

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7094963号  
(P7094963)

(45)発行日 令和4年7月4日(2022.7.4)

(24)登録日 令和4年6月24日(2022.6.24)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/09 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 1 2 N	15/63 (2006.01)		C 1 2 N	15/63	Z Z N A
C 1 2 N	15/113 (2010.01)		C 1 2 N	15/113	1 3 0 Z
A 6 1 K	38/46 (2006.01)		A 6 1 K	38/46	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)		A 6 1 K	48/00	

請求項の数 53 (全192頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-539270(P2019-539270)  
 (86)(22)出願日 平成30年1月19日(2018.1.19)  
 (65)公表番号 特表2020-513784(P2020-513784  
 A)  
 (43)公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2018/014454  
 (87)国際公開番号 WO2018/136758  
 (87)国際公開日 平成30年7月26日(2018.7.26)  
 審査請求日 令和3年1月13日(2021.1.13)  
 (31)優先権主張番号 62/449,335  
 (32)優先日 平成29年1月23日(2017.1.23)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 62/472,972  
 (32)優先日 平成29年3月17日(2017.3.17)  
 最終頁に続く

(73)特許権者 597160510  
 リジェネロン・ファーマシューティカル  
 ズ・インコーポレイテッド  
 R E G E N E R O N P H A R M A C E  
 U T I C A L S , I N C .  
 アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 - 6 7 0 7 2  
 ューヨーク州タリータウン、オールド・  
 ソー・ミル・リバー・ロード 7 7 7 番  
 (74)代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74)代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (72)発明者 アブル - フスン, ノウラ エス.  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9  
 1 - 6 7 0 7 , タリータウン, オール  
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H S D 1 7 B 1 3 バリエントおよびその使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

細胞内の H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の発現を改変または変更するための組合せ物であって、  
 (a) Cas 9 タンパク質または前記 Cas 9 タンパク質をコードする核酸；および  
 (b) 第1のガイドRNAまたは前記第1のガイドRNAをコードするDNAであって、  
 前記第1のガイドRNAが、第1のC R I S P R RNA (c r R N A) 部分および第1  
 のトランス活性化C R I S P R RNA (t r a c r R N A) 部分を含み、前記第1のガ  
 イドRNAが、前記Cas 9 タンパク質と複合体を形成し、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子  
 内の第1のガイドRNA標的配列を標的とし、前記第1のガイドRNA標的配列が、前記  
 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンを含むかまたはそれに近接する、第1のガイドRN  
 A または前記第1のガイドRNAをコードするDNA

を含み、前記Cas 9 タンパク質が、前記第1のガイドRNA標的配列を切断し、前記H  
 S D 1 7 B 1 3 遺伝子において標的化遺伝子改変を生成するか、または前記Cas 9 タン  
 パク質が、前記第1のガイドRNA標的配列に結合し、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の発  
 現を変更し；

前記組合せ物が、前記細胞に導入され、前記組合せ物が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の  
 機能喪失をもたらす、

組合せ物。

## 【請求項2】

前記Cas 9 タンパク質がヌクレアーゼ活性Cas 9 タンパク質であり、前記H S D 1 7

B13遺伝子が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを有さない、請求項1に記載の組合せ物。

【請求項3】

(a) 前記第1のガイドRNA標的配列が、配列番号20～81および259～263のいずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記第1のガイドRNAが、配列番号1423～1484および1643～1647のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、かつ／または

(c) 前記第1のガイドRNAが、配列番号500～561、730～791、960～1021、1190～1251、720～724、950～954、1180～1184、および1410～1414のいずれか1つを含む、  
請求項1または2に記載の組合せ物。

【請求項4】

前記第1のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号1または2と最適にアラインメントした場合、配列番号1または2のエクソン1に対応する領域内にある、請求項1から3までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項5】

前記第1のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の前記開始コドンの10、20、30、40、50、100、200、300、400、500または1,000ヌクレオチド内にあるか、または前記HSD17B13遺伝子の前記開始コドンを含む、請求項1から4までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項6】

第2のガイドRNAまたは前記第2のガイドRNAをコードするDNAをさらに含み、前記第2のガイドRNAが、第2のCRISPR RNA (crRNA) 部分および第2のトランスクレオチド内にあるか、または前記HSD17B13遺伝子の前記開始コドンを含む、請求項1から4までのいずれか一項に記載の組合せ物。

請求項1から5までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項7】

前記第2のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の前記開始コドンの10、20、30、40、50、100、200、300、400、500または1,000ヌクレオチド内にあるか、または前記HSD17B13遺伝子の前記開始コドンを含む、請求項6に記載の組合せ物。

【請求項8】

前記HSD17B13遺伝子の前記開始コドンの破壊をもたらす、請求項1から7までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項9】

第2のガイドRNAまたは前記第2のガイドRNAをコードするDNAをさらに含み、前記第2のガイドRNAが、第2のCRISPR RNA (crRNA) 部分および第2のトランスクレオチド内にあるか、または前記HSD17B13遺伝子の前記開始コドンを含む、請求項1から4までのいずれか一項に記載の組合せ物。

前記第2のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の終止コドンを含むかまたはそれに近接する、かつ

前記細胞が、前記第1のガイドRNA標的配列と前記第2のガイドRNA標的配列との間にHSD17B13コード領域の欠失を含むように改変される、  
請求項1から5までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項10】

10

20

30

40

50

(a) 前記第2のガイドRNA標的配列が、配列番号88～225のいずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記第2のガイドRNAが、配列番号1485～1628のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、かつ／または

(c) 前記第2のガイドRNAが、配列番号562～705、792～935、1022～1165および1252～1395のいずれか1つを含む、  
請求項9に記載の組合せ物。

【請求項11】

前記第2のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号1または2と最適にアラインメントした場合、配列番号1または2のエクソン7に対応する領域内にある、請求項9または10に記載の組合せ物。 10

【請求項12】

前記第2のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の前記終止コドンの10、20、30、40、50、100、200、300、400、500または1,000ヌクレオチド内にあるか、または前記HSD17B13遺伝子の前記終止コドンを含む、請求項9から11までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項13】

前記HSD17B13遺伝子の前記コード配列が欠失される、請求項9から12までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項14】

前記標的化遺伝子改变が、非相同末端結合による切断された第1のガイドRNA標的配列の修復によって生成される、請求項1から13までのいずれか一項に記載の組合せ物。 20

【請求項15】

前記組合せ物が、発現ベクターと組み合わせて前記細胞に導入されることを特徴とし、前記発現ベクターが、前記HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えHSD17B13遺伝子を含む、請求項1から14までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項16】

前記組換えHSD17B13遺伝子がヒト遺伝子である、請求項1\_5に記載の組合せ物。 30

【請求項17】

前記組換えHSD17B13遺伝子が、前記遺伝子の1つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型HSD17B13遺伝子に対して欠失しているHSD17B13ミニ遺伝子であり、前記欠失したセグメントが、1つまたは複数のインtron配列を含み、前記HSD17B13ミニ遺伝子が、配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のインtron6に対応するインtronを含む、請求項1\_5または1\_6に記載の組合せ物。 40

【請求項18】

前記組合せ物が、発現ベクターと組み合わせて前記細胞に導入されることを特徴とし、前記発現ベクターが、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードする核酸を含み、前記HSD17B13タンパク質が、配列番号12(HSD17B13アイソフォームA)と同一でない、請求項1から1\_4までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項19】

前記HSD17B13タンパク質をコードする前記核酸が、配列番号7と最適にアラインメントした場合、配列番号7(HSD17B13転写産物D)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である、請求項1\_8に記載の組合せ物。

【請求項20】

前記組合せ物が、HSD17B13タンパク質またはその断片と組み合わせて前記細胞に 50

導入されることを特徴とし、前記 H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片が、配列番号 1 5 ( H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D ) と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一であり、前記 H S D 1 7 B 1 3 タンパク質が、配列番号 1 2 ( H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム A ) と同一でない、請求項 1 から 1 4 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 2 1】

