR GXL DNAポリメラーゼを用い、以下のHITI特異的プライマーを用いて増幅した：mLMNAHITI-F1: 5'-CTGCCCTAACCTTCTGCCCTTCCCTAGCC
T-3' およびmLMNAHITI-R1: 5'-ATGATGGGGGAAATAGCC
AGGAAGCCTTCGAAA-3'。内部対照として、Fanca遺伝子を以下のプライマーを用いて増幅した：mFA-3F: 5'-CGGCCTTCCACCATGGCAG
AC-3' およびmFA-3R: 5'-CCATGATCTGCTGACAAAGGACT
G-3'。標的部位におけるインデルの効率および変異の遺伝子補正を決定するために、LMNAイントロン10 gRNA標的部位を、PrimeSTAR GXL DNAポリメラーゼを用い、以下のプライマーを用いて増幅した：mLMNA-F1: 5'-TGCAT
GCTTCTCCTCAGATTTCCCTGCAACAA-3' およびmLMNA-R1
: 5'-GATGAGGGTAAAGCCAAGGCAGCAGGACAAA-3'。PCR
産物をPCR-Blunt II-TOPOベクターにZero Blunt TOPO
ベクターにZero Blunt TOPO

クローニングキットを用いてクローニングした。ABI 3730xl sequence r (Applied Biosystems)を使用してアンプリコンの配列決定を行った。

標的化ディープシーケンシングによる遺伝子補正頻度の測定

【0320】

遺伝子補正効率、インデル効率および大きな欠失を決定するために、注射の100日後の、AAVを感染させたマウス（早老症（Pro）+ドナー、AAV-早老症-SATIのみ；Pro+SATI、AAV-Cas9およびAAV-早老症-SATI）の示されている器官からのgRNA上のカット部位および変異部位を含む比較的大きな断片（1.4kb）を、PrimeSTAR GXL DNAポリメラーゼを使用し、以下のプライマーを用いて増幅した：LMNAex11NGS1-F: 5'-TGCATGCTTCTCC 10
TCAGATTCCCTGCAACAA-3' およびLMNAex11NGS1-R: 5'-GATGAGGGTAAAGCCAAGGCCAGCAGGACAAA-3'。ライブライマー構築のために、PCR産物2μgをdsDNA fragmentase (NEB # M0348)を用いて18分間処理し、AxyPrep Mag Fragment Select Kits (Axygen # 14-223-160)によって精製し、次いで、BGISEQ Whole Genome Sequencingライブライマー調製のための指示に従って調製した。配列決定をBGISEQ-500プラットフォームでペアエンド100 (PE100) 戦略を用いて行った。生データをSOAPnuke v1.5.6により、以下の基準を使用してフィルターにかけた：N率閾値0.05、低品質閾値20 20
、低品質率0.2。各試料の1,000万の鮮明なリードをマッピングして、BWA v 0.7.15を標準の設定で使用してマウス参照配列 (GRCh38.p6)を収容した。編集の状態に関して、アラインメント結果をエクソン11内の標的部位c.1827C > Tの塩基組成について計数した。gRNAカット部位の周囲の全ての挿入および欠失を計数した。配列決定データを分割リード方法によっても分析して、大きな欠失を検出した。簡単に述べると、リードを塩基毎に最小長30bpのペアワイズエンド（分割-リード）に分割し、これらのペアワイズエンドを、Bowtie2 v2.2.5を使用し、パラメーター-k 100を用いて参照とアラインメントした。同じリードからのペアワイズエンドがPCR領域に配列に個々にマッピングし戻される場合、2つのマッピングされた領域の距離を算出し、欠失とコールする。全ての試料にペアワイズエンド分析を行ったが、大きな欠失(>42bp)は見いだされなかった。 30

【0321】

標的化ディープシーケンシングによるオフターゲット変異の測定およびoahDRとHITIの比

AAVを感染させたマウス（Pro+ドナー、AAV-早老症-SATIのみ；Pro+SATI、AAV-Cas9およびAAV-早老症-SATI）において、注射の100日後に、示されている器官からのオントーゲット部位を、PrimeSTAR GXL DNAポリメラーゼを使用して増幅した。オフターゲット効果を決定するために、上位10カ所の予測オフターゲット部位もPrimeSTAR GXL DNAポリメラーゼを使用して増幅した。次いで、AgenCourt AMPure XP (Beckman coulter # A63380) および第2ラウンドPCRを使用してPCRアンプリコンを精製して、 Illumina P5アダプターおよび試料特異的バーコードを付着させた。精製されたPCR産物をHang laboratory (UCSD)でのIllumina MiSeqを使用した単一および/またはペアエンドシーケンシングのために等しい比でプールした。高品質のリード（スコア>23）を挿入および欠失（インデル）事象について分析し、以前に記載されている方法と同様に最尤推定値（MLE）を算出した。簡単に述べると、オフターゲット部位分析のために、平均Phred品質スコアが23の生のリードをそれらのそれぞれのオントーゲット部位またはオフターゲット部位に局所的にアラインメントした。全てのリードがゲノム参照領域の85%とマッチする必要があり、また、20塩基対の標的領域全体、それと共に両方向に5塩基対の隣接領域にわ 40

10

20

30

40

50

たる。次いで、そのような 30 塩基対の領域をインデルについて分析し、以前に記載されているバックグラウンドエラーを補正する方法と同様に最尤推定値方法を使用して最終的なインデル率を算出した。同様の手法を使用してオントーゲット部位を分析した。高品質のリードを gRNA 標的 \pm 5 塩基対内の挿入および欠失について、予測された周囲の 10 塩基対の隣接領域をマッチさせることによって分析した。補正効率を、予測された標的領域内のインデル事象を含有するリード内の SNP の正体を決定するための同様の正確なマッチング手法を使用して決定した。インデルの次世代シーケンシング分析では大きなサイズの欠失および挿入事象を検出することができないので、上記の CRISPR-Cas9 標的化効率および活性は過小評価されている。oahDR 事象と HITI 事象を区別するために、gRNA 標的の配列および変異部位を同じリードで調査し、リードを、gRNA 標的の配列特色ならびに gRNA 標的と変異部位の連結に基づいて 6 つのカテゴリー（すなわち、変異なし、インデル、インデルを伴う oahDR による補正、インデルを伴わない oahDR による補正、インデルを伴う HITI による補正、インデルを伴わない HITI による補正および未確定事象による補正）に分離した。
10

【0322】

標的ディープシーケンシングのデータ利用可能性

本試験についての生の Illumina シーケンシングリードは National Center for Biotechnology Information Short Read Archive に寄託されており、SRA 受託番号 SRR126448 を通じて利用可能である。本試験についての BGISeq-500 シーケンシングリードは CNGBdb の CNGB Nucleotide Sequence Archive (<https://db.cngb.org/cnsa/>) に受託コード CNP0000221 で寄託されている。
20

【0323】

cDNA 末端の 5' - 急速増幅 (RACE) に基づくゲノムワイドオフターゲット分析

SMARTer RACE 5' / 3' Kit (Takara Bio USA, Inc. # 634858) を cDNA 末端の 5' - 急速増幅 (RACE) を実施するために製造者の指示に従って使用した。全 RNA 1 μg をこの反応のために使用した。本実験で使用した Lmna エクソン 11 特異的プライマーは、第 1 の PCR については 5' - GATTAC GCCAAGCTTCCCACACTGCAGGAAGCTTCGAGT - 3'、およびネステッド PCR については 5' - GATTACGCCAAGCTTACACTGGAGGCA GAAGAGGCCAGAGGAGATGGA - 3' であった。PCR 産物を In-Fusion HD Cloning Kit にクローニングした。RACE 断片について ABI 3730xl sequencer (Eton Bioscience, Inc.) を使用して配列決定した。Lmna エクソン 11 の上流に位置する捕捉されたエクソンを UCSC マウスゲノムプラウザ (NCBI 37/mm9) (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=mm9>) にマッピングした。マッピングされた Alb 遺伝子座および Myh6 遺伝子座のクロマチンおよび発現の状態を Encode / LICR からの H3K27ac ChIPSeq および RNASEq ならびに Encode / University of Washington からの DNase I 高感受性部位 (DHS) を使用して分析した。これらのデータを成体 8 週齢のマウスの肝臓または心臓組織から得た。
30

【0324】

RNA 分析

RNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN # 74124) または RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN # 74704) を製造者の指示に従って使用して全 RNA を抽出し、その後、Maxima H Minus cDNA Synthesis Master Mix (Thermo Fisher Scientific # M1681) を使用して cDNA 合成を行った。Taq Man または SYBR グリーン遺伝子発現アッセイを CFX384 Real-Time
40

System C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad) を用いて実施した。本実験で使用した TaqMan プローブ (Thermo Fisher Scientific) は、Gapdh [Mm99999915_g1]、ラミン A [フォワードプライマー：5' - GTGGCAGCTTCGGGGACAAC - 3'、リバースプライマー：5' - AGCAGACAGGAGGTGGCATG TG - 3' およびプローブ：5' - CCCAGGAGGTAGGAGCGGGTGACT - 3']、ラミン C [フォワードプライマー：5' - GCCTTCGCACCGCTCTCATCAC - 3'、リバースプライマー：5' - ATGGAGGTGGGAGAGCTGCCCTAG - 3' およびプローブ：5' - CACCAAGCTTGCATGGCCACTTCT - 3'] およびプロジェクト [フォワードプライマー：5' - TGAGTACAACCTGCGCTCA C - 3'、リバースプライマー：5' - TGGCAGGTCCCCAGATTACAT - 3' およびプローブ：5' - CGGGAGCCCCAGAGCTCCCCAGAA - 3'] であった。A1b 遺伝子発現分析に関しては、SsoAdvanced SYBR Green Super mix (Bio-Rad #1725274) を使用し、以下のプライマーを用いた [フォワードプライマー：5' - CTGTCCTGCAATCCCTGAACCGTGTG - 3' およびリバースプライマー：5' - AAGCATGGCCGCCCTTCC - 3']。まず RT-qPCR のデータセットをハウスキーピング遺伝子である GAPDH によって正規化し、次いで、ラミン A / ラミン C およびプロジェクト / ラミン A の比を得た。Lmn a 遺伝子自体の内因性発現レベルが生理的老化の影響を受けるので、同じ Lmn a 遺伝子転写物を比較した。SATI による処置では、内因性の短い形態のラミン C 転写物が影響を受けることなく変異体エクソンが野生型エクソンで置き換えた後、正規化されたラミン A / ラミン C の比は大きくなるはずである。同様に、変異体エクソンが野生型エクソンで置き換されることにより、正規化されたプロジェクト / ラミン A の比は小さくなるはずである。 10

【0325】

マウス組織の組織学的分析

ヘマトキシリン・エオシン (H & E) 染色のために、マウスを、リン酸緩衝食塩水 (PBS (-))、その後 4% パラホルムアルデヒド (PFA, Sigma #P6148) を使用した経心腔的灌流後に回収した。その後、各器官を解体し、4% PFA を用いて 4 で後固定し、パラフィン包埋した。パラフィン切片を標準のプロトコールで H & E 染色に使用した。 20

【0326】

心拍数分析

心拍数を分析するために、マウスに 2.5% イソフルラン (HENRY SCHEIN #NDC11695-6776-1) を用いて麻酔をかけ、Power Lab data acquisition instrument with Chat 5 for Windows (AD Instruments) を使用して心拍数をモニタリングした。LabChart 8 (AD Instruments) を使用してデータを処理し、分析した。 30

【0327】

筋肉内 (IM) AAV 注射

10 週齢の早老症 (Lmna G609G / G609G) マウスにケタミン (100 mg / kg) およびキシラジン (10 mg / kg) の腹腔内注射を用いて麻酔をかけた。後肢の前の四頭筋のごく一部を外科的に露出させた。AAV 混合物 (Pro-Cas9、AAV-早老症 - SATI (1.5×10^{10} GC) のみ; Pro+Cas9、AAV-Cas9 (1.5×10^{10} GC) および AAV-早老症 - SATI (1.5×10^{10} GC)) を前脛骨 (TA) 筋に 29 ゲージのインスリンシリンジを使用して注射した。対照として、同じ体積の PBS を野生型 B6 TA 筋に注射した。注射後、皮膚を閉じ、マウスを 37 の温暖なパッド上で回復させた。3 週間後、組織学的分析のために注射部位を回収した。 40

【0328】

筋線維分析

TA筋注射の3週間後、マウスを安樂死させ、組織学的分析のためにTA筋を解体し、処理した。NIH Image J (Fiji) ソフトウェアを使用して筋線維領域を手動で分析し、Microsoft Excelによって処理した。各筋肉について各300の筋線維を測定した。

【0329】

尾端線維芽細胞 (TTF) の樹立および維持

TTFをLmna^{+/+} (WT)、Lmna^{G609G/G609G} (早老症)、およびAV-早老症-SATIで処置したLmna^{G609G/G609G} (早老症+SATI) マウスから70日目に単離し、以前に記載されている通り樹立した。TTFを、D MEM、10%熱失活FBS、1×Glutamax、1×MEM非必須アミノ酸および1×ペニシリン-ストレプトマイシン中、37°で維持した。

【0330】

TTFのウエスタンプロット分析

ウエスタンプロッティングを、以前に記載されている通り実施した。簡単に述べると、タンパク質試料をコンフルエントなTTFからRIPA緩衝液を用いて回収した。タンパク質濃度をBradford Reagent (Sigma # B6916-500ML) によって測定した。総計10 μgのタンパク質を4%~12% Bis-Tris Gel (Invitrogen # NP0321BOX) にローディングした。転写したPVDFメンブレン (EMD Millipore # IPVH00010) を3%脱脂乳 (RPI # M17200) でブロッキングし、一次抗体の抗ラミンA/C [1:1,000] (E-1、Santa Cruz # sc-376248)と共に4°で終夜インキュベートした。HRP-抗マウスIgG抗体 [1:4,000] (Cell signaling # 7076S) を二次抗体として使用した。プロットを室温で1時間インキュベートし、ECL (GE healthcare # RP N2232) によって展開させた。内部対照として、抗アクチン抗体 [1:4000] (Santa Cruz # sc-47778) およびHRP-抗マウスIgG二次抗体 [1:4,000] (Cell signaling # 7076S) を使用した。

【0331】

TTFの免疫細胞化学

TTF (継代5) 1×10⁴個を12ウェルプレート中のカバーガラス (Fisher brand # 12-545-82 12 CIR-1D) 上に播種した。2日間のインキュベーション後、カバーガラスをPBS (-) で2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) を用いて室温で30分にわたって固定し、次いで、ブロッキング緩衝液 (PBS (-) 中0.2% Triton X-100、pH 7.4) を用いて室温で1時間処理し、その後、PBS (-) 中に希釈した一次抗体と一緒に4°で終夜インキュベートした。本試験で使用した一次抗体は [1:150] 抗ラミンA/C (E-1、Santa Cruz # sc-376248) であった。切片をPBS (-) 中で3回洗浄し、[1:500] Alexa Fluor 488ヤギ抗マウス (Life technology # 11001) と [1:2,000] Hoechst 33342 (Thermo Fisher # H3570) とコンジュゲートした二次抗体を用いて室温で30分間処理した。PBS (-) で3回、逐次的に洗浄した後、切片をProLong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen # P36970) でマウントした。

【0332】

TTFおよび組織の画像の取得および処理

各組織のH&E染色の代表的な写真をOlympus IX51で取得した。TTFの免疫細胞化学試料の代表的な写真を共焦点顕微鏡でZeiss LSM 710 Laser Scanning Confocal Microscopeを使用して取得した。各試料から少なくとも5枚の写真を得た。定量化に関して、正確なn値が各図に記載されている。画像をZEN 2 Black edition software (Zeiss)、およびNIH Image J (Fiji) ソフトウェアにより、実験要件に従って処理し

10

20

20

30

40

40

50

た。ウエスタンブロッティングバンドをN I H I m a g e J (F I J I) ソフトウェアによって分析した。

【0333】

統計分析

平均値 (a v e r a g e) (平均 (m e a n)) 、 標準偏差 (s . d .) 、 平均の標準誤差 (s . e . m .) および Microsoft Excel または GraphPad Prism version 7.03 for Windows (GraphPad Software, www. graphpad. com) を使用した絶対値に対する対応のないスチュードントの t 検定に基づく統計的有意性。一元配置ANOVA、その後のボンフェローニの多重比較検定、チューキー多重比較検定、およびログランク (マンテル・コックス) 検定を GraphPad Prism version 7.03 for Windows を使用して実施した。

【0334】

本発明の好ましい実施形態が本明細書において示され、記載されているが、そのような実施形態が単に例として提供されていることは当業者には明白であろう。当業者は、本発明から逸脱することなく多数の変形、変化および置換をすぐに思いつくであろう。本明細書に記載の実施形態に対する種々の代替を使用することができることが理解されるべきである。以下の特許請求の範囲により本発明の範囲が規定されること、および、それによりこれらの特許請求の範囲の方法ならびに構造およびその均等物が包含されることが意図されている。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

細胞内の標的ゲノムを編集する方法であって、前記細胞を (i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および (ii) 標的化エンドヌクレアーゼと接触させるステップを含み、前記置換え配列が、前記標的ゲノムと比較して少なくとも 1 つのヌクレオチドの差異を含み、前記標的ゲノムが、前記標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む、方法。

(項目2)

前記单一相同アーム構築物により前記標的ゲノムの少なくとも一部分が置き換えられる項目1に記載の方法。

(項目3)

前記標的化エンドヌクレアーゼが、 C R I S P R ヌクレアーゼ、 T A L E N ヌクレアーゼ、 D N A によりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される、項目1または項目2に記載の方法。

(項目4)

前記 C R I S P R ヌクレアーゼが、 C a s 9 、 C a s 1 2 a (C p f 1) 、 C a s 1 2 b (c 2 c 1) 、 C a s 1 2 c (c 2 c 3) 、 C a s 1 2 g 、 C a s 1 2 i 、 C a s 1 4 、 C a s 1 0 、 C a s 3 、 C a s X 、 C a s Y 、 C s f 1 、 C a s 1 3 a (c 2 c 2) 、 C a s 1 3 b (c 2 c 6) 、 C a s 1 3 c (c 2 c 7) 、 c 2 c 4 、 c 2 c 5 、 c 2 c 8 、 c 2 c 9 、 c 2 c 1 0 、 C a s 1 0 、 C A S T および T n 6 6 7 7 からなる群より選択される、項目3に記載の方法。

(項目5)

前記細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む、項目3または項目4に記載の方法。

(項目6)

前記ガイドオリゴヌクレオチドが、ガイド R N A である、項目5に記載の方法。

(項目7)

前記置換え配列が、前記標的ゲノムと比較して单一ヌクレオチド差異を含む、項目1から6までのいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

10

20

30

40

50

一塩基差異が、置換、挿入、および欠失のうちの1つから選択される、項目7に記載の方法。

(項目9)

前記置換配列が、前記標的ゲノムと比較して、置換、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む、項目1から8までのいずれか一項に記載の方法。

(項目10)

前記置換配列が、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む、項目1から9までのいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

前記置換配列が、前記標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある前記遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む、項目1から10までのいずれか一項に記載の方法。

10

(項目12)

前記細胞が、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臓ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T細胞、B細胞、NK細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、閑門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臓脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの1つまたは複数から選択される、項目1から11までのいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記単一相同アーム構築物、前記ガイドオリゴヌクレオチド、および前記標的化エンドヌクレアーゼが、構築物内にコードされている、項目1から12までのいずれか一項に記載の方法。

20

(項目14)

前記構築物が、ウイルス構築物である、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記ウイルス構築物が、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである、項目14に記載の方法。

(項目16)

前記構築物が、非ウイルス構築物である、項目13に記載の方法。

(項目17)

前記非ウイルス構築物が、ミニサークルまたはプラスミドである、項目16に記載の方法。

30

(項目18)

前記細胞を *in vivo* で接触させる、項目1から17までのいずれか一項に記載の方法。

(項目19)

前記細胞を *in vitro* で接触させる、項目1から17までのいずれか一項に記載の方法。

(項目20)

前記細胞が被験体由来のものである、項目1から19までのいずれか一項に記載の方法。

40

(項目21)

前記被験体が、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ラット、またはマウスである、項目20に記載の方法。

(項目22)

前記被験体が、前記置換配列と相同な遺伝子に変異を有する、項目20または21に記載の方法。

(項目23)

遺伝子に変異を有する被験体における遺伝子疾患を処置する方法であって、前記被験体由来の細胞を、(i)置換配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および(ii)標的化エンドヌクレアーゼと接触させるステップを含み、

50

前記置換え配列が、前記遺伝子の野生型配列を含み、前記遺伝子が、前記標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む、方法。

(項目24)

前記单一相同アーム構築物により前記遺伝子の少なくとも一部分が置き換えられる、項目23に記載の方法。

(項目25)

前記標的化エンドヌクレアーゼが、C R I S P R ヌクレアーゼ、T A L E N ヌクレアーゼ、D N A によりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される、項目23または項目24に記載の方法。

(項目26)

前記C R I S P R ヌクレアーゼが、C a s 9 、C a s 1 2 a (C p f 1) 、C a s 1 2 b (c 2 c 1) 、C a s 1 2 c (c 2 c 3) 、C a s 1 2 g 、C a s 1 2 i 、C a s 1 4 、C a s 1 0 、C a s 3 、C a s X 、C a s Y 、C s f 1 、C a s 1 3 a (c 2 c 2) 、C a s 1 3 b (c 2 c 6) 、C a s 1 3 c (c 2 c 7) 、c 2 c 4 、c 2 c 5 、c 2 c 8 、c 2 c 9 、c 2 c 1 0 、C a s 1 0 、C A S T およびT n 6 6 7 7 からなる群より選択される、項目25に記載の方法。

10

(項目27)

前記細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む、項目25または項目26に記載の方法。

(項目28)

前記ガイドオリゴヌクレオチドが、ガイドR N A である、項目27に記載の方法。

20

(項目29)

前記変異が、前記標的ゲノムと比較して单一ヌクレオチド差異を含む、項目23から28までのいずれか一項に記載の方法。

(項目30)

前記单一ヌクレオチド差異が、置換、挿入、および欠失のうちの1つから選択される、項目29に記載の方法。

(項目31)

前記変異が、前記標的ゲノムと比較して、置換、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む、項目23から30までのいずれか一項に記載の方法。

30

(項目32)

前記置換え配列が、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む、項目23から31までのいずれか一項に記載の方法。

(項目33)

前記置換え配列が、前記標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある前記遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む、項目23から32までのいずれか一項に記載の方法。

(項目34)

前記細胞が、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臓ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T細胞、B細胞、N K 細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、闕門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臓脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの1つまたは複数から選択される、項目23から33までのいずれか一項に記載の方法。

40

(項目35)

前記单一相同アーム構築物、前記ガイドオリゴヌクレオチド、および前記標的化エンドヌクレアーゼが、構築物内にコードされている、項目23から34までのいずれか一項に記載の方法。

(項目36)

前記構築物が、ウイルス構築物である、項目35に記載の方法。

(項目37)

50

前記ウイルス構築物が、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである、項目36に記載の方法。

(項目38)

前記構築物が、非ウイルス構築物である、項目35に記載の方法。

(項目39)

前記非ウイルス構築物が、ミニサークルまたはプラスミドである、項目38に記載の方法。

(項目40)

前記細胞をin vivoで接触させる、項目23から39までのいずれか一項に記載の方法。

10

(項目41)

前記細胞をin vitroで接触させる、項目23から40までのいずれか一項に記載の方法。

(項目42)

前記細胞が、非分裂細胞である、項目23から41までのいずれか一項に記載の方法。

(項目43)

前記被験体が、ヒト、非ヒト靈長類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギラット、またはマウスである、項目42に記載の方法。

(項目44)

前記遺伝子疾患が、軟骨無形成症、アルファ1アンチトリプシン欠損症、アルツハイマー病、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性囊胞腎、乳がん、がん、シャルコー・マリー・トゥース、結腸がん、ネコ鳴き症候群、クローン病、囊胞性線維症、ダーカム病、ダウン症候群、デュアン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第V因子ライデン血栓形成傾向、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱X症候群、ゴーシェ病、ヘモクロマトーシス、血友病、全前脳症、ハンチントン病、クラインフェルタ症候群、レーバー先天黒内障、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、ヌーナン症候群、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、ポーランド異常、ポルフィリン症、早老症、前立腺がん、網膜色素変性症、重症複合免疫不全症(SCID)、鎌状赤血球症、皮膚がん、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、ティ・サックス、サラセミア、トリメチルアミン尿症、ターナー症候群、口蓋心顎面症候群、WAGR症候群、およびウィルソン病から選択される、項目23から43までのいずれか一項に記載の方法。

20

(項目45)

遺伝子疾患の処置に使用するための、(i)置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む単一相同アーム構築物；および(ii)標的化エンドヌクレアーゼを含む組成物であって、前記置換え配列が、標的ゲノムと比較して少なくとも1つのヌクレオチドの差異を含み、前記標的ゲノムが、前記標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同的な配列を含む、組成物。

30

(項目46)

前記単一相同アーム構築物により前記遺伝子の少なくとも一部分が置き換えられる、項目45に記載の組成物。

40

(項目47)

前記標的化エンドヌクレアーゼが、CRISPRヌクレアーゼ、TALENヌクレアーゼ、DNAによりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される、項目45または項目46に記載の組成物。

(項目48)

前記CRISPRヌクレアーゼが、Cas9、Cas12a(Cpf1)、Cas12b(c2c1)、Cas12c(c2c3)、Cas12g、Cas12i、Cas14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Csf1、Cas13a(c2c2)、Cas13b(c2c6)、Cas13c(c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8

50

c 2 c 9、c 2 c 10、Cas 10、CAST および Tn 6 6 7 7 からなる群より選択される、項目 4 7 に記載の組成物。

(項目 4 9)

前記細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む、項目 4 7 または項目 4 8 に記載の組成物。

(項目 5 0)

前記ガイドオリゴヌクレオチドが、ガイド RNA である、項目 4 9 に記載の組成物。

(項目 5 1)

前記遺伝子疾患が、前記標的ゲノムと比較して単一ヌクレオチド差異を含む変異によって引き起こされるものである、項目 4 5 から 5 0 までのいずれか一項に記載の組成物。

10

(項目 5 2)

前記単一ヌクレオチド差異が、置換、挿入、および欠失のうちの 1 つから選択される、項目 5 1 に記載の組成物。

(項目 5 3)

前記遺伝子疾患が、置換、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む変異によって引き起こされるものである、項目 4 5 から 5 2 までのいずれか一項に記載の組成物。

20

(項目 5 4)

前記置換配列が、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む、項目 4 5 から 5 3 までのいずれか一項に記載の組成物。

(項目 5 5)

前記置換配列が、前記標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある前記遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む、項目 4 5 から 5 4 までのいずれか一項に記載の組成物。

30

(項目 5 6)

幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臓ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、閨門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臓脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの 1 つまたは複数から選択される細胞を標的とするものである、項目 4 5 から 5 5 までのいずれか一項に記載の組成物。

30

(項目 5 7)

前記単一相同アーム構築物、前記ガイドオリゴヌクレオチド、および前記標的化エンドヌクレアーゼが、構築物内にコードされている、項目 4 5 から 5 6 までのいずれか一項に記載の組成物。

(項目 5 8)

前記構築物が、ウイルス構築物である、項目 5 7 に記載の組成物。

(項目 5 9)

前記ウイルス構築物が、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである、項目 5 8 に記載の組成物。

40

(項目 6 0)

前記構築物が、非ウイルス構築物である、項目 5 7 に記載の組成物。

(項目 6 1)

前記非ウイルス構築物が、ミニサークルまたはプラスミドである、項目 6 0 に記載の組成物。

(項目 6 2)

前記遺伝子疾患が、軟骨無形成症、アルファ 1 アンチトリプシン欠損症、アルツハイマー病、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性囊胞腎、乳がん、がん、シャルコー・マリー・トゥース、結腸がん、ネコ鳴き症候群、クローン病、囊胞性線維症、ダーカム病、ダウン症候群、デュアン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第 V 因子ライデン血栓形成傾向、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱 X 症候群、ゴー