前記組合せ物が、外因性ドナー配列と組み合わせて前記細胞に導入されることを特徴とし、前記外因性ドナー配列を、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の標的ゲノム遺伝子座と組換えて、標的化遺伝子改変を生じさせる、請求項 1 から 1 4 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

10

【請求項 2 2】

前記外因性ドナー配列による前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の修復が、非相同末端結合媒介性挿入を介して生じる、請求項 2 1 に記載の組合せ物。

【請求項 2 3】

前記外因性ドナー配列による前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の修復が、相同組換え修復を介して生じる、請求項 2 1 に記載の組合せ物。

【請求項 2 4】

前記外因性ドナー配列が、配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位に対応する位置の 5 ' 側の標的配列とハイブリダイズする 5 ' 相同アーム、および配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位に対応する位置の 3 ' 側の標的配列とハイブリダイズする 3 ' 相同アームを含み、前記外因性ドナー配列が、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子と組換えられる、請求項 2 3 に記載の組合せ物。

20

【請求項 2 5】

前記外因性ドナー配列が、5 ' 相同アームと 3 ' 相同アームに挟まれた核酸挿入物をさらに含む、請求項 2 4 に記載の組合せ物。

【請求項 2 6】

前記核酸挿入物がチミンを含み、前記外因性ドナー配列が H S D 1 7 B 1 3 遺伝子と組換えられると、前記 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位に対応するヌクレオチドと 1 2 6 6 6 位に対応するヌクレオチドとの間に前記チミンが挿入される、請求項 2 5 に記載の組合せ物。

30

【請求項 2 7】

前記外因性ドナー配列が、5 0 ヌクレオチド～1 k b の長さである、請求項 2 1 から 2 6 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 2 8】

前記外因性ドナー配列が、8 0 ヌクレオチド～2 0 0 ヌクレオチドの長さである、請求項 2 7 に記載の組合せ物。

【請求項 2 9】

前記外因性ドナー配列が、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドである、請求項 2 1 から 2 8 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 3 0】

前記第 1 のガイド R N A が、前記第 1 の c r R N A 部分が前記第 1 の t r a c r R N A 部分に連結している単一分子ガイド R N A である、請求項 1 から 2 9 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

40

【請求項 3 1】

前記第 1 のガイド R N A が、配列番号 1 4 2 0 、 2 5 6 、 2 5 7 または 2 5 8 に記載の配列を含む、請求項 3 0 に記載の組合せ物。

【請求項 3 2】

前記第 1 の c r R N A 部分および前記第 1 の t r a c r R N A 部分が、別々の R N A 分子である、請求項 1 から 2 9 までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 3 3】

50

前記第1のc r R N A部分が、配列番号1421に記載の配列を含み、かつ／または前記第1のt r a c r R N A部分が、配列番号1422に記載の配列を含む、請求項3\_2に記載の組合せ物。

【請求項34】

前記第1のガイドR N Aが、改変または制御された安定性をもたらす改変を含む、請求項1から3\_3までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項35】

前記C a s 9タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記C a s 9タンパク質をコードする前記核酸がD N Aを含む、請求項1から3\_4までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項36】

前記C a s 9タンパク質をコードする前記核酸を含み、前記C a s 9タンパク質をコードする前記核酸がR N Aを含む、請求項1から3\_4までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項37】

R N Aの形態で前記第1のガイドR N Aを含む、請求項1から3\_6までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項38】

前記第1のガイドR N AをコードするD N Aを含む、請求項1から3\_6までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項39】

脂質ナノ粒子中にある、請求項1から3\_8までのいずれか一項に記載の組合せ物。

10

【請求項40】

アデノ随伴ウイルスベクター中にある、請求項1から3\_9までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項41】

前記細胞が、マウス細胞、ラット細胞またはヒト細胞である、請求項1から4\_0までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項42】

前記細胞が、ヒト肝臓細胞、マウス肝臓細胞、ラット肝臓細胞、マウス多能性細胞またはラット多能性細胞である、請求項4\_1に記載の組合せ物。

【請求項43】

前記細胞がヒト肝臓細胞である、請求項4\_2に記載の組合せ物。

20

【請求項44】

前記細胞がヒト細胞であり、

( a ) 前記第1のガイドR N A標的配列が、配列番号2 0 ~ 8 1のいずれか1つを含み、かつ／または

( b ) 前記第1のガイドR N Aが、配列番号1 4 2 3 ~ 1 4 8 4のいずれか1つを含むD N A標的化セグメントを含み、かつ／または

( c ) 前記第1のガイドR N Aが、配列番号5 0 0 ~ 5 6 1、7 3 0 ~ 7 9 1、9 6 0 ~ 1 0 2 1および1 1 9 0 ~ 1 2 5 1のいずれか1つを含む、

請求項1から4\_3までのいずれか一項に記載の組合せ物。

30

【請求項45】

( a ) 前記第1のガイドR N A標的配列が、配列番号2 0 ~ 4 1のいずれか1つ、配列番号2 1 ~ 2 3、3 3および3 5のいずれか1つ、または配列番号3 3および3 5のいずれか1つを含み、かつ／または

( b ) 前記第1のガイドR N Aが、配列番号1 4 4 7 ~ 1 4 6 8のいずれか1つ、配列番号1 4 4 8 ~ 1 4 5 0、1 4 6 0および1 4 6 2のいずれか1つ、または配列番号1 4 6 0および1 4 6 2のいずれか1つを含むD N A標的化セグメントを含み、かつ／または

( c ) 前記第1のガイドR N Aが、配列番号5 2 4 ~ 5 4 5、7 5 4 ~ 7 7 5、9 8 4 ~ 1 0 0 5および1 2 1 4 ~ 1 2 3 5のいずれか1つ、配列番号2 9 5 ~ 2 9 7、5 2 5 ~ 5 2 7、7 5 5 ~ 7 5 7、9 8 5 ~ 9 8 7、1 2 1 5 ~ 1 2 1 7、3 0 7、3 0 9、5 3

40

50

7、539、767、769、997、999、1227および1229のいずれか1つ、または配列番号307、309、537、539、767、769、997、999、1227および1229のいずれか1つを含む、

請求項44に記載の組合せ物。

【請求項46】

前記細胞がマウス細胞であり、

(a) 前記第1のガイドRNA標的配列が、配列番号259～263のいずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記第1のガイドRNAが、配列番号1643～1647のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、かつ／または

(c) 前記第1のガイドRNAが、配列番号720～724、950～954、1180～1184および1410～1414のいずれか1つを含む、

請求項1から42までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項47】

前記細胞がex vivoまたはin vivoである、請求項1から46までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項48】

前記細胞がin vivoである、請求項47に記載の組合せ物。

【請求項49】

前記細胞が肝臓細胞であり、前記組合せ物がin vivoで肝臓に導入される、請求項48に記載の組合せ物。

【請求項50】

前記細胞が、慢性肝疾患を有するか、またはそのリスクがある対象における肝臓細胞であり、前記組合せ物が、細胞内のHSD17B13遺伝子の発現を改変または変更することにより前記対象を治療するためのものである、請求項1から49までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項51】

前記慢性肝疾患が、非アルコール性脂肪性肝疾患、アルコール性脂肪性肝疾患、肝硬変、または肝細胞癌である、請求項50に記載の組合せ物。

【請求項52】

前記対象が、脂肪性肝炎、線維症、肝硬変および／または肝細胞癌を有するか、またはそのリスクがある、請求項50または51に記載の組合せ物。

【請求項53】

前記対象がヒト対象である、請求項50から52までのいずれか一項に記載の組合せ物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2017年1月23日に出願された米国出願第62/449,335号、2017年3月17日に出願された米国出願第62/472,972号、および2017年11月6日に出願された米国出願第62/581,918号の利益を主張し、これらの文献それぞれの全体が、全ての目的のために参照によって本明細書において援用される。