50

シェ病、ヘモクロマトーシス、血友病、全前脳症、ハンチントン病、クラインフェルタ症候群、レーバー先天黒内障、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、ヌーナン症候群、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、ポーランド異常、ポルフィリン症、早老症、前立腺がん、網膜色素変性症、重症複合免疫不全症（S C I D）、鎌状赤血球症、皮膚がん、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、ティ・サックス、サラセミア、トリメチルアミン尿症、ターナー症候群、口蓋心顔面症候群、W A G R 症候群、およびウィルソン病から選択される、項目 4 5 から 6 1 までのいずれか一項に記載の組成物。

（項目 6 3）

（i）置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および（ii）標的化エンドヌクレアーゼを含む組成物であって、前記置換え配列が、標的ゲノムと比較して少なくとも 1 つのヌクレオチドの差異を含み、前記標的ゲノムが、前記標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む、組成物。

10

（項目 6 4）

細胞を含む、項目 6 3 に記載の組成物。

（項目 6 5）

前記单一相同アーム構築物、ガイドオリゴヌクレオチド、および前記標的化エンドヌクレアーゼが、構築物内にコードされている、項目 6 3 または項目 6 4 に記載の組成物。

（項目 6 6）

前記構築物が、ウイルス構築物である、項目 6 5 に記載の組成物。

20

（項目 6 7）

前記ウイルス構築物が、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである、項目 6 6 に記載の組成物。

（項目 6 8）

前記構築物が、非ウイルス構築物である、項目 6 5 に記載の組成物。

（項目 6 9）

前記非ウイルス構築物が、ミニサークルまたはプラスミドである、項目 6 8 に記載の組成物。

（項目 7 0）

薬学的に許容される緩衝液または賦形剤をさらに含む、項目 6 3 から 6 9 までのいずれか一項に記載の組成物。

30

（項目 7 1）

前記標的化エンドヌクレアーゼが、C R I S P R ヌクレアーゼ、T A L E N ヌクレアーゼ、D N A によりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される、項目 6 3 から 7 0 までのいずれか一項に記載の組成物。

（項目 7 2）

前記C R I S P R ヌクレアーゼが、C a s 9 、C a s 1 2 a (C p f 1) 、C a s 1 2 b (c 2 c 1) 、C a s 1 2 c (c 2 c 3) 、C a s 1 2 g 、C a s 1 2 i 、C a s 1 4 、C a s 1 0 、C a s 3 、C a s X 、C a s Y 、C s f 1 、C a s 1 3 a (c 2 c 2) 、C a s 1 3 b (c 2 c 6) 、C a s 1 3 c (c 2 c 7) 、c 2 c 4 、c 2 c 5 、c 2 c 8 、c 2 c 9 、c 2 c 1 0 、C a s 1 0 、C A S T およびT n 6 6 7 7 からなる群より選択される、項目 7 1 に記載の組成物。

40

（項目 7 3）

ガイドオリゴヌクレオチドをさらに含む、項目 7 2 に記載の組成物。

（項目 7 4）

項目 6 3 から 7 3 までのいずれか一項に記載の組成物および使用についての指示を含むキット。

（項目 7 5）

置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物を含む核酸分子であって、前記置換え配列が、標的ゲノムと比較して少なくとも 1 つのヌクレオ

50

チドの差異を含む、核酸分子。

(項目 7 6)

ガイドオリゴヌクレオチドをコードする配列をさらに含む、項目 7 5 に記載の核酸分子。

(項目 7 7)

標的化エンドヌクレアーゼをコードする配列をさらに含む、項目 7 5 または項目 7 6 に記載の核酸分子。

(項目 7 8)

ウイルス構築物である、項目 7 5 から 7 7 までのいずれか一項に記載の核酸分子。

(項目 7 9)

前記ウイルス構築物が、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである、項目 7 8 に記載の核酸分子。

10

(項目 8 0)

非ウイルス構築物である、項目 7 4 から 7 7 までのいずれか一項に記載の核酸分子。

(項目 8 1)

前記非ウイルス構築物が、ミニサークルまたはプラスミドである、項目 8 0 に記載の核酸分子。

(項目 8 2)

項目 7 5 から 8 1 までのいずれか一項に記載の核酸分子および使用についての指示を含むキット。

(項目 8 3)

細胞内の標的ゲノムを編集するための相同組換え修復方法であって、前記細胞を (i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および (ii) 標的化エンドヌクレアーゼと接触させるステップを含み、前記置換え配列が、前記標的ゲノムと比較して少なくとも 1 つのヌクレオチドの差異を含み、前記標的ゲノムが、前記標的化エンドヌクレアーゼ切断部位と相同的な配列を含み、前記置換え配列が、相同組換え修復タンパク質を使用して前記標的ゲノム内に組み込まれる、方法。

20

(項目 8 4)

前記单一相同アーム構築物により前記標的ゲノムの少なくとも一部分が置き換えられる、項目 8 3 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記標的化エンドヌクレアーゼが、CRISPR ヌクレアーゼ、TALEN ヌクレアーゼ、DNA によりガイドされるヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびジンクフィンガーヌクレアーゼから選択される、項目 8 3 または項目 8 4 に記載の方法。

30

(項目 8 6)

前記 CRISPR ヌクレアーゼが、Cas9、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (c2c1)、Cas12c (c2c3)、Cas12g、Cas12i、Cas14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Csf1、Cas13a (c2c2)、Cas13b (c2c6)、Cas13c (c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8、c2c9、c2c10、Cas10、CAST および Tn6677 からなる群より選択される、項目 8 5 に記載の方法。

40

(項目 8 7)

前記細胞をガイドオリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む、項目 8 5 または項目 8 6 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記ガイドオリゴヌクレオチドが、ガイド RNA である、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記置換え配列が、前記標的ゲノムと比較して单一ヌクレオチド差異を含む、項目 8 3 から 8 8 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 0)

一塩基差異が、置換、挿入、および欠失のうちの 1 つから選択される、項目 8 9 に記載

50

の方法。

(項目 9 1)

前記置換え配列が、前記標的ゲノムと比較して、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む、項目 8 3 から 9 0 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 2)

前記置換え配列が、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む、項目 8 3 から 9 1 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 3)

前記置換え配列が、前記標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある前記遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む、項目 8 3 から 9 2 までのいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 9 4)

前記細胞が、幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臍ベータ細胞、リンパ球、単球、好中球、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、閨門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臍脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの 1 つまたは複数から選択される、項目 8 3 から 9 3 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 9 5)

前記单一相同アーム構築物、前記ガイドオリゴヌクレオチド、および前記標的化エンドヌクレアーゼが、構築物内にコードされている、項目 8 3 から 9 4 までのいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 9 6)

前記構築物が、ウイルス構築物である、項目 9 5 に記載の方法。

(項目 9 7)

前記ウイルス構築物が、アデノ隨伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 9 8)

前記構築物が、非ウイルス構築物である、項目 9 5 に記載の方法。

(項目 9 9)

前記非ウイルス構築物が、ミニサークルまたはプラスミドである、項目 9 8 に記載の方法。

30

(項目 1 0 0)

前記細胞を *in vivo* で接触させる、項目 8 3 から 9 9 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0 1)

前記細胞を *in vitro* で接触させる、項目 8 3 から 1 0 0 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0 2)

前記細胞が被験体由来のものである、項目 8 3 から 1 0 1 までのいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 1 0 3)

前記被験体が、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ、ラット、またはマウスである、項目 1 0 2 に記載の方法。

(項目 1 0 4)

前記被験体が、前記置換え配列と相同な遺伝子に変異を有する、項目 1 0 2 または項目 1 0 3 に記載の方法。

(項目 1 0 5)

遺伝子疾患の処置に使用するための、(i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む、相同組換え修復のために構成された单一相同アーム構築物；および(ii) 標的化エンドヌクレアーゼを含む組成物であって、前記置換え配列が、標的ゲノムと

50

比較して少なくとも 1 つのスクレオチドの差異を含み、前記標的ゲノムが、前記標的化エンドスクレアーゼ切断部位と相同な配列を含む、組成物。

(項目 106)

前記単一相同アーム構築物により相同組換え修復が使用されて、前記遺伝子の少なくとも一部分が置き換えられる、項目 45 に記載の組成物。

(項目 107)

前記標的化エンドスクレアーゼが、CRISPR スクレアーゼ、TALEN スクレアーゼ、DNA によりガイドされるスクレアーゼ、メガスクレアーゼ、およびジンクフィンガースクレアーゼから選択される、項目 45 または項目 46 に記載の組成物。

(項目 108)

前記 CRISPR スクレアーゼが、Cas9、Cas12a (Cpf1)、Cas12b (c2c1)、Cas12c (c2c3)、Cas12g、Cas12i、Cas14、Cas10、Cas3、CasX、CasY、Casf1、Cas13a (c2c2)、Cas13b (c2c6)、Cas13c (c2c7)、c2c4、c2c5、c2c8、c2c9、c2c10、Cas10、CAST および Tn6677 からなる群より選択される、項目 47 に記載の組成物。

(項目 109)

前記細胞をガイドオリゴスクレオチドと接触させるステップをさらに含む、項目 47 または項目 48 に記載の組成物。

(項目 110)

前記ガイドオリゴスクレオチドが、ガイド RNA である、項目 49 に記載の組成物。

(項目 111)

前記遺伝子疾患が、前記標的ゲノムと比較して单一スクレオチド差異を含む変異によって引き起こされるものである、項目 45 から 50 までのいずれか一項に記載の組成物。

(項目 112)

前記単一スクレオチド差異が、置換、挿入、および欠失のうちの 1 つから選択される、項目 51 に記載の組成物。

(項目 113)

前記遺伝子疾患が、挿入、逆位、転座、重複、または欠失を含む変異によって引き起こされるものである、項目 45 から 52 までのいずれか一項に記載の組成物。

(項目 114)

前記置換配列が、イントロンの少なくとも一部分およびエクソンの少なくとも一部分を含む、項目 45 から 53 までのいずれか一項に記載の組成物。

(項目 115)

前記置換配列が、前記標的ゲノムの遺伝子内の変異の下流にある前記遺伝子の全てのイントロンおよびエクソンを含む、項目 45 から 54 までのいずれか一項に記載の組成物。

(項目 116)

幹細胞、ニューロン、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、臍臍ベータ細胞、リンパ球、单球、好中球、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、肥満細胞、形質細胞、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、網膜細胞、閑門細胞、ホルモン分泌細胞、グリア細胞、肝臍脂肪細胞、分泌細胞、泌尿器細胞、細胞外マトリックス細胞、ナース細胞、間質細胞、精母細胞、および卵母細胞のうちの 1 つまたは複数から選択される細胞を標的とするものである、項目 45 から 55 までのいずれか一項に記載の組成物。

(項目 117)

前記単一相同アーム構築物、前記ガイドオリゴスクレオチド、および前記標的化エンドスクレアーゼが、構築物内にコードされている、項目 45 から 56 までのいずれか一項に記載の組成物。

(項目 118)

前記構築物が、ウイルス構築物である、項目 57 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

(項目 119)

前記ウイルス構築物が、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、またはレトロウイルスである、項目 58 に記載の組成物。

(項目 120)

前記構築物が、非ウイルス構築物である、項目 57 に記載の組成物。

(項目 121)

前記非ウイルス構築物が、ミニサークルまたはプラスミドである、項目 60 に記載の組成物。

(項目 122)

前記遺伝子疾患が、軟骨無形成症、アルファ 1 アンチトリプシン欠損症、アルツハイマー病、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性囊胞腫、乳がん、がん、シャルコー・マリー・トゥース、結腸がん、ネコ鳴き症候群、クローン病、囊胞性線維症、ダーカム病、ダウン症候群、デュアン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第 V 因子ライデン血栓形成傾向、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱 X 症候群、ゴーシェ病、ヘモクロマトーシス、血友病、全前脳症、ハンチントン病、クラインフェルター症候群、レーバー先天黒内障、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、ヌーナン症候群、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、ポーランド異常、ポルフィリン症、早老症、前立腺がん、網膜色素変性症、重症複合免疫不全症 (SCID)、鎌状赤血球症、皮膚がん、脊髄性筋萎縮症、スタルガルト病、ティ・サックス、サラセミア、トリメチルアミン尿症、ターナー症候群、口蓋心顔面症候群、WAGR 症候群、およびウィルソン病から選択される、項目 45 から 61 までのいずれか一項に記載の組成物。

10

(項目 123)

細胞内のラミン A 遺伝子を編集する方法であって、前記細胞を、(i) ラミン A 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および (ii) 標的化エンドヌクレアーゼと接触させるステップを含み、前記置換え配列が、表 2 に提示される配列と少なくとも 90 % 相同な核酸配列を含む、方法。

(項目 124)

ラミン A 遺伝子に変異を有する被験体における早老症を処置する方法であって、前記被験体由来の細胞を、(i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および (ii) 標的化エンドヌクレアーゼと接触させるステップを含み、前記置換え配列が、表 2 に提示される配列と少なくとも 90 % 相同な核酸配列を含む、方法。

30

(項目 125)

遺伝子疾患の処置に使用するための、(i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および (ii) 標的化エンドヌクレアーゼを含む組成物であって、前記置換え配列が、表 2 に提示される配列と少なくとも 90 % 相同な核酸配列を含む、組成物。

(項目 126)

(i) 置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物；および (ii) 標的化エンドヌクレアーゼを含む組成物であって、前記置換え配列が、表 2 に提示される配列と少なくとも 90 % 相同な核酸配列を含む、組成物。

40

(項目 127)

項目 126 に記載の組成物および使用についての指示を含むキット。

(項目 128)

置換え配列と標的化エンドヌクレアーゼ切断部位とを含む单一相同アーム構築物を含む核酸分子であって、前記置換え配列が、表 2 に提示される配列と少なくとも 90 % 相同な核酸配列を含む、核酸分子。

(項目 129)

項目 128 に記載の核酸分子および使用についての指示を含むキット。

50

【図面】

【図 1 A】

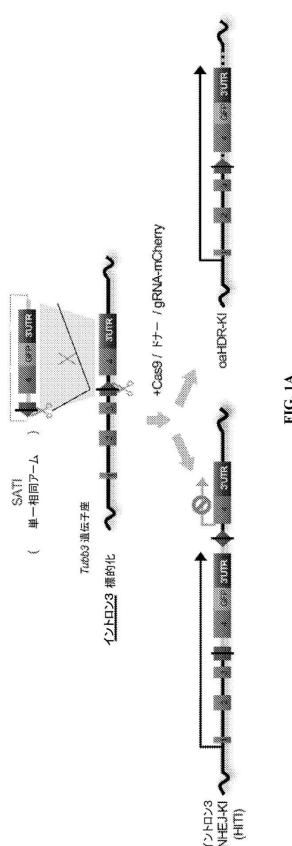


FIG. 1A

【図 1 B】

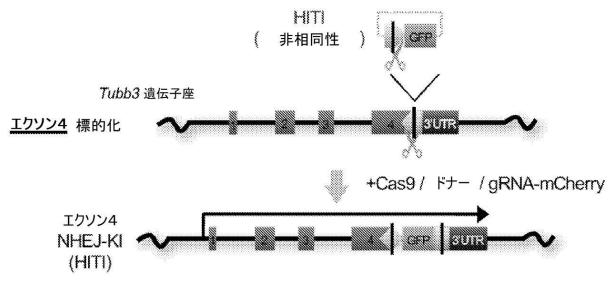


FIG. 1B

10

20

【図 1 C】

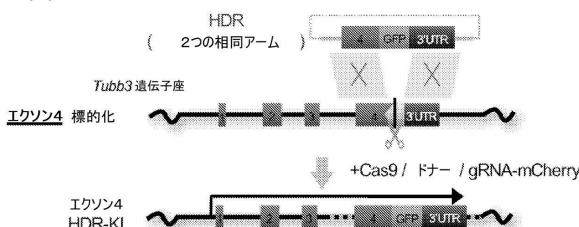
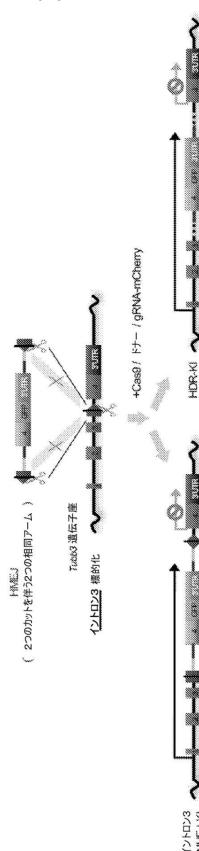


FIG. 1C

【図 1 D】



30

40

50

【図 1 E】

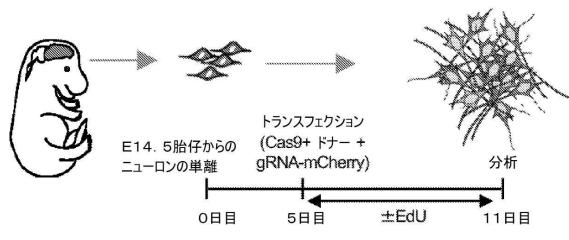


FIG. 1E

【図 1 F】

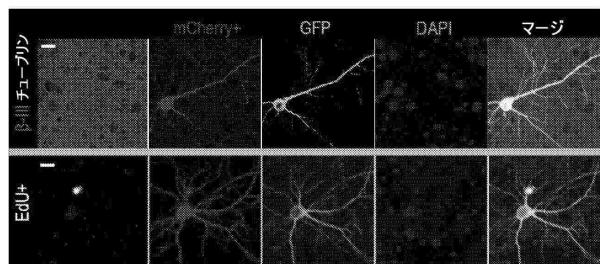


FIG. 1F

10

【図 1 G】

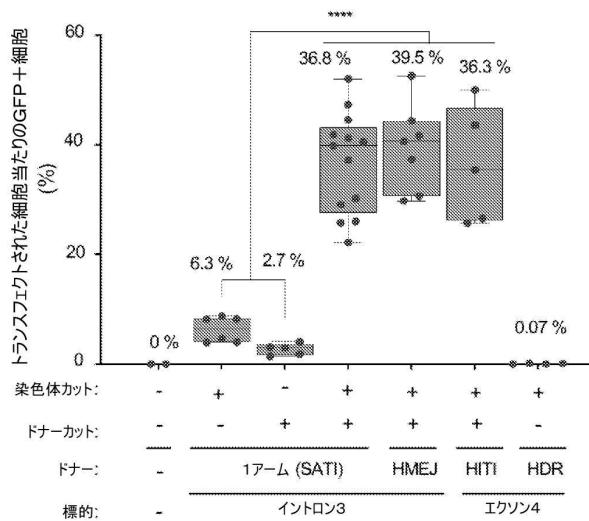


FIG. 1G

【図 1 H】

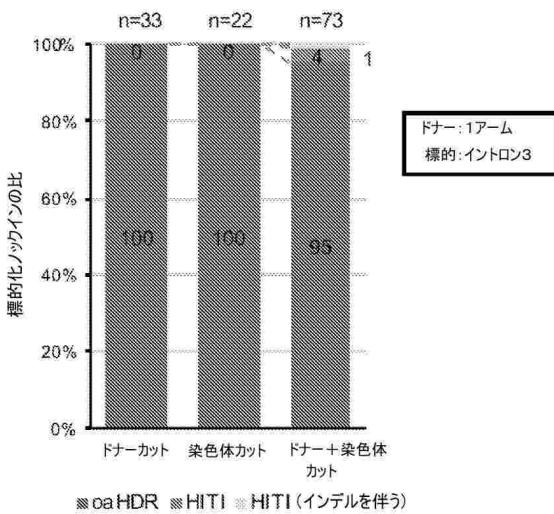


FIG. 1H

20

30

40

50

【図 2 A】

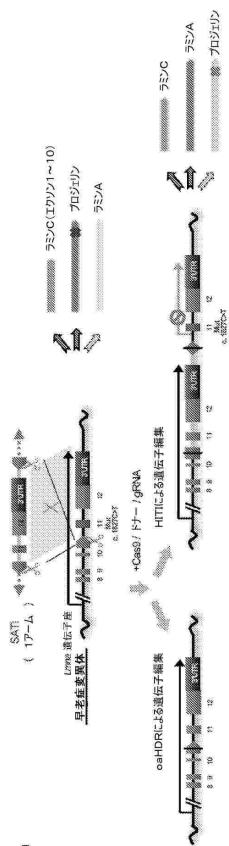


FIG. 2A

【図 2 B】

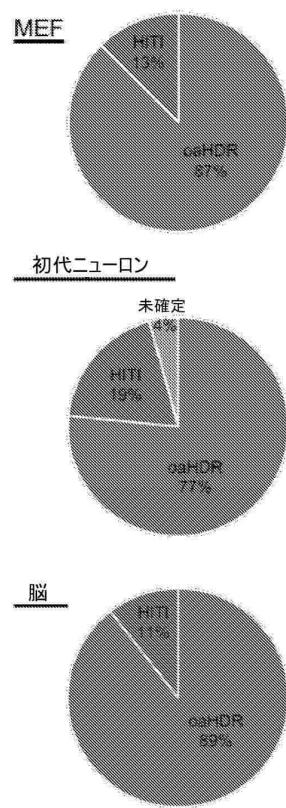


FIG. 2B

10

20

30

【図 2 C】

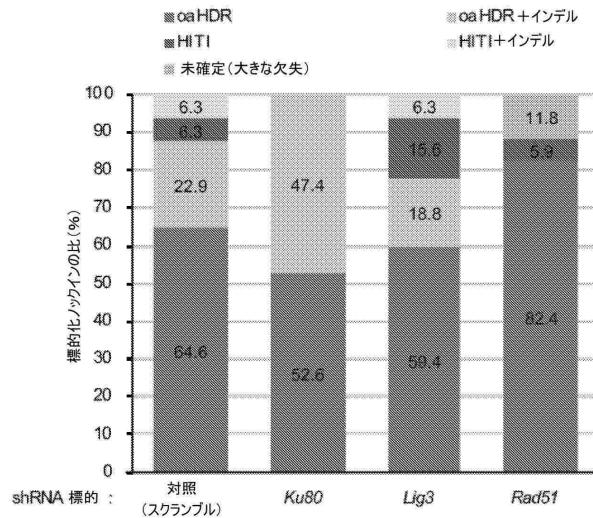


FIG. 2C

40

【図 2 D】

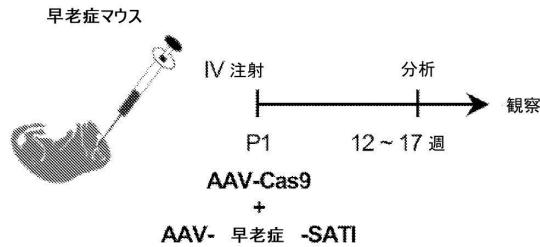


FIG. 2D

50

【図 2 E】

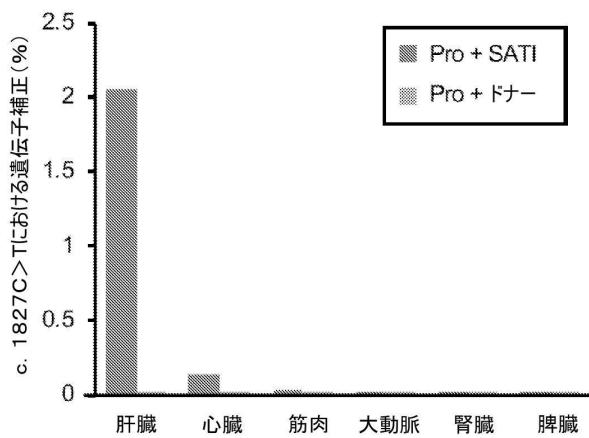


FIG. 2E

【図 2 F】

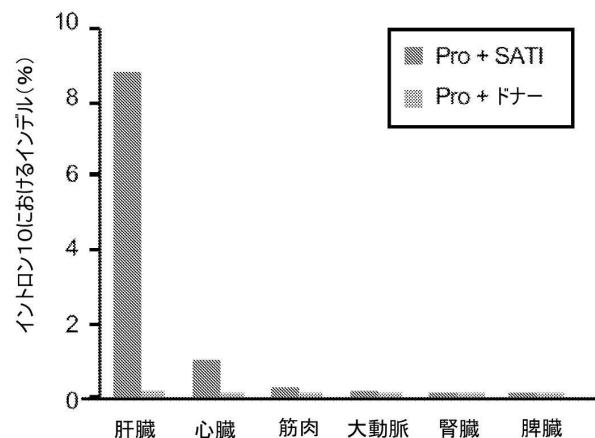


FIG. 2F

10

【図 2 G】

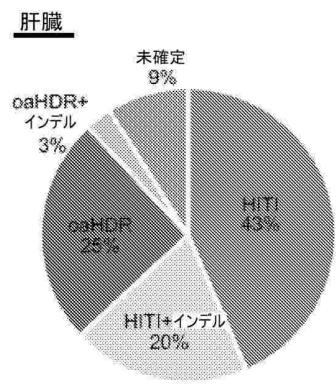
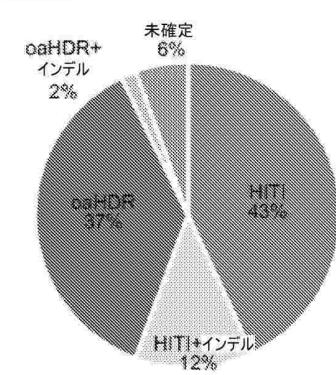
心臓

FIG. 2G

【図 3 A】

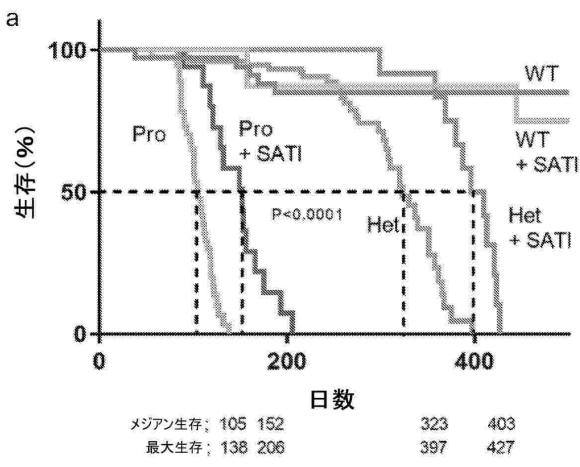


FIG. 3A

20

30

40

50

【図 3 B】

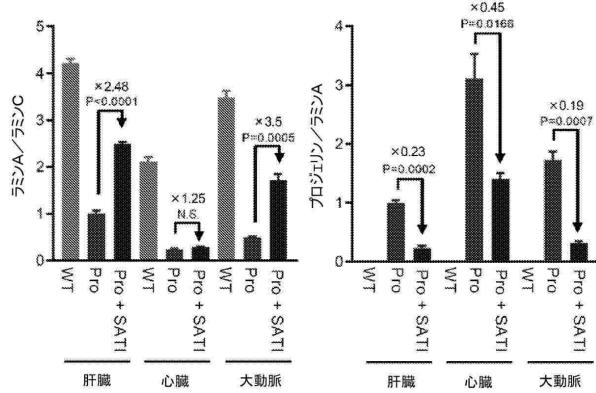
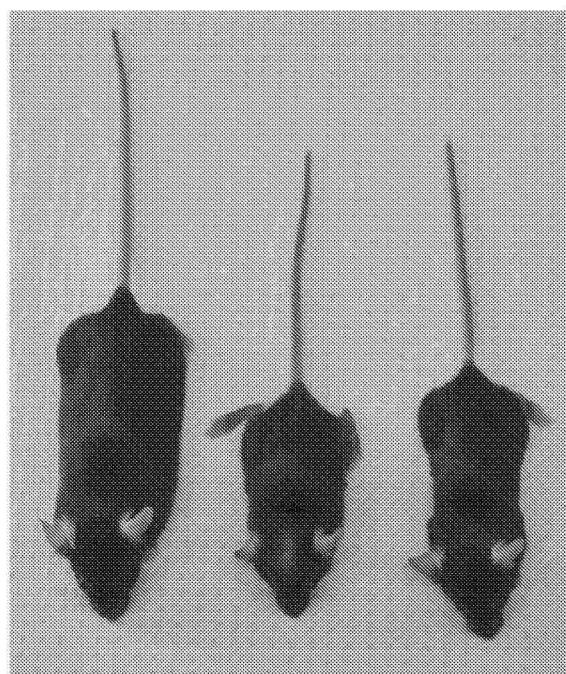