【0002】

EF-S WEBを介してテキストファイルとして提出された配列表の参照

ファイル507242SEQLIST.txtに記載された配列表は507キロバイトであり、2018年1月19日に作成され、これにより参照により組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

背景

慢性肝疾患および肝硬変は、米国における罹患率および死亡率の主な原因であり、201

10

20

30

40

50

4年には38,170件の死亡（全死亡の1.5%）の原因となった（Kochanekら（2016年）Natl Vital Stat Rep、65巻：1～122頁、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。米国における肝硬変の最も一般的な病因は、アルコール性肝疾患、慢性C型肝炎、および非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）であり、合わせて、2004年から2013年の間に肝移植を待つ患者の約80%を占めた（Wongら（2015年）Gastroenterology、148巻：547～555頁、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。米国におけるNAFLDの推定有病率は19～46パーセントの間であり（Browningら（2004年）Hepatology、40巻：1387～1395頁；Lazoら（2013年）Am J Epidemiol、178巻：38～45頁；およびWilliamsら（2011年）Gastroenterology、140巻：124～131頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、おそらく、その主な危険因子である肥満症の率の上昇と併せて（Coheんら（2011年）Science、332巻：1519～1523頁、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、経時的に上昇している（Younossiら（2011年）Clin Gastroenterol Hepatol、9巻：524～530頁；quiz e60（2011年）、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。C型肝炎の処置は著しく進歩しているが（Morganら（2013年）Ann Intern Med、158巻：329～337頁およびvan der Meerら（2012年）JAMA、308巻：2584～2593頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、現在のところアルコール性または非アルコール性肝疾患および肝硬変に対する証拠に基づく処置は存在しない。10 20

#### 【0004】

以前のゲノムワイド関連解析（GWAS）により、限られた数の、慢性肝疾患に関する遺伝子およびバリアントが同定されている。今までに最もしっかりと検証された遺伝的関連は、パタチン様ホスホリパーゼDメイン含有3遺伝子（PNPLA3 p. Ile148Met、rs738409）における共通のミスセンスバリアントに関するものであり、これは、最初に非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）のリスクの上昇に関することが見出され（Romeoら（2008年）Nat. Genet.、40巻：1461～1465頁およびSpeliotisら（2011年）PLoS Genet.、7巻：e1001324頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、続いて、疾患の重症度（Rotmanら（2010年）Hepatology、52巻：894～903頁およびSookoianら（2009年）J. Lipid Res.、50巻：2111～2116頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）および進行（Trepoら（2016年）J. Hepatol. doi:10.1016/j.jhep.2016.03.011、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に関連することが見出された。膜貫通6スーパーファミリーメンバー2（TM6SF2）遺伝子の変化によりNAFLDのリスクの上昇が付与されることも示されている（Kozlitinaら（2014年）Nat. Genet.、46巻：352～356頁；Liuら（2014年）Nat. Commun. 5巻：4309頁；およびSookoianら（2015年）Hepatology、61巻：515～525頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。これらの2種のタンパク質の正常な機能は十分には理解されていないにもかかわらず、どちらも、肝細胞の脂質代謝に関与することが提唱されてきた。PNPLA3およびTM6SF2のバリアントが肝疾患のリスクの上昇にどのように寄与するかはまだ解明されていない。GWASにより、臨床的に頻繁に測定される肝細胞傷害および肝臓脂肪蓄積の定量的マーカーである血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）に関連する遺伝因子もいくつか同定された（Chambersら（2011年）Nat. Genet.、43巻：131～1138頁およびYuanら（2008年）Am. J. Hum. Genet.、83巻：520～528頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。今まで、慢性肝疾患に対する保護的遺伝子バリアントは記載されていない。心血管疾患のリスクを低下させるPCSK30 40 50

9の機能喪失型バリアントなどの他の状況での保護的遺伝子バリアントの発見が、新しいクラスの治療薬を開発するための促進要因になっている。

慢性肝疾患の発症および進行の基礎をなす遺伝因子に関する知見により、リスク層別化を改善し、新規の治療戦略の土台をもたらすことができた。肝疾患に関するリスク層別化を改善し、新規の治療法を生じさせるためには、基礎をなす遺伝因子のよりよい理解が必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】Kochanekら(2016年)Natl Vital Stat Rep、65巻:1~122頁  
 Wongら(2015年)Gastroenterology、148巻:547~555頁  
 Browningら(2004年)Hepatology、40巻:1387~1395頁  
 Lazoら(2013年)Am J Epidemiol、178巻:38~45頁  
 Williamsら(2011年)Gastroenterology、140巻:124~131頁  
 Cohenら(2011年)Science、332巻:1519~1523頁  
 Younossiら(2011年)Clin Gastroenterol Hepatol、9巻:524~530頁  
 Morganら(2013年)Ann Intern Med、158巻:329~337頁  
 van der Meerら(2012年)JAMA、308巻:2584~2593頁  
 Romeoら(2008年)Nat. Genet.、40巻:1461~1465頁  
 Speliotisら(2011年)PLoS Genet.、7巻:e1001324頁  
 Rotmanら(2010年)Hepatology、52巻:894~903頁  
 Sookoianら(2009年)J. Lipid Res.、50巻:2111~2116頁  
 Trepoら(2016年)J. Hepatol. doi:10.1016/j.jhep.2016.03.011  
 Kozlitinaら(2014年)Nat. Genet.、46巻:352~356頁  
 Liuら(2014年)Nat. Commun. 5巻:4309頁  
 Sookoianら(2015年)Hepatology、61巻:515~525頁  
 Chambersら(2011年)Nat. Genet.、43巻:131~1138頁  
 Yuanら(2008年)Am. J. Hum. Genet.、83巻:520~528頁

10

20

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

概要

HSD17B13 rs72613567バリアント遺伝子、バリアントHSD17B13転写産物、およびバリアントHSD17B13タンパク質アイソフォームに関する方法および組成物が提供される。

【0007】

一態様では、HSD17B13 rs72613567バリアント遺伝子由来の突然変異体残基を含む単離された核酸が提供される。そのような単離された核酸は、HSD17B13遺伝子の少なくとも15個連続したヌクレオチドを含み得、配列番号1と最適にアライメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間にチミンが挿入されている。必要に応じて必要に応じて、連続したヌクレオチドは、配列番号2と最適にアライメントした場合、配列番号2の12666位を含む配列番号2の対応する配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である。必要に応じて必要に応じて、HSD17B13遺伝子は、ヒトHSD17B13遺伝子である。必要に応じて必要に応じて、単離された核酸は、配列番号2の少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、少なくとも40個、少なくとも45個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも200個、少なくとも300個、少なくとも400個、少なくとも500個、少なくとも600個、

40

50

個、少なくとも 700 個、少なくとも 800 個、少なくとも 900 個、少なくとも 1000 個、少なくとも 2000 個、少なくとも 3000 個、少なくとも 4000 個、少なくとも 5000 個、少なくとも 6000 個、少なくとも 7000 個、少なくとも 8000 個、少なくとも 9000 個、少なくとも 10000 個、少なくとも 11000 個、少なくとも 12000 個、少なくとも 13000 個、少なくとも 14000 個、少なくとも 15000 個、少なくとも 16000 個、少なくとも 17000 個、少なくとも 18000 個、または少なくとも 19000 個連続したヌクレオチドを含む。

#### 【 0008 】

一部のそのような単離された核酸は、遺伝子の 1 つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に対して欠失している H S D 1 7 B 1 3 ミニ遺伝子を含む。必要に応じて必要に応じて、欠失したセグメントは、1 つまたは複数のインtron 配列を含む。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 のインtron 6 に対応するインtron をさらに含む。必要に応じて、インtron は、配列番号 2 のインtron 6 である。