FIG. 3B

【図 3 C】



10

WT

早老症

早老症
+ SATI
(Pro + SATI)

FIG. 3C

20

【図 3 D】

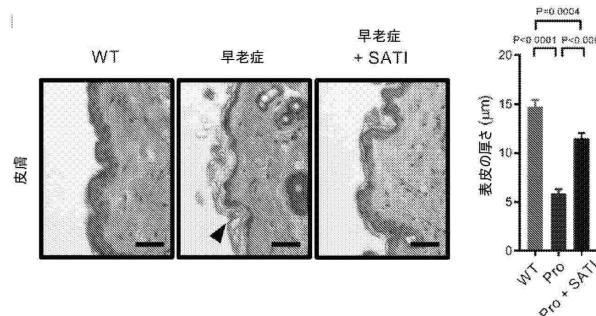


FIG. 3D

【図 3 E】

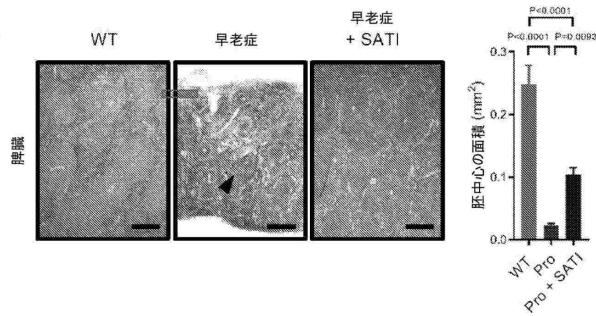


FIG. 3E

30

40

50

【図 3 F】

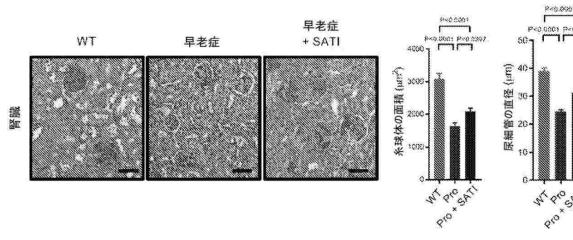


FIG. 3F

【図 3 G】

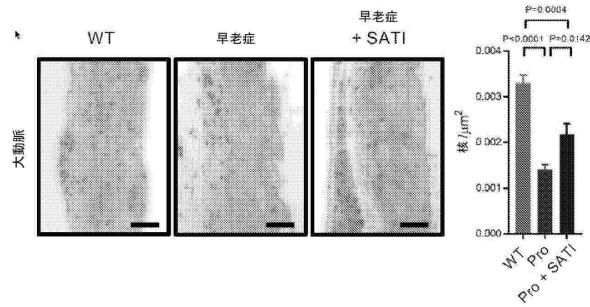


FIG. 3G

10

【図 3 H】

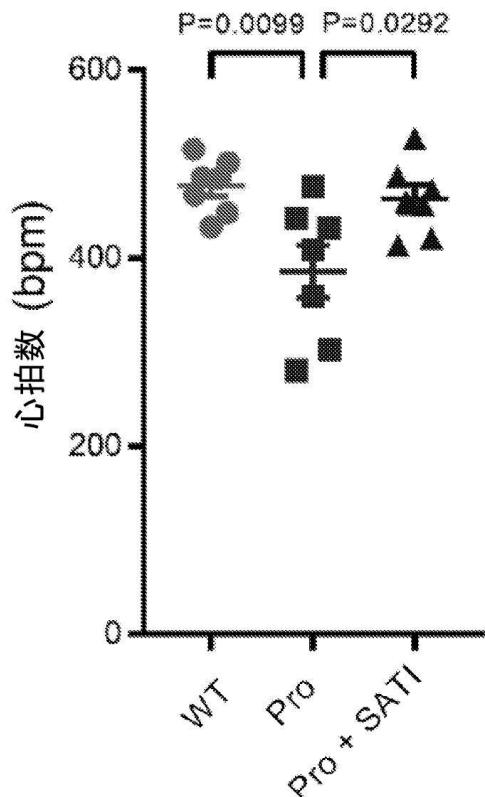


FIG. 3H

【図 4 A】

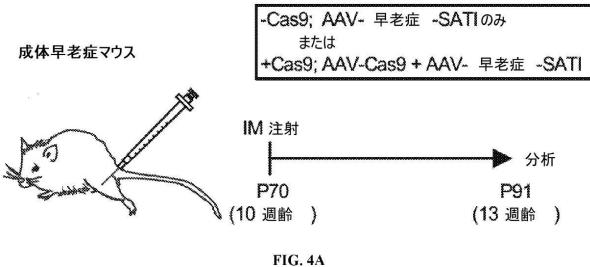


FIG. 4A

20

30

40

50

【図 4 B】

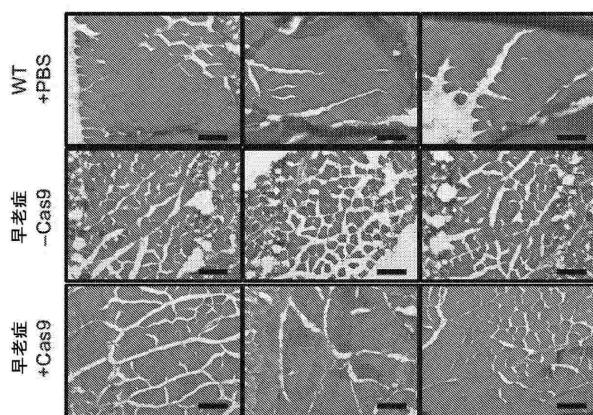


FIG. 4B

【図 4 C】

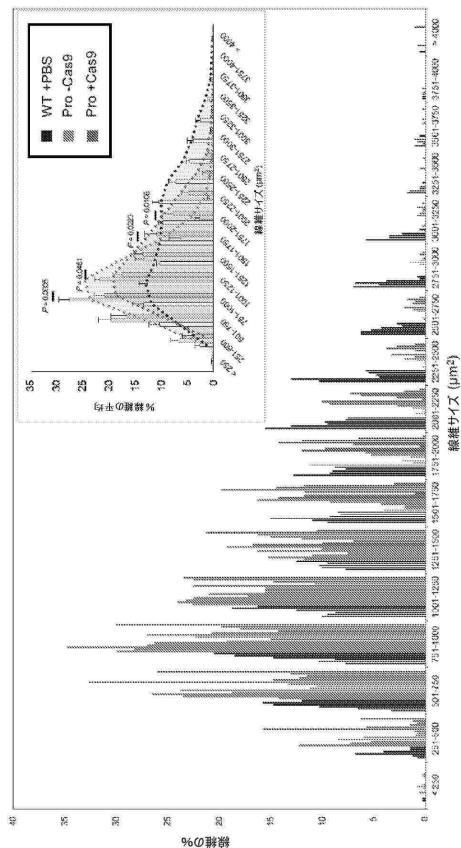


FIG. 4C

10

20

30

40

【図 5 A】

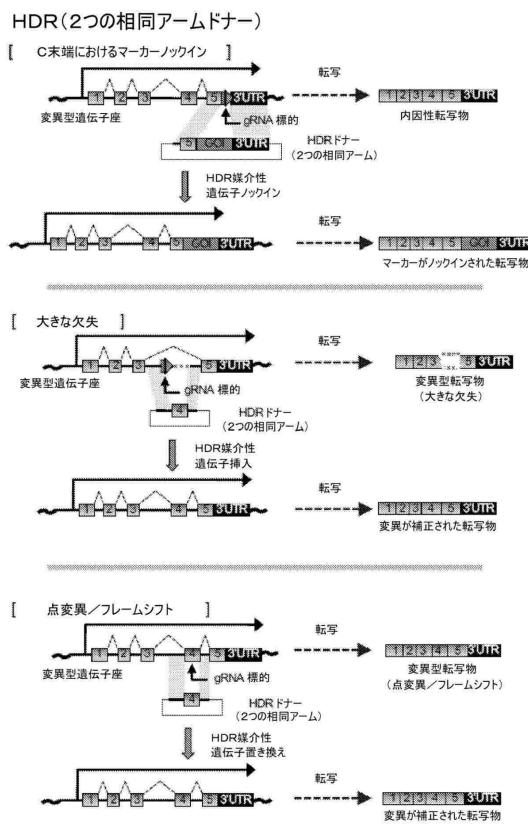
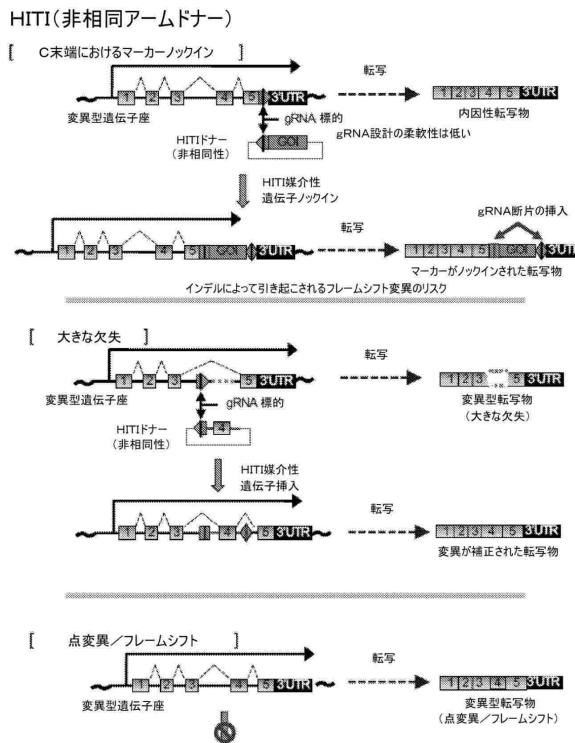


FIG. 5A

【図 5 B】



置換えは生じない！

FIG. 5B

50

【図 5 C】

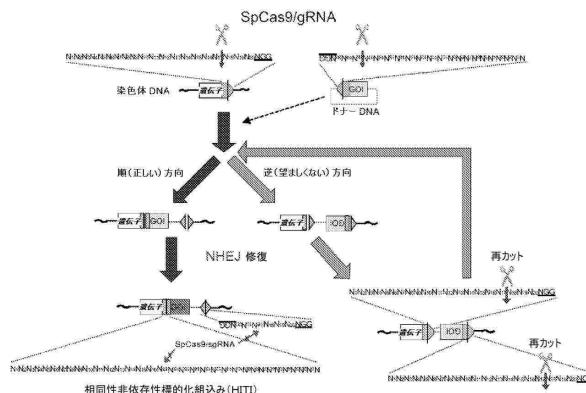


FIG. 5C

【図 6 A】

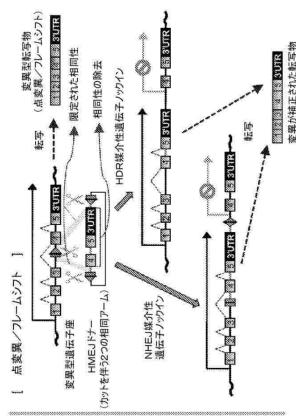


FIG. 6A

10

HMEJ

(相同意媒介性末端結合)
[C末端におけるマークノックイン/大きな欠失]
変異型遺伝子座
HMEJドナー
(カトキ等2つの組ワーム)
HMEJ活性
遺伝子ノックイン
HMEJ活性
遺伝子ノックアウト
HMEJによるDNA修復

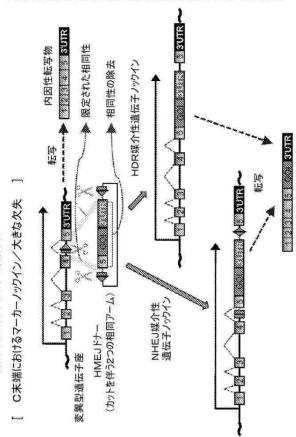


FIG. 6A

20

【図 6 B】

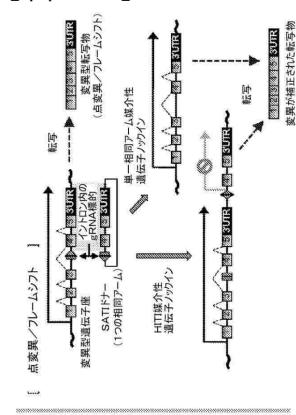


FIG. 6B

【図 6 C】

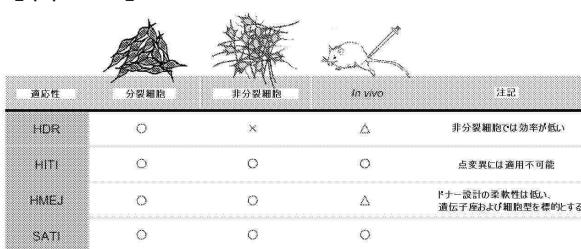


FIG. 6C

30

40

SATI (単一相アーマードナー)
1 C末端におけるマークノックイン/大きな欠失

FIG. 6B

50

【図 7 A】

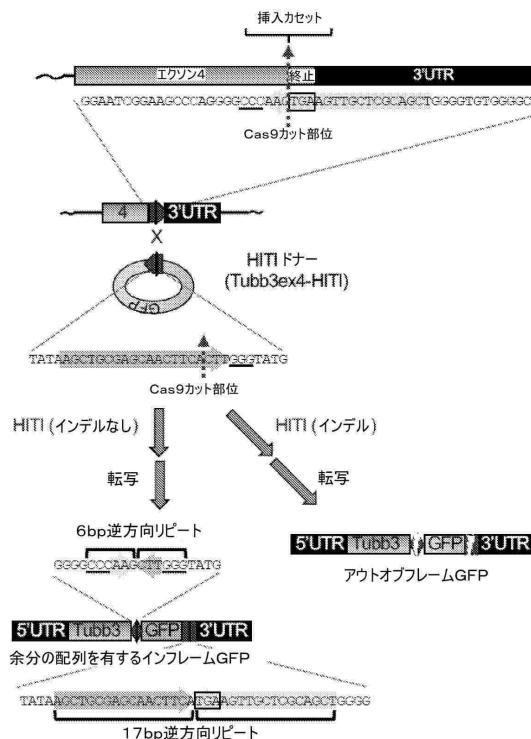


FIG. 7A

【図 7 B】

標的遺伝子	標的部位	適用	gRNA設計部位の数	
			NGG PAM	NG PAM
<i>Tubb3</i>	エクソン4(終止コドン)*	GFPノックイン	1	1
	イントロン3**	GFPノックイン	185	648
<i>Lmna</i>	エクソン11(c.1827C>T)**	ノックアウト、1827C>T変異	0	2
	イントロン10**	ノックイン <i>Lmna</i> ミニ遺伝子	93	256

* 終止コドンの前でカット
** スプライシング部位を回避するためにエクソンからそれぞれ100bpを除外
*** 変異に対する特異性を付与するために、設計されたgRNAはこの変異をPAM内またはPAMから6bp以内に含む

FIG. 7B

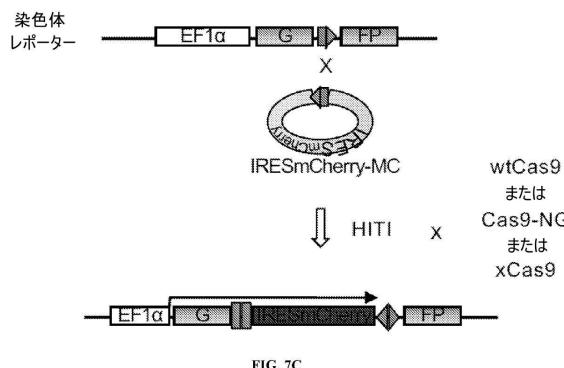
10

20

30

40

【図 7 C】



【図 7 D】

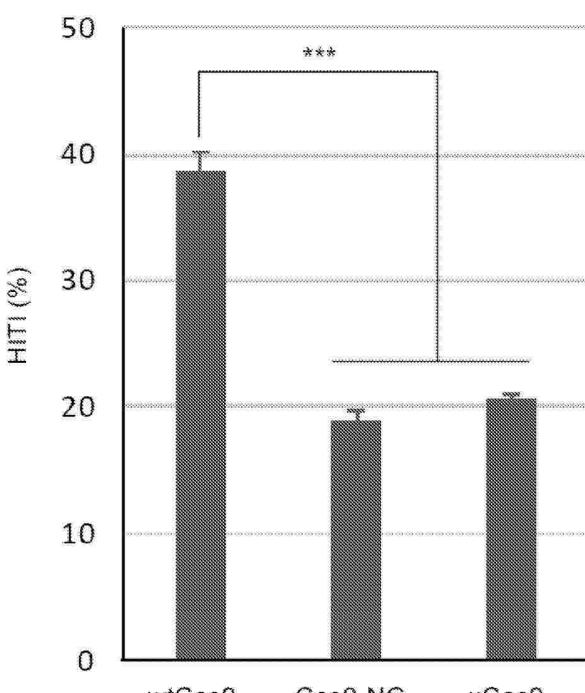


FIG. 7D

50

【図 8 A】

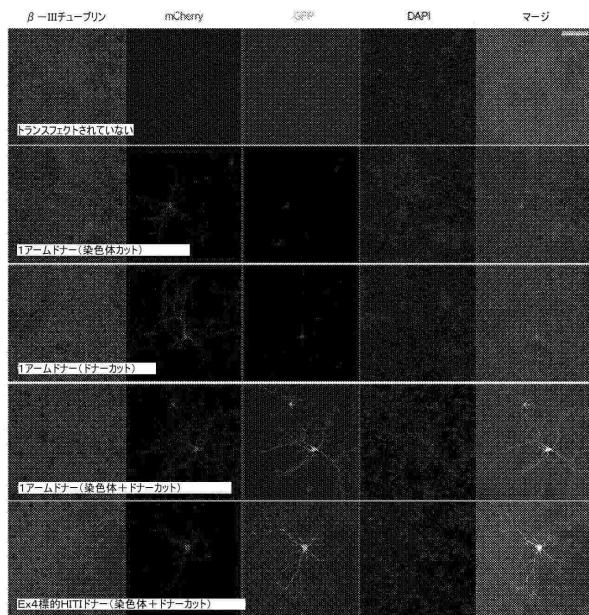
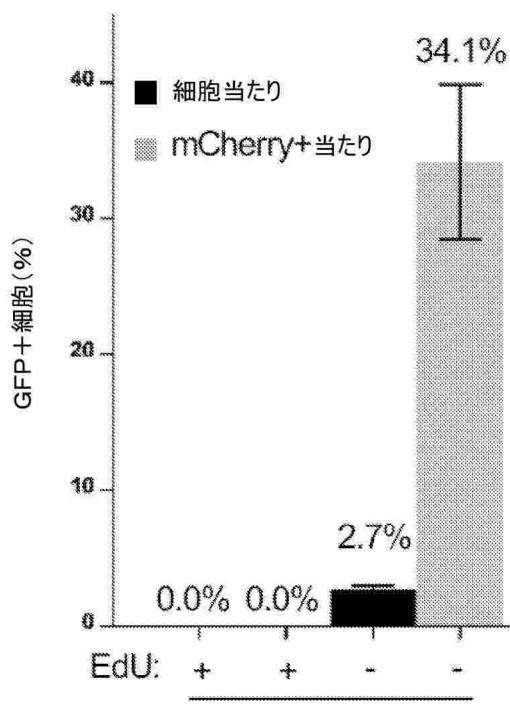