10

#### 【 0009 】

別の態様では、異なる H S D 1 7 B 1 3 m R N A 転写産物または c D N A に対応する単離された核酸が提供される。一部のそのような単離された核酸は、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の全部または一部をコードする少なくとも 15 個連続したヌクレオチドを含み、ここで、連続した核酸は、配列番号 4 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A ) には存在しない、配列番号 7 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D )、配列番号 10 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 G )、および配列番号 11 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 H ) に存在するセグメントと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一であるセグメントを含む。必要に応じて、連続したヌクレオチドは、配列番号 11 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 H ) には存在しない、配列番号 7 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ) に存在するセグメントと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一であるセグメントをさらに含み、連続したヌクレオチドは、配列番号 10 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 G ) には存在しない、配列番号 7 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ) に存在するセグメントと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一であるセグメントをさらに含む。必要に応じて、連続したヌクレオチドは、配列番号 7 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ) には存在しない、配列番号 11 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 H ) に存在するセグメントと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一であるセグメントをさらに含む。必要に応じて、連続したヌクレオチドは、配列番号 7 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ) には存在しない、配列番号 10 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 G ) に存在するセグメントと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一であるセグメントをさらに含む。

20

#### 【 0010 】

一部のそのような単離された核酸は、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の全部または一部をコードする少なくとも 15 個連続したヌクレオチドを含み、ここで、連続したヌクレオチドは、配列番号 4 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A ) には存在しない、配列番号 8 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 E ) に存在するセグメントと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一であるセグメントを含む。必要に応じて、連続したヌクレオチドは、配列番号 11 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 H ) には存在しない、配列番号 8 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 E ) に存在するセグメントと少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一であるセグメントをさらに含む。

30

40

50

## 【0011】

一部そのような単離された核酸は、HSD17B13タンパク質の全部または一部をコードする少なくとも15個連続したヌクレオチドを含み、ここで、連続したヌクレオチドは、配列番号4(HSD17B13転写産物A)には存在しない、配列番号9(HSD17B13転写産物F)に存在するセグメントと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるセグメントを含む。

## 【0012】

一部のそのような単離された核酸は、HSD17B13タンパク質の全部または一部をコードする少なくとも15個連続したヌクレオチドを含み、ここで、連続したヌクレオチドは、配列番号4(HSD17B13転写産物A)には存在しない、配列番号6(HSD17B13転写産物C)に存在するセグメントと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるセグメントを含む。

10

## 【0013】

必要に応じて、HSD17B13タンパク質は、ヒトHSD17B13タンパク質である。必要に応じて、単離された核酸は、HSD17B13タンパク質の全部または一部をコードする少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、少なくとも40個、少なくとも45個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、少なくとも100個、少なくとも200個、少なくとも300個、少なくとも400個、少なくとも500個、少なくとも600個、少なくとも700個、少なくとも800個、少なくとも900個、少なくとも1000個、または少なくとも2000個連続したヌクレオチドを含む。

20

## 【0014】

一部のそのような単離された核酸は、配列番号6、7、8、9、10、または11に記載の配列(HSD17B13転写産物C、D、E、F、G、またはH)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である配列を含み、それぞれ配列番号14、15、16、17、18、または19に記載の配列を含むHSD17B13タンパク質(HSD17B13アイソフォームC、D、E、F、G、またはH)をコードする。

30

## 【0015】

上記の核酸のいずれかでは、連続したヌクレオチドは、必要に応じて、HSD17B13遺伝子の少なくとも2つの異なるエクソンに由来する配列を、イントロンの介在を伴わずに含み得る。

## 【0016】

別の態様では、上記の単離された核酸のいずれかによってコードされるタンパク質が提供される。

## 【0017】

別の態様では、HSD17B13 rs72613567バリアント遺伝子由来の突然変異体残基とハイブリダイズするか、またはそれに近づく単離された核酸が提供される。そのような単離された核酸は、HSD17B13遺伝子と、配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含むまたはその位置から1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内であるセグメントでハイブリダイズする少なくとも15個連続したヌクレオチドを含み得る。必要に応じて、セグメントは、配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の対応する配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である。必要に応じて、セグメントは、配列番号2の少なくとも20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、

40

50

800個、900個、1000個、または2000個連続したヌクレオチドを含む。必要に応じて、セグメントは、配列番号2の12666位または配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含む。必要に応じて、HSD17B13遺伝子は、ヒトHSD17B13遺伝子である。必要に応じて、単離された核酸は、最大で約30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、または1000ヌクレオチドまでの長さである。必要に応じて、単離された核酸は、異種核酸と連結しているか、または異種標識を含む。必要に応じて、異種標識は蛍光標識である。

【0018】

別の態様では、異なるHSD17B13 mRNA転写産物またはcDNAとハイブリダイズする単離された核酸が提供される。一部のそのような単離された核酸は、HSD17B13タンパク質をコードする核酸の少なくとも15個連続したヌクレオチドとハイブリダイズし、ここで、連続したヌクレオチドは、配列番号4(HSD17B13転写産物A)には存在しない、配列番号7(HSD17B13転写産物D)、配列番号10(HSD17B13転写産物G)、および配列番号11(HSD17B13転写産物H)に存在するセグメントと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるセグメントを含む。

10

【0019】

一部のそのような単離された核酸は、HSD17B13タンパク質をコードする核酸の少なくとも15個連続したヌクレオチドとハイブリダイズし、ここで、連続したヌクレオチドは、配列番号4(HSD17B13転写産物A)には存在しない、配列番号8(HSD17B13転写産物E)および配列番号11(HSD17B13転写産物H)に存在するセグメントと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるセグメントを含む。

20

【0020】

一部のそのような単離された核酸は、HSD17B13タンパク質をコードする核酸の少なくとも15個連続したヌクレオチドとハイブリダイズし、ここで、連続したヌクレオチドは、配列番号4(HSD17B13転写産物A)には存在しない、配列番号9(HSD17B13転写産物F)内のセグメントと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるセグメントを含む。

30

【0021】

一部のそのような単離された核酸は、HSD17B13タンパク質をコードする核酸の少なくとも15個連続したヌクレオチドとハイブリダイズし、ここで、連続したヌクレオチドは、配列番号4(HSD17B13転写産物A)には存在しない、配列番号6(HSD17B13転写産物C)に存在するセグメントと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるセグメントを含む。

40

【0022】

必要に応じて、HSD17B13タンパク質は、ヒトHSD17B13タンパク質である。必要に応じて、単離された核酸は、最大で約30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、または1000ヌクレオチドまでの長さである。必要に応じて、単離された核酸は、異種核酸と連結しているか、または異種標識を含む。必要に応じて、異種標識は蛍光標識である。

【0023】

必要に応じて、上記の単離された核酸のいずれかは、DNAを含む。必要に応じて、上記の単離された核酸のいずれかは、RNAを含む。必要に応じて、上記の単離された核酸のいずれかは、アンチセンスRNA、低分子ヘアピン型RNA、または低分子干渉RNAである。必要に応じて、上記の単離された核酸のいずれかは、非天然ヌクレオチドを含み得

50

る。

【0024】

別の態様では、上記の単離された核酸のいずれかおよび異種核酸配列を含むベクターおよび外因性ドナー配列が提供される。

【0025】

別の態様では、上記の単離された核酸のいずれか、ベクター、または外因性ドナー配列の、対象におけるHSD17B13 rs72613567バリエントを検出する方法、対象におけるHSD17B13転写産物C、D、E、F、G、またはHの存在を検出する方法、対象の慢性肝疾患の発症のさせやすさを決定する方法、対象を脂肪性肝疾患と診断する方法、または細胞内のHSD17B13遺伝子を改変する方法、細胞内のHSD17B13遺伝子の発現を変更するための方法における使用が提供される。

10

【0026】

別の態様では、HSD17B13遺伝子を標的とするガイドRNAが提供される。そのようなガイドRNAは、HSD17B13遺伝子に結合させるかまたはHSD17B13遺伝子を切断するようにCas酵素を方向付けるのに有効であり得、ここで、ガイドRNAは、HSD17B13遺伝子内のガイドRNA認識配列とハイブリダイズするDNA標的化セグメントを含む。すなわち、そのようなガイドRNAは、HSD17B13遺伝子に結合させるかまたはHSD17B13遺伝子を切断するようにCas酵素を方向付けるのに有効であり得、ここで、ガイドRNAは、HSD17B13遺伝子内のガイドRNA標的配列を標的とするDNA標的化セグメントを含む。そのようなガイドRNAは、HSD17B13遺伝子に結合させるかまたはHSD17B13遺伝子を切断するようにCas酵素を方向付けるのに有効であり得、ここで、ガイドRNAは、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含むかまたはその位置に近接しているHSD17B13遺伝子内のガイドRNA標的配列を標的とするDNA標的化セグメントを含む。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、配列番号226～239および264～268のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、DNA標的化セグメントは、配列番号1629～1642および1648～1652のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、ガイドRNAは、配列番号706～719；936～949；1166～1179、1396～1409、725～729、955～959、1185～1189、および1415～1419のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、配列番号226～239または配列番号230および231から選択される。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、配列番号226～230および264～268から選択される。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および/またはイントロン6に対応する領域内である。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および/またはイントロン6および/またはエクソン7に対応する領域内である。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置から約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内である。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含む。

20

【0027】

そのようなガイドRNAは、HSD17B13遺伝子に結合させるかまたはHSD17B13遺伝子を切断するようにCas酵素を方向付けるのに有効であり得、ここで、ガイドRNAは、HSD17B13遺伝子の開始コドンを含むかまたはそれに近接しているHSD17B13遺伝子内のガイドRNA標的配列を標的とするDNA標的化セグメントを含

30

40

50

む。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、配列番号20～81および259～263のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、DNA標的化セグメントは、配列番号1423～1484および1643～1647のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、ガイドRNAは、配列番号500～561、730～791、960～1021、1190～1251、720～724、950～954、1180～1184、および1410～1414のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、配列番号20～81および259～263から選択される。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、配列番号21～23、33、および35から選択される。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、配列番号33および35から選択される。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン1に対応する領域内である。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、開始コドンから約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内である。

#### 【0028】

そのようなガイドRNAは、HSD17B13遺伝子に結合させるかまたはHSD17B13遺伝子を切断するようにCas酵素を方向付けるのに有效であり得、ここで、ガイドRNAは、HSD17B13遺伝子の終止コドンを含むかまたはそれに近接しているHSD17B13遺伝子内のガイドRNA標的配列を標的とするDNA標的化セグメントを含む。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、配列番号82～225のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、DNA標的化セグメントは、配列番号1485～1628のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、ガイドRNAは、配列番号562～705、792～935、1022～1165、および1252～1395のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、配列番号82～225から選択される。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン7に対応する領域内である。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、終止コドンから約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内である。

#### 【0029】

必要に応じて、HSD17B13遺伝子は、ヒトHSD17B13遺伝子である。必要に応じて、HSD17B13遺伝子は、配列番号2を含む。

#### 【0030】

一部のそのようなガイドRNAは、DNA標的化セグメントを含む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(CRISPR)RNA(crrRNA)およびトランスクレッセス活性化型CRISPR RNA(tracrRNA)を含む。必要に応じて、ガイドRNAは、crrRNAおよびtracrRNAが互いにハイブリダイズする別々の分子であるモジュラーガイドRNAである。必要に応じて、crrRNAは、配列番号1421に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、tracrRNAは、配列番号1422に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、ガイドRNAは、crrRNAがtracrRNAとリンクを介して融合している単一ガイドRNAである。必要に応じて、単一ガイドRNAは、配列番号1420および256～258のいずれか1つに記載の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

#### 【0031】

別の態様では、本明細書に開示されるHSD17B13転写産物内の配列とハイブリダイズするアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAが提供される。一部のそのようなアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、配列番号4(HSD17B

13 転写産物 A ) 内の配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンス RNA 、 si RNA 、または sh RNA は、細胞内の HSD17B13 転写産物 A の発現を低減し得る。必要に応じて、アンチセンス RNA 、 si RNA 、または sh RNA は、配列番号 7 ( HSD17B13 転写産物 D ) には存在しない、配列番号 4 ( HSD17B13 転写産物 A ) に存在する配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンス RNA 、 si RNA 、または sh RNA は、配列番号 4 ( HSD17B13 転写産物 A ) のエクソン 7 内の配列またはエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる配列とハイブリダイズする。一部のそのようなアンチセンス RNA 、 si RNA 、または sh RNA は、配列番号 7 ( HSD17B13 転写産物 D ) 内の配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンス RNA 、 si RNA 、または sh RNA は、細胞内の HSD17B13 転写産物 D の発現を低減し得る。必要に応じて、アンチセンス RNA 、 si RNA 、または sh RNA は、配列番号 4 ( HSD17B13 転写産物 A ) には存在しない、配列番号 7 ( HSD17B13 転写産物 D ) に存在する配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンス RNA 、 si RNA 、または sh RNA は、配列番号 7 ( HSD17B13 転写産物 D ) のエクソン 7 内の配列またはエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる配列とハイブリダイズする。

#### 【 0032 】

別の態様では、上記のガイド RNA 、アンチセンス RNA 、 si RNA 、または sh RNA のいずれかをコードする DNA が提供される。別の態様では、上記のガイド RNA 、アンチセンス RNA 、 si RNA 、または sh RNA のいずれかをコードする DNA および異種核酸を含むベクターが提供される。別の態様では、細胞内の HSD17B13 遺伝子を改変する方法または細胞内の HSD17B13 遺伝子の発現を変更するための方法における、上記のガイド RNA 、アンチセンス RNA 、 si RNA 、もしくは sh RNA 、ガイド RNA 、アンチセンス RNA 、 si RNA 、もしくは sh RNA をコードする DNA 、またはガイド RNA 、アンチセンス RNA 、 si RNA 、もしくは sh RNA をコードする DNA を含むベクターのいずれかの使用が提供される。

#### 【 0033 】

別の態様では、上記の単離された核酸のいずれか、上記のガイド RNA のいずれか、上記の単離されたポリペプチドのいずれか、上記のアンチセンス RNA 、 si RNA 、もしくは sh RNA のいずれか、上記のベクターのいずれか、または上記の外因性ドナー配列のいずれかを含む組成物が提供される。必要に応じて、組成物は、上記のガイド RNA のいずれかおよび Cas9 タンパク質などの Cas タンパク質を含む。必要に応じて、そのような組成物は、単離されたポリペプチド、ガイド RNA 、アンチセンス RNA 、 si RNA 、 sh RNA 、単離された核酸、ベクター、または外因性ドナー配列の安定性を増大させる担体を含む。必要に応じて、担体は、ポリ ( 乳酸 ) ( PLA ) マイクロスフェア、ポリ ( D , L - 乳酸・ポリグリコール酸共重合体 ) ( PLGA ) マイクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コクリエート ( lipid cochleate ) 、または脂質微小管 ( lipid microtubule ) を含む。

#### 【 0034 】

上記の単離された核酸のいずれか、上記のガイド RNA のいずれか、上記のアンチセンス RNA 、 si RNA 、もしくは sh RNA のいずれか、上記の単離されたポリペプチドのいずれか、または上記のベクターのいずれかを含む細胞も提供される。必要に応じて、細胞は、ヒト細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、またはラット細胞である。必要に応じて、上記の細胞のいずれかは、肝細胞または多能性細胞である。

#### 【 0035 】

細胞内の HSD17B13 遺伝子を改変する方法または細胞内の HSD17B13 遺伝子の発現を変更するための方法における上記のガイド RNA のいずれかの使用も提供される。細胞内の HSD17B13 遺伝子の発現を変更するための方法における上記のアンチセンス RNA 、 si RNA 、または sh RNA のいずれかの使用も提供される。