FIG. 8A

【図 8 B】



ドナー: 1アーム

標的: イントロン3

FIG. 8B

【図 8 C】

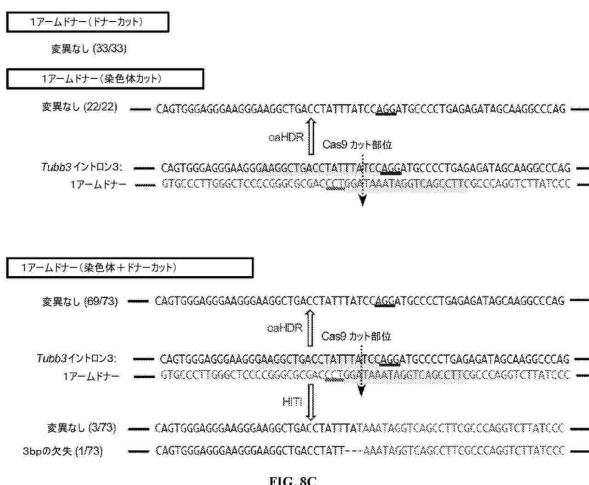


FIG. 8C

【図 8 D】

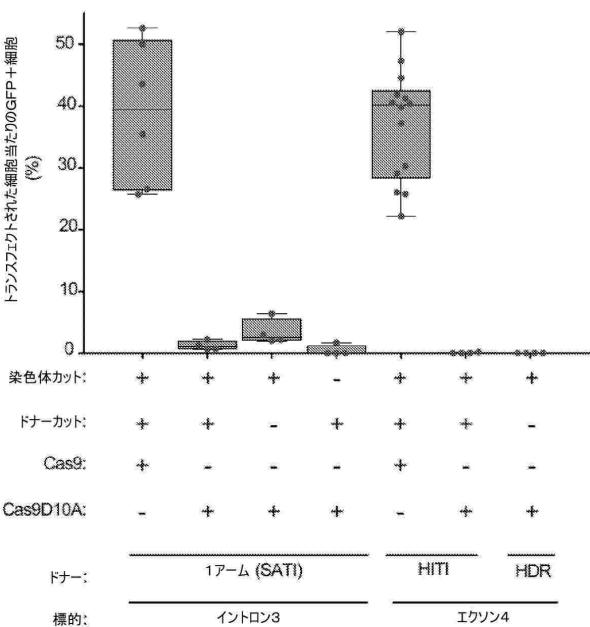


FIG. 8D

【図 9 A】

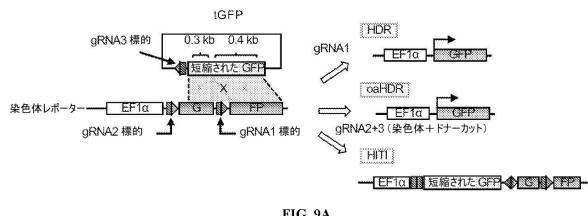


FIG. 9A

【図 9 B】

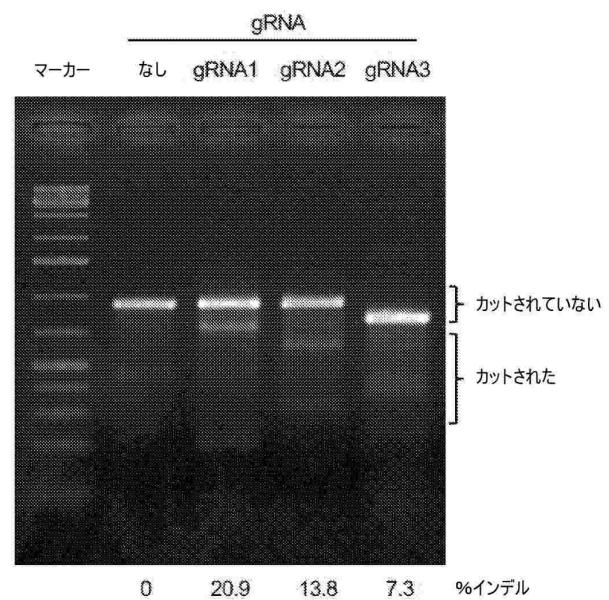


FIG. 9B

【図 9 C】

HEK293

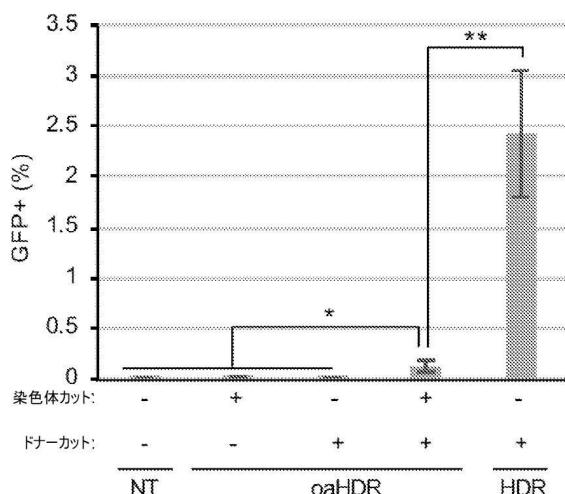


FIG. 9C

【図 9 D】

hESC

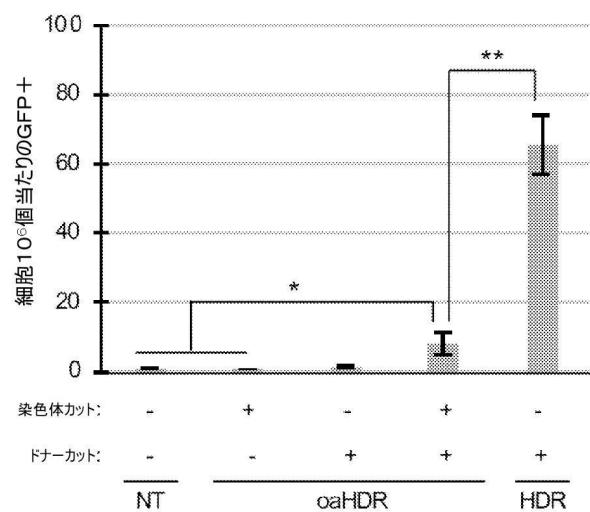


FIG. 9D

20

10

30

40

50

【図 10 A】

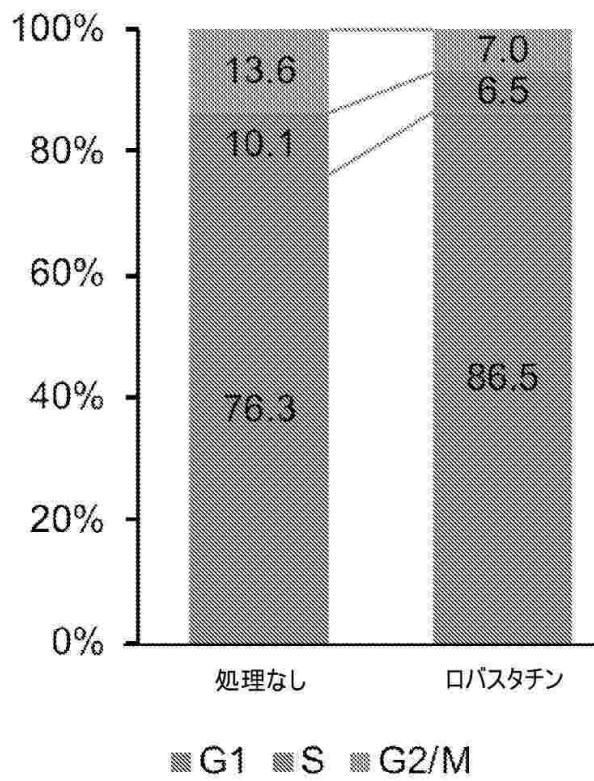


FIG. 10A

【図 10 B】

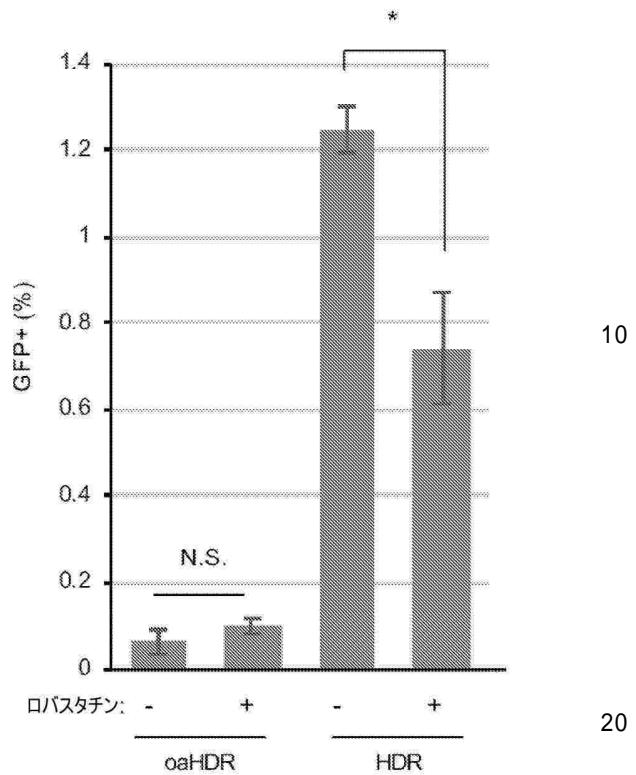


FIG. 10B

【図 10 C】

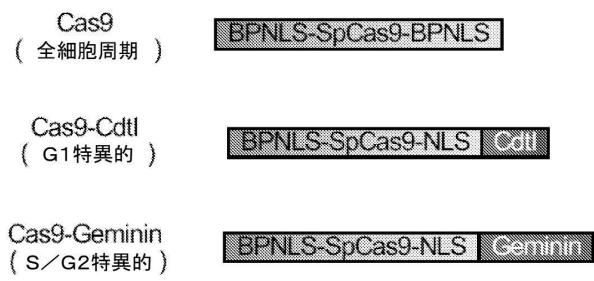


FIG. 10C

【図 10 D】

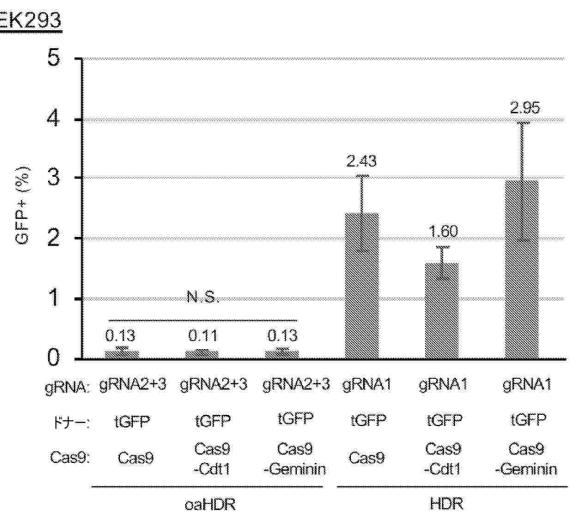
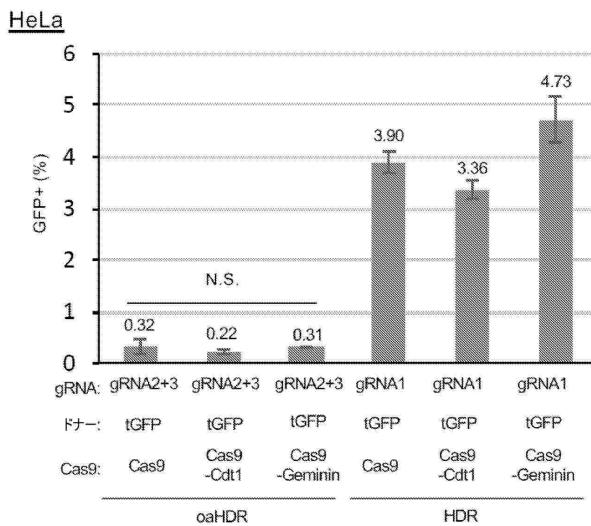
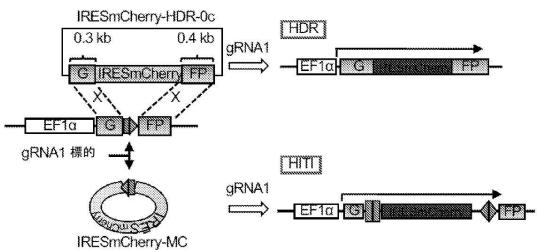


FIG. 10D

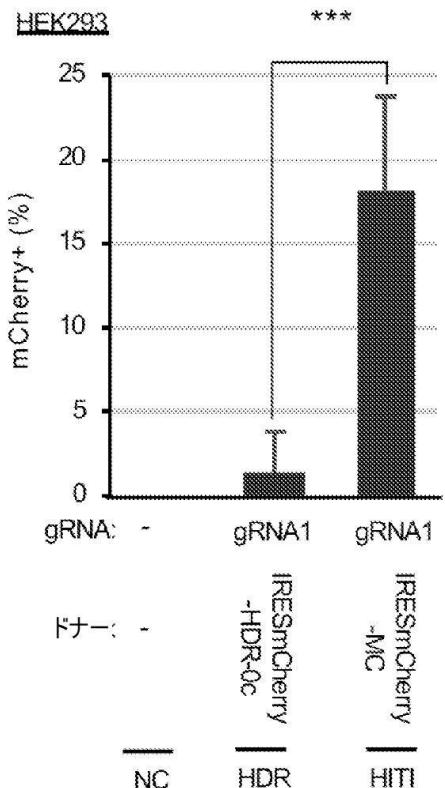
【図 10 E】



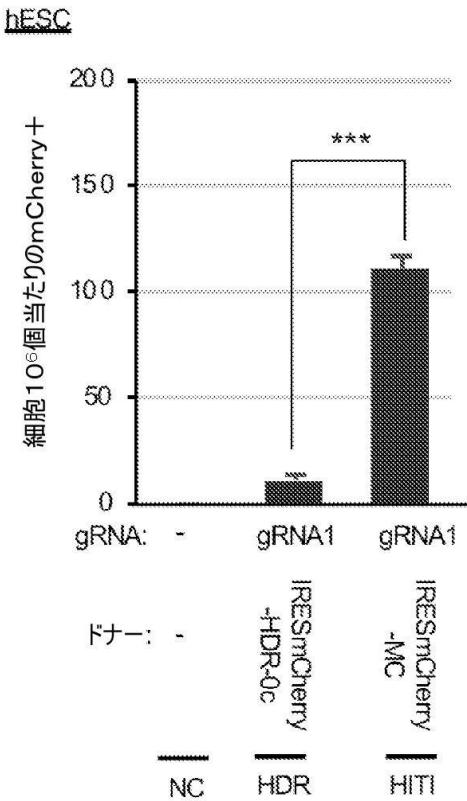
【図 11 A】



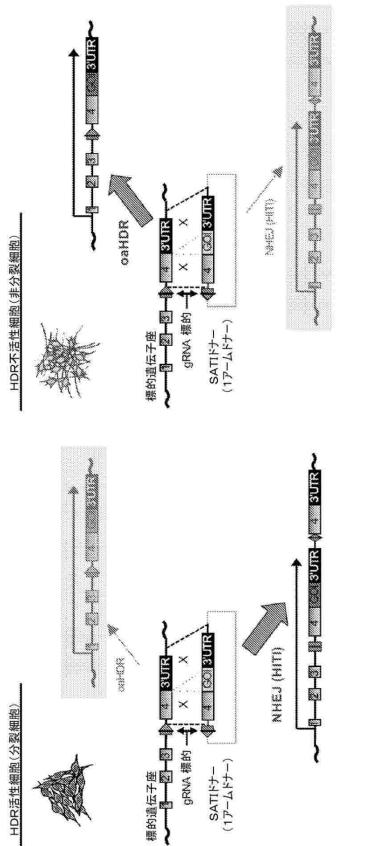
【図 11 B】



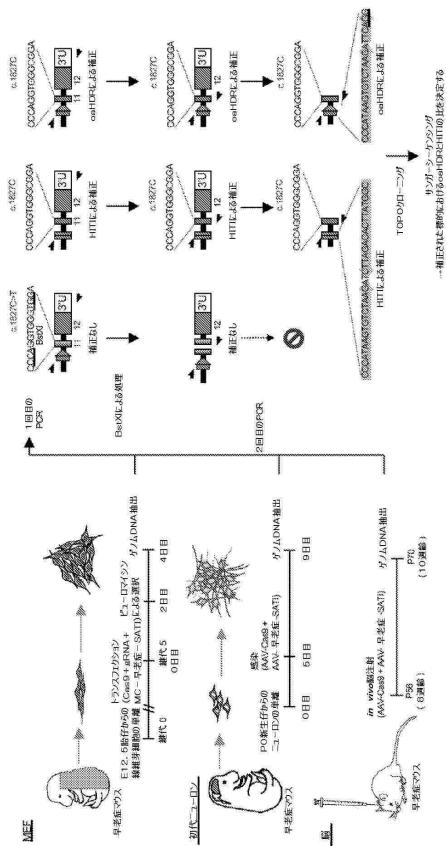
【図 11 C】



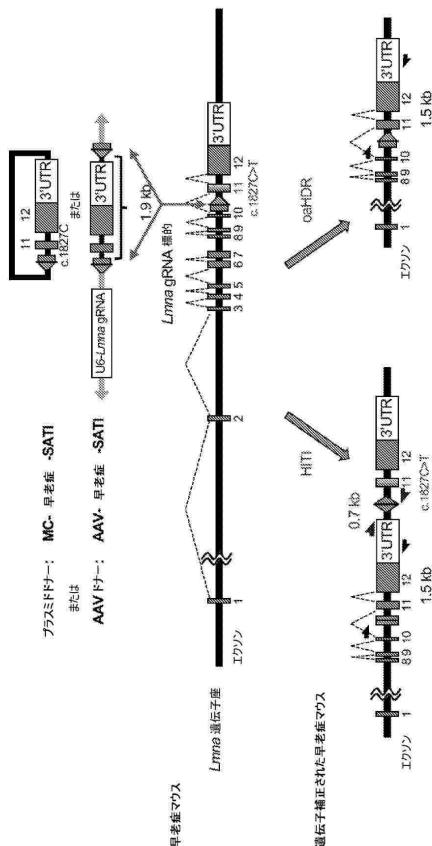
【図 1 1 D】



【図 1 2 B】



【図 1 2 A】



【図 1 3 A】

修復経路	副次経路	遺伝子	クローニング ID (Sigma)
DSB 修復	最初のDSB切除	Rad50	TRCN0000336380
	NHEJ	Ku70/Xrcc6	TRCN0000321228
		Ku80/Xrcc5	TRCN0000312877
alt-NHEJ		Lig3	TRCN0000070980
		Xrcc1	TRCN0000077239
HDR		Rad51	TRCN0000012660
SSA		Rad52	TRCN0000233363
		Ercc1	TRCN0000238086
		Ercc4/Xpf	TRCN0000175645
コピーリング形成		Smc5	TRCN0000241751
上流活性化因子		Rad18	TRCN0000124781
		Msh2	TRCN0000042496
ミスマッチ修復			
塙基除去修復		Apex1	TRCN0000304312

FIG. 13A

【図13B】

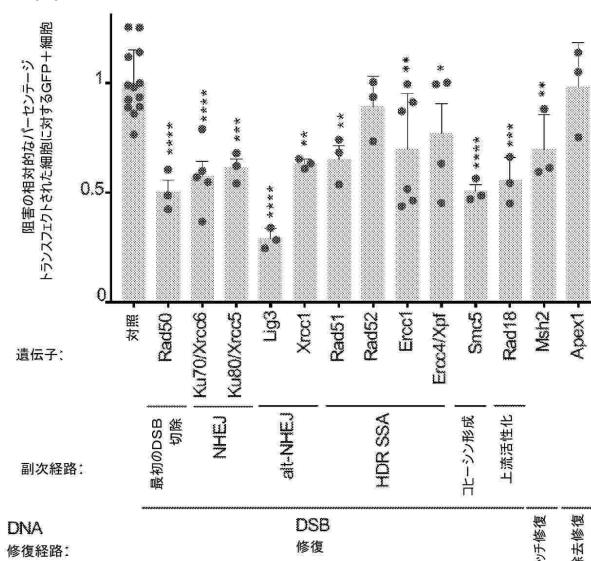
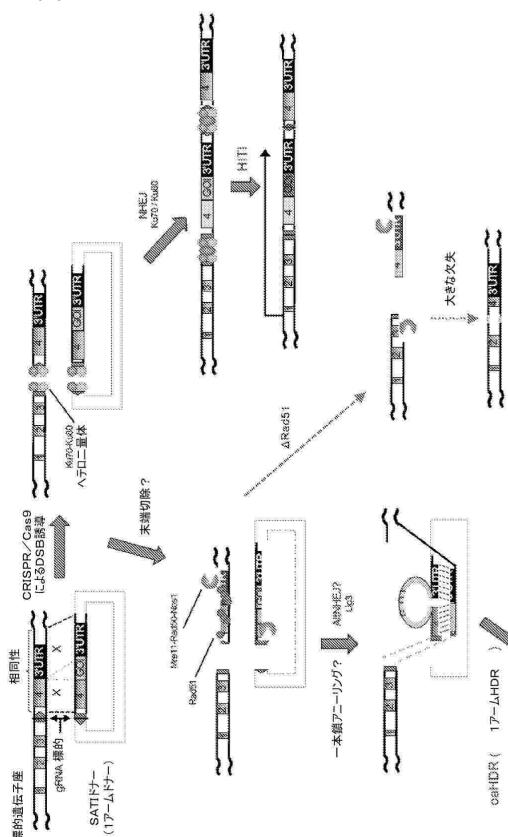