#### 【 0036 】

10

20

30

40

50

細胞を改変するか、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を改変するか、またはH S D 1 7 B 1 3 遺伝子の発現を変更する方法も提供される。一部のそのような方法は、細胞内のH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を改変するためのものであり、細胞のゲノムを、( a ) C a s タンパク質；および( b ) C a s タンパク質と複合体を形成し、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内のガイドR N A 標的配列を標的とするガイドR N A であって、ガイドR N A 標的配列が、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の1 2 6 6 6位に対応する位置を含むかまたはその位置に近接している、ガイドR N A と接触させるステップを含み、C a s タンパク質が、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を切断する。必要に応じて、C a s タンパク質は、C a s 9 タンパク質である。必要に応じて、ガイドR N A 標的配列は、配列番号2 2 6 ~ 2 3 9 および2 6 4 ~ 2 6 8 のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、D N A 標的化セグメントは、配列番号1 6 2 9 ~ 1 6 4 2 および1 6 4 8 ~ 1 6 5 2 のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、ガイドR N A は、配列番号7 0 6 ~ 7 1 9 ; 9 3 6 ~ 9 4 9 ; 1 1 6 6 ~ 1 1 7 9 、1 3 9 6 ~ 1 4 0 9 、7 2 5 ~ 7 2 9 、9 5 5 ~ 9 5 9 、1 1 8 5 ~ 1 1 8 9 、および1 4 1 5 ~ 1 4 1 9 のいずれか1つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、ガイドR N A 標的配列は、配列番号2 2 6 ~ 2 3 9 から選択されるか、または、ガイドR N A 標的配列は、配列番号2 3 0 および2 3 1 から選択される。必要に応じて、ガイドR N A 標的配列は、配列番号2 2 6 ~ 2 3 9 および2 6 4 ~ 2 6 8 から選択されるか、または配列番号2 6 4 ~ 2 6 8 から選択される。必要に応じて、ガイドR N A 標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および／またはイントロン6に対応する領域内である。必要に応じて、ガイドR N A 標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および／またはイントロン6および／またはエクソン7に対応する領域内である。必要に応じて、ガイドR N A 標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の1 2 6 6 6位に対応する位置から約1 0 0 0 、5 0 0 、4 0 0 、3 0 0 、2 0 0 、1 0 0 、5 0 、4 5 、4 0 、3 5 、3 0 、2 5 、2 0 、1 5 、1 0 、または5ヌクレオチドの範囲内である。必要に応じて、ガイドR N A 標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の1 2 6 6 6位に対応する位置を含む。

### 【 0 0 3 7 】

一部のそのような方法は、ゲノムを、配列番号2の1 2 6 6 6位に対応する位置の5'側の標的配列とハイブリダイズする5'相同アームおよび配列番号2の1 2 6 6 6位に対応する位置の3'側の標的配列とハイブリダイズする3'相同アームを含む外因性ドナー配列と接触させるステップをさらに含み、外因性ドナー配列がH S D 1 7 B 1 3 遺伝子と組換えられる。必要に応じて、外因性ドナー配列は、5'相同アームと3'相同アームに挟まれた核酸挿入物をさらに含む。必要に応じて、核酸挿入物はチミンを含み、外因性ドナー配列がH S D 1 7 B 1 3 遺伝子と組換えられると、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の1 2 6 6 5位に対応するヌクレオチドと1 2 6 6 6位に対応するヌクレオチドとの間にチミンが挿入される。必要に応じて、外因性ドナー配列は、約5 0 ヌクレオチド～約1 k b の長さまたは約8 0 ヌクレオチド～約2 0 0 ヌクレオチドの長さである。必要に応じて、外因性ドナー配列は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドである。

### 【 0 0 3 8 】

一部のそのような方法は、細胞内のH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を改変するためのものであり、細胞のゲノムを、( a ) C a s タンパク質；および( b ) C a s タンパク質と複合体を形成し、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の第1のガイドR N A 標的配列を標的とする第1のガイドR N A であって、第1のガイドR N A 標的配列が、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンを含むか、または開始コドンから約1 0 、2 0 、3 0 、4 0 、5 0 、1 0 0 、2 0 0 、3 0 0 、4 0 0 、5 0 0 、または1, 0 0 0 ヌクレオチドの範囲内であるか、または配

10

20

30

40

50

列番号 20 ~ 81 から選択されるか、または配列番号 20 ~ 81 および 259 ~ 263 から選択される第 1 のガイド RNA と接触させるステップを含み、Cas タンパク質が、HSD17B13 遺伝子を切断するか、またはその発現を変更する。必要に応じて、第 1 のガイド RNA 標的配列は、配列番号 20 ~ 81 および 259 ~ 263 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、第 1 のガイド RNA 標的配列は、配列番号 20 ~ 41 のいずれか 1 つ、配列番号 21 ~ 23、33、および 35 のいずれか 1 つ、または配列番号 33 および 35 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、第 1 のガイド RNA は、配列番号 1423 ~ 1484 および 1643 ~ 1647 のいずれか 1 つを含む DNA 標的化セグメントを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、第 1 のガイド RNA は、配列番号 1447 ~ 1468 のいずれか 1 つ、配列番号 1448 ~ 1450、1460、および 1462 のいずれか 1 つ；または配列番号 1460 および 1462 のいずれか 1 つを含む DNA 標的化セグメントを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、第 1 のガイド RNA は、配列番号 500 ~ 561、730 ~ 791、960 ~ 1021、1190 ~ 1251、720 ~ 724、950 ~ 954、1180 ~ 1184、および 1410 ~ 1414 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、第 1 のガイド RNA は、配列番号 524 ~ 545、754 ~ 775、984 ~ 1005、および 1214 ~ 1235 のいずれか 1 つ、または配列番号 295 ~ 297、525 ~ 527、755 ~ 757、985 ~ 987、1215 ~ 1217、307、309、537、539、767、769、997、999、1227、および 1229 のいずれか 1 つ、または配列番号 307、309、537、539、767、769、997、999、1227、および 1229 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、第 1 のガイド RNA 標的配列は、配列番号 20 ~ 41 から選択されるか、配列番号 21 ~ 23、33、および 35 から選択されるか、または配列番号 33 および 35 から選択される。必要に応じて、Cas タンパク質は、Cas9 タンパク質である。必要に応じて、Cas タンパク質は、ヌクレアーゼ活性 Cas タンパク質である。必要に応じて、Cas タンパク質は、転写活性化ドメインと融合したヌクレアーゼ不活性 Cas タンパク質または転写リプレッサードメインと融合したヌクレアーゼ不活性 Cas タンパク質である。

#### 【0039】

一部のそのような方法は、細胞のゲノムを、Cas タンパク質と複合体を形成し、HSD17B13 遺伝子内の第 2 のガイド RNA 標的配列を標的とする第 2 のガイド RNA であって、第 2 のガイド RNA 標的配列が HSD17B13 遺伝子の終止コドンを含むか、または終止コドンから約 10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または 1,000 ヌクレオチドの範囲内であるか、または配列番号 82 ~ 225 から選択される第 2 のガイド RNA と接触させるステップをさらに含み、ここで、細胞は、第 1 のガイド RNA 標的配列と第 2 のガイド RNA 標的配列との間に欠失を含むように改変されている。必要に応じて、第 2 のガイド RNA 標的配列は、配列番号 82 ~ 225 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、第 2 のガイド RNA は、配列番号 1485 ~ 1628 のいずれか 1 つを含む DNA 標的化セグメントを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。必要に応じて、第 2 のガイド RNA は、配列番号 562 ~ 705、792 ~ 935、1022 ~ 1165、および 1252 ~ 1395 のいずれか 1 つを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

#### 【0040】

一部のそのような方法は、細胞内の HSD17B13 遺伝子の発現を低減するか、または細胞内の特定の HSD17B13 転写産物（例えば、転写産物 A もしくは転写産物 D）の発現を低減するためのものである。一部のそのような方法は、細胞内の HSD17B13 遺伝子の発現を低減するためのものであり、細胞のゲノムを、配列番号 4 (HSD17B13 転写産物 A) のエクソン 7 内の配列とハイブリダイズし、HSD17B13 転写産物

10

20

30

40

50

Aの発現を低減するアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAと接触させるステップを含む。一部のそのような方法は、細胞内のHSD17B13遺伝子の発現を低減するためのものであり、細胞のゲノムを、本明細書に開示されるHSD17B13転写産物内の配列とハイブリダイズするアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAと接触させるステップを含む。一部のそのような方法では、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、配列番号4(HSD17B13転写産物A)内の配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、細胞内のHSD17B13転写産物Aの発現を低減し得る。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、配列番号7(HSD17B13転写産物D)には存在しない、配列番号4(HSD17B13転写産物A)に存在する配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、配列番号4(HSD17B13転写産物A)のエクソン7内の配列またはエクソン6とエクソン7との境界にまたがる配列とハイブリダイズする。一部のそのような方法では、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、配列番号7(HSD17B13転写産物D)内の配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、細胞内のHSD17B13転写産物Dの発現を低減し得る。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、配列番号4(HSD17B13転写産物A)には存在しない、配列番号7(HSD17B13転写産物D)に存在する配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、配列番号7(HSD17B13転写産物D)のエクソン7内の配列またはエクソン6とエクソン7との境界にまたがる配列とハイブリダイズする。

#### 【0041】

HSD17B13遺伝子を改変するか、またはHSD17B13遺伝子の発現を変更するための上記の方法のいずれかでは、方法は、細胞に発現ベクターを導入するステップをさらに含み得、発現ベクターは、組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えHSD17B13遺伝子を含む。必要に応じて、組換えHSD17B13遺伝子は、ヒト遺伝子である。必要に応じて、組換えHSD17B13遺伝子は、遺伝子の1つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型HSD17B13遺伝子に対して欠失しているHSD17B13ミニ遺伝子である。必要に応じて、欠失したセグメントは、1つまたは複数のイントロン配列を含む。必要に応じて、HSD17B13ミニ遺伝子は、配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のイントロン6に対応するイントロンを含む。

#### 【0042】

HSD17B13遺伝子を改変するか、またはHSD17B13遺伝子の発現を変更するための上記の方法のいずれかでは、方法は、細胞に発現ベクターを導入するステップをさらに含み得、発現ベクターは、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードする核酸を含む。必要に応じて、HSD17B13タンパク質をコードする核酸は、配列番号7と最適にアラインメントした場合、配列番号7(HSD17B13転写産物D)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。

#### 【0043】

HSD17B13遺伝子を改変するか、またはHSD17B13遺伝子の発現を変更するための上記の方法のいずれかでは、方法は、細胞にHSD17B13タンパク質またはその断片を導入するステップをさらに含み得る。必要に応じて、HSD17B13タンパク質またはその断片は、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。

10

20

30

40

50

## 【0044】

一部のそのような方法は、細胞を改变するためのものであり、細胞に発現ベクターを導入するステップを含み、ここで、発現ベクターは、組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えHSD17B13遺伝子を含む。必要に応じて、組換えHSD17B13遺伝子は、ヒト遺伝子である。必要に応じて、組換えHSD17B13遺伝子は、遺伝子の1つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型HSD17B13遺伝子に対して欠失しているHSD17B13ミニ遺伝子である。必要に応じて、欠失したセグメントは、1つまたは複数のイントロン配列を含む。必要に応じて、HSD17B13ミニ遺伝子は、配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のイントロン6に対応するイントロンを含む。

10

## 【0045】

一部のそのような方法は、細胞を改变するためのものであり、細胞に発現ベクターを導入するステップを含み、ここで、発現ベクターは、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードする核酸は、配列番号7と最適にアラインメントした場合、配列番号7(HSD17B13転写産物D)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。

20

## 【0046】

一部のそのような方法は、細胞を改变するためのものであり、細胞にHSD17B13タンパク質またはその断片を導入するステップを含む。必要に応じて、HSD17B13タンパク質またはその断片は、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。

## 【0047】

細胞を改变するか、HSD17B13遺伝子を改变するか、またはHSD17B13遺伝子の発現を変更する上記の方法のいずれかでは、細胞は、ヒト細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、またはラット細胞であってよい。細胞はいずれも、多能性細胞または分化細胞であってよい。細胞はいずれも、肝細胞であってよい。細胞を改变するか、HSD17B13遺伝子を改变するか、またはHSD17B13遺伝子の発現を変更する上記の方法のいずれかでは、方法または細胞は、*e x v i v o*におけるものであっても*i n v i v o*におけるものであってもよい。上記の方法のいずれかに使用されるガイドRNAは、互いにハイブリダイズする別々のc<sub>r</sub>RNAおよびt<sub>r a c r</sub>RNA分子を含むモジュラーガイドRNAであってもよく、c<sub>r</sub>RNA部分がt<sub>r a c r</sub>RNA部分と融合した(例えば、リンクーによって)単一ガイドRNAであってもよい。

30

## 【0048】

別の態様では、慢性肝疾患有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法が提供される。別の態様では、アルコール性または非アルコール性肝疾患有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法が提供される。そのような対象は、例えば、HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではない対象またはホモ接合体HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではない対象であってよい。一部のそのような方法は、HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、対象に、(a)Casタンパク質またはCasタンパク質をコードする核酸；(b)ガイドRNAまたはガイドRNAをコードする核酸であって、ガイドRNAが、Casタンパク質と複合体を形成し、HSD17B13遺伝子内のガイドRNA標的配列を標的とし、ガイドRNA標的配列が、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含むかまたはその位置に近接し

40

50

ている、ガイドRNAまたはガイドRNAをコードする核酸；および(c)配列番号2の12666位に対応する位置の5'側の標的配列とハイブリダイズする5'相同アーム、配列番号2の12666位に対応する位置の3'側の標的配列とハイブリダイズする3'相同アーム、および5'相同アームと3'相同アームに挟まれたチミンを含む核酸挿入物を含む外因性ドナー配列を導入するステップを含み、Casタンパク質が、対象の肝細胞内でHSD17B13遺伝子を切断し、外因性ドナー配列が、肝細胞内でHSD17B13遺伝子と組換えられ、外因性ドナー配列がHSD17B13遺伝子と組換えられると、HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間にチミンが挿入される、方法を含む。

10

## 【0049】

必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、配列番号226～239から選択されるか、または、ガイドRNA標的配列は、配列番号230および231から選択される。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、配列番号226～239および264～268から選択される。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および/またはイントロン6に対応する領域内である。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および/またはイントロン6および/またはエクソン7に対応する領域内である。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置から約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内である。必要に応じて、ガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含む。

20

## 【0050】

必要に応じて、外因性ドナー配列は、約50ヌクレオチド～約1kbの長さである。必要に応じて、外因性ドナー配列は、約80ヌクレオチド～約200ヌクレオチドの長さである。必要に応じて、外因性ドナー配列は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドである。

30

## 【0051】

一部のそのような方法は、HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、対象に、(a)Casタンパク質またはCasタンパク質をコードする核酸；(b)第1のガイドRNAまたは第1のガイドRNAをコードする核酸であって、第1のガイドRNAが、Casタンパク質と複合体を形成し、HSD17B13遺伝子内の第1のガイドRNA標的配列を標的とし、第1のガイドRNA標的配列が、HSD17B13遺伝子の開始コドンを含むか、または開始コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内であるか、または配列番号20～81から選択されるかまたは配列番号20～81および259～263から選択される、第1のガイドRNAまたは第1のガイドRNAをコードする核酸；および(c)組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えHSD17B13遺伝子を含む発現ベクターを導入するステップを含み、Casタンパク質が、対象の肝細胞内でHSD17B13遺伝子を切断するか、またはその発現を変更し、発現ベクターが、対象の肝細胞内で組換えHSD17B13遺伝子を発現する、方法を含む。一部のそのような方法は、HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、対象に、(a)Casタンパク質またはCasタンパク質をコードする核酸；(b)第1のガイドRNAまたは第1のガイドRNAをコードする核酸であって、第1のガイドRNAが、Casタンパク質と複合体を