FIG. 13B

【図13C】



13

【図14A】

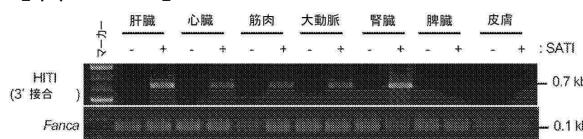
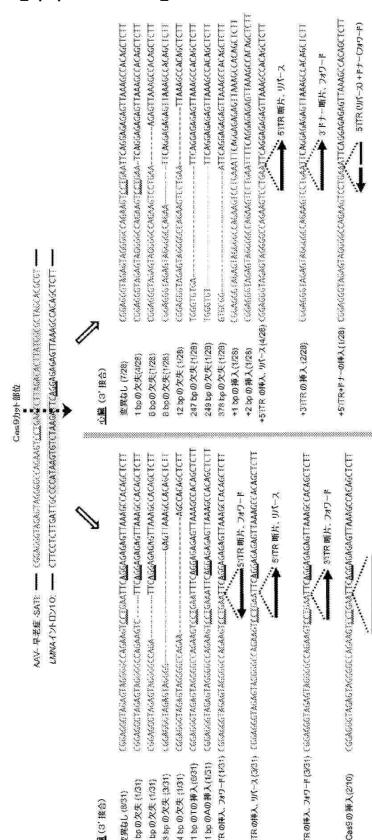


FIG. 14A

【図14B】



14B

【図15A】

分析した器官	(g/NAW標準)	インプル		HT1		總リード (c. 1827部位)	遺伝子補正	
		リード	%	リード	%		リード	%
肝臓	853230	54514	6.39	14888	1.74	868972	16256	2.06
心臓	877839	10905	1.24	1916	0.22	1346160	4523	0.34
筋肉	856777	3482	0.40	717	0.08	1543707	2141	0.14

FIG. 15A

【図15B】

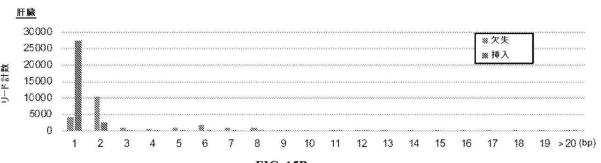


FIG. 15B

【図 15C】

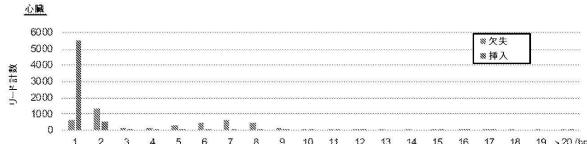


FIG. 15C

【図15D】

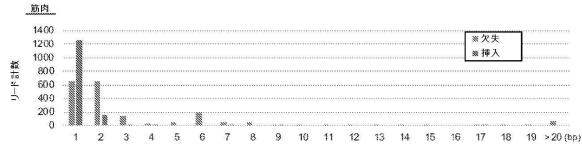


FIG. 15E

【 15E 】

標的名	配列	インデル (%)
On	CCCATAAGTGTCTAACGATTCAAG	7.7
OTS1	GTCATAATTGTCTAACGATTATAG	0.0094
OTS2	GCCATAAAAGTTCTAACGATTCAAG	0.0046
OTS3	GACATTTGTGTCTAACGATTCAAG	0.000035
OTS4	GCAATGAGGGTCTAACGATTCTAG	0.0038
OTS5	GAAATAGGTTCTAACGATTCTGG	0.041
OTS6	GCCCCAGGTTCTAACGATTCTAG	0.000087
OTS7	GTCATCAATTCTAACGATTCCAG	0.051
OTS8	GCCACAAGTGACTAACGATTAAAG	0.00017
OTS9	GCCAGAAGTGGCTAACGATTATGG	0.00019
OTS10	TTAATAAGTGTCTAACGATTCAAG	0.000033

FIG. 15E

【図16A】

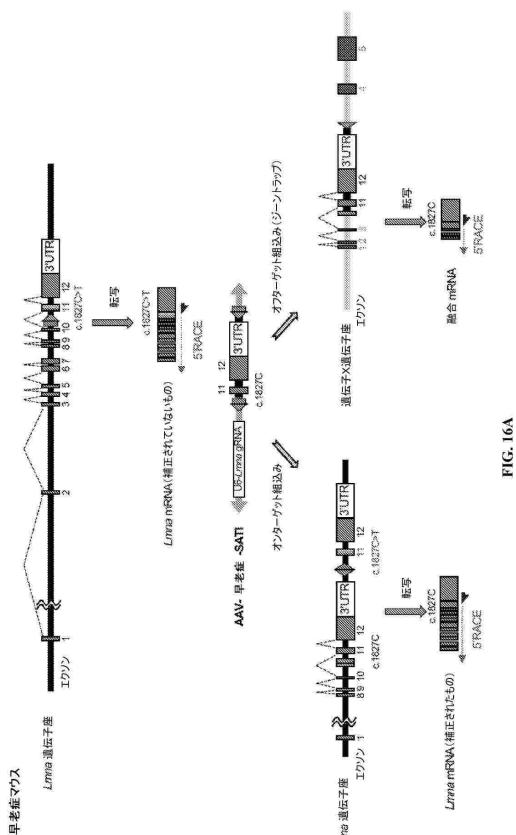


FIG. 16A

【図 16 B】

肝臓(100日目)		心臓(100日目)		#1	
#1	#2	#1	#2	#1	#2
捕獲されたエクソン	クローンの数	捕獲されたエクソン	クローンの数	捕獲されたエクソン	クローンの数
<i>Lmna</i> エクソン10(補正されてないもの)	57	<i>Lmna</i> エクソン10(補正されてないもの)	28	<i>Lmna</i> エクソン10(補正されてないもの)	84
<i>Lmna</i> エクソン10(補正されたもの)	4	<i>Lmna</i> エクソン10(補正されてないもの)	6	<i>Lmna</i> エクソン10(補正されたもの)	2
<i>Alb</i> エクソン7	3	<i>Alb</i> エクソン5	2	<i>Myh6</i> エクソン13	2
<i>Alb</i> エクソン9	5	<i>Alb</i> エクソン7	9	<i>Myh6</i> エクソン14	1
<i>Alb</i> エクソン12	7	<i>Alb</i> エクソン8	10	<i>Myh6</i> エクソン13	1
<i>Alb</i> エクソン13	7	<i>Alb</i> エクソン10	4	<i>Myh6</i> エクソン24	1
<i>Trf</i> エクソン9	2	<i>Alb</i> エクソン12	9	<i>Alb</i> エクソン11	1
<i>Trf</i> エクソン15	3	<i>Alb</i> エクソン13	9	<i>Smn</i> 5' エクソン2	1
<i>Igfbp1</i> エクソン3	1	<i>Alb</i> エクソン14	1	合計	93
<i>Alb</i> エクソン4	1	<i>Igfbp1</i> エクソン3	2		
<i>Alb</i> エクソン5	1	<i>Igfbp1</i> エクソン3	1		
<i>Alb</i> エクソン8	1	<i>Alb</i> エクソン3	1		
<i>Alb</i> エクソン15	1	<i>Alb</i> エクソン3	1		
合計	85	合計	83		

FIG. 16B

10

【図 16 C】

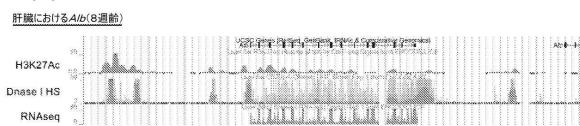


FIG. 16C

【図 16 D】

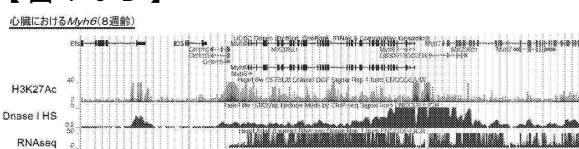


FIG. 16D

20

【図 16 E】

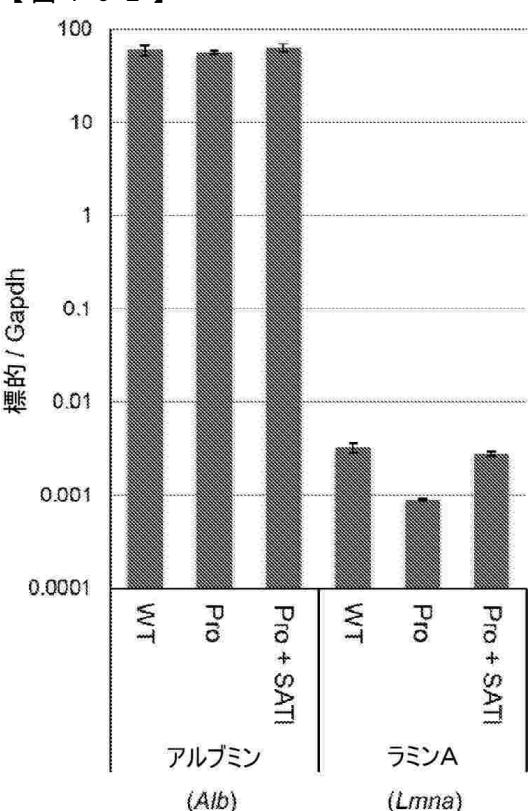


FIG. 16E

30

40

50

【図 17 A】

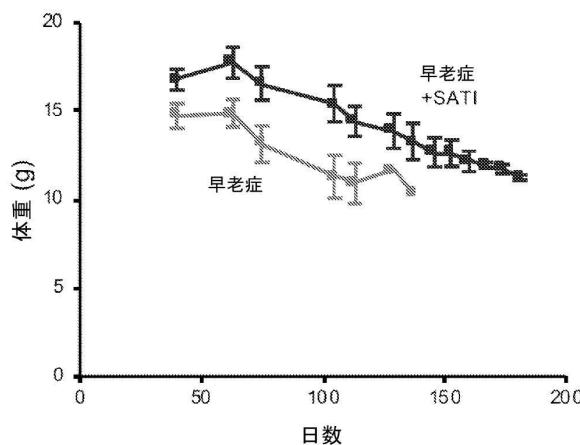


FIG. 17A

【図 17 B】

脾臓



WT

老齢

老齢 + SATI

FIG. 17B

【図 17 C】



FIG. 17C

【図 17 D】

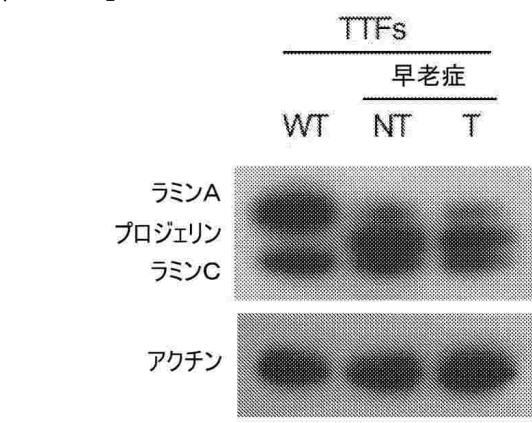


FIG. 17D

20

30

40

50

【図 17 E】

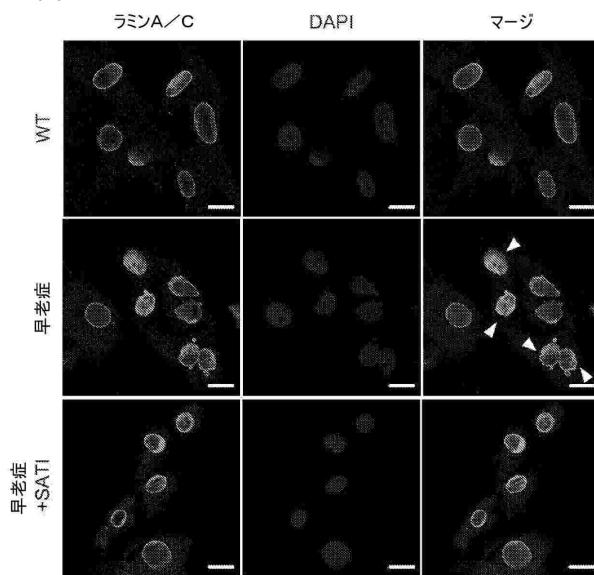


FIG. 17E

【図 17 F】

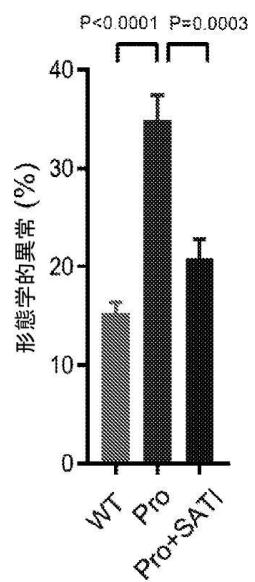


FIG. 17F

10

20

【図 17 G】

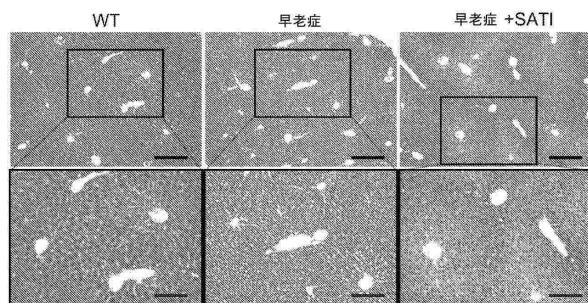


FIG. 17G

30

【配列表】

0007628319000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 12 N 15/867 (2006.01)
A 61 K 48/00 (2006.01)

F I

C 12 N 15/861
C 12 N 15/867
A 61 K 48/00

Z Z N A
Z

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

弁護士 山本 健策

(72)発明者 イズピスア ベルモンテ, ジュアン カルロス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラホーヤ, エヌ. トリー パインズ ロード 1
0010

(72)発明者 鈴木 啓一郎

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラホーヤ, エヌ. トリー パインズ ロード 1
0010

(72)発明者 辻 真子

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラホーヤ, エヌ. トリー パインズ ロード 1
0010

(72)発明者 ヘルナンデス - ベニテス, レイナ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラホーヤ, エヌ. トリー パインズ ロード 1
0010

審査官 西 賢二

(56)参考文献 国際公開第2018/013932 (WO, A1)

Basiri, M. et al. , "The Convenience of Single Homology Arm Donor DNA and CRISPR/Cas9-Nickase for Targeted Insertion of Long DNA Fragment" , Cell J. , 2017年 , Vol. 18 , pp. 53-539

Suzuki, K. et al. , "Development of in vivo genome editing technology, HITI, and application for genome-editing therapy" , 日本ゲノム編集学会第4回大会 要旨集 , 2019年06月03日
, p. 48

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 12 N 15/00 - 15/90
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)