40

50

形成し、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の第1のガイドR N A 標的配列を標的とし、第1のガイドR N A 標的配列が、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンを含むか、または開始コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内であるか、または配列番号20～81から選択されるかまたは配列番号20～81および259～263から選択される、第1のガイドR N A または第1のガイドR N A をコードする核酸；および必要に応じて(c)組換えH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を含む発現ベクターを導入するステップを含み、C a s タンパク質が、対象の肝細胞内でH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を切断するか、またはその発現を変更し、発現ベクターが、対象の肝細胞内で組換えH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を発現する、方法を含む。

#### 【0052】

必要に応じて、第1のガイドR N A 標的配列は、配列番号20～41から選択されるか、配列番号21～23、33、および35から選択されるか、または配列番号33および35から選択される。必要に応じて、C a s タンパク質は、ヌクレアーゼ活性C a s タンパク質である。必要に応じて、C a s タンパク質は、転写リプレッサードメインと融合したヌクレアーゼ不活性C a s タンパク質である。

#### 【0053】

そのような方法は、対象に第2のガイドR N A を導入するステップをさらに含み得、ここで、第2のガイドR N A は、C a s タンパク質と複合体を形成し、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の第2のガイドR N A 標的配列を標的とし、第2のガイドR N A 標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の終止コドンを含むか、または終止コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内であるか、または配列番号82～225から選択され、C a s タンパク質は、肝細胞内のH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を第1のガイドR N A 標的配列内および第2のガイドR N A 標的配列内の両方で切断し、肝細胞は、第1のガイドR N A 標的配列と第2のガイドR N A 標的配列との間に欠失を含むように改変されている。

#### 【0054】

必要に応じて、組換えH S D 1 7 B 1 3 遺伝子は、遺伝子の1つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に対して欠失しているH S D 1 7 B 1 3 ミニ遺伝子である。必要に応じて、欠失したセグメントは、1つまたは複数のイントロン配列を含む。必要に応じて、H S D 1 7 B 1 3 ミニ遺伝子は、配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のイントロン6に対応するイントロンを含む。

#### 【0055】

上記の治療または予防方法のいずれかでは、C a s タンパク質は、C a s 9 タンパク質であり得る。上記の治療または予防方法のいずれかでは、対象は、ヒトであり得る。上記の治療または予防方法のいずれかでは、慢性肝疾患は、脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患(N A F L D)、アルコール性脂肪性肝疾患(alcoholic liver fatty liver disease)、肝硬変、または肝細胞癌であり得る。同様に、上記の方法のいずれかでは、治療または予防方法は、アルコール性肝疾患または非アルコール性肝疾患である肝疾患に対するものであり得る。

#### 【0056】

一部のそのような方法は、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、対象に、配列番号4(H S D 1 7 B 1 3 転写産物A)のエクソン7内の配列またはエクソン6とエクソン7との境界にまたがる配列とハイブリダイズし、対象の肝細胞内のH S D 1 7 B 1 3 転写産物Aの発現を低減するアンチセンスR N A、s i R N A、またはs h R N Aを導入するステップを含む方法を含む。一部のそのような方法は、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患有するかまたはそ

10

20

30

40

50

れを発症しやすい対象を処置する方法であって、対象に、本明細書に開示されるHSD17B13転写産物内の配列とハイブリダイズするアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAを導入するステップを含む方法を含む。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、配列番号4(HSD17B13転写産物A)内の配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、細胞内のHSD17B13転写産物Aの発現を低減し得る。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、配列番号7(HSD17B13転写産物D)には存在しない、配列番号4(HSD17B13転写産物A)に存在する配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、配列番号4(HSD17B13転写産物A)のエクソン7内の配列またはエクソン6とエクソン7との境界にまたがる配列とハイブリダイズする。

【0057】

必要に応じて、そのような方法は、対象に発現ベクターを導入するステップをさらに含み、発現ベクターは、組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えHSD17B13遺伝子を含み、発現ベクターが、対象の肝細胞内で組換えHSD17B13遺伝子を発現する。

【0058】

必要に応じて、そのような方法は、対象に発現ベクターを導入するステップをさらに含み、発現ベクターは、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードする核酸を含み、発現ベクターが、対象の肝細胞内でHSD17B13タンパク質をコードする核酸を発現する。必要に応じて、HSD17B13タンパク質をコードする核酸は、配列番号7と最適にアラインメントした場合、配列番号7(HSD17B13転写産物D)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。

【0059】

必要に応じて、そのような方法は、対象にメッセンジャーRNAを導入するステップをさらに含み、メッセンジャーRNAが、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードし、mRNAが、対象の肝細胞内でHSD17B13タンパク質を発現する。必要に応じて、メッセンジャーRNAから逆転写された相補DNAは、配列番号7と最適にアラインメントした場合、配列番号7(HSD17B13転写産物D)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。

【0060】

必要に応じて、そのような方法は、対象にHSD17B13タンパク質またはその断片を導入するステップをさらに含む。必要に応じて、HSD17B13タンパク質またはその断片は、配列番号15(HSD17B13アイソフォームD)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。

【0061】

一部のそのような方法は、HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、対象に発現ベクターを導入するステップを含み、発現ベクターが、組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えHSD17B13遺伝子を含み、発現ベクターが、対象の肝細胞内で組換え

10

20

30

40

50

H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を発現する、方法を含む。

【 0 0 6 2 】

上記の方法のいずれかでは、組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子は、ヒト遺伝子であり得る。上記の方法のいずれかでは、組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子は、配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であってよい。上記の方法のいずれかでは、組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子は、遺伝子の 1 つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に対して欠失している H S D 1 7 B 1 3 ミニ遺伝子であり得る。必要に応じて、欠失したセグメントは、1 つまたは複数のインtron 配列を含む。必要に応じて、H S D 1 7 B 1 3 ミニ遺伝子は、配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 のインtron 6 に対応するインtron を含む。

10

【 0 0 6 3 】

一部のそのような方法は、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、対象に発現ベクターを導入するステップを含み、発現ベクターが、配列番号 1 5 ( H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D ) と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一である H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸を含み、発現ベクターが、対象の肝細胞内で H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸を発現する、方法を含む。必要に応じて、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸は、配列番号 7 と最適にアラインメントした場合、配列番号 7 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ) と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一である。

20

【 0 0 6 4 】

一部のそのような方法は、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、対象にメッセンジャー R N A を導入するステップを含み、メッセンジャー R N A が、配列番号 1 5 ( H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D ) と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一である H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードし、m R N A が、対象の肝細胞内で H S D 1 7 B 1 3 タンパク質を発現する、方法を含む。必要に応じて、メッセンジャー R N A から逆転写された相補 D N A は、配列番号 7 と最適にアラインメントした場合、配列番号 7 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ) と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一である。

30

【 0 0 6 5 】

一部のそのような方法は、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、対象の肝臓に H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片を導入するステップを含む方法を含む。必要に応じて、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片は、配列番号 1 5 ( H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D ) と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一である。

40

【 0 0 6 6 】

上記の方法のいずれかでは、対象は、ヒトであり得る。上記の方法のいずれかでは、慢性肝疾患は、非アルコール性脂肪性肝疾患 ( N A F L D ) 、アルコール性脂肪性肝疾患、肝硬変、または肝細胞癌であり得る。同様に、上記の方法のいずれかでは、治療または予防方法は、アルコール性肝疾患または非アルコール性肝疾患である肝疾患に対するものであり得る。上記の方法のいずれかでは、対象に導入するステップは、流体力学的送達、ウイ

50

ルス媒介性送達、脂質ナノ粒子媒介性送達、または静脈内注入を含み得る。

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)

H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に結合させるかまたはH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を切断するようにC a s 酵素を方向付けるのに有効なガイドR N A であって、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内のガイドR N A 標的配列を標的とするD N A 標的化セグメントを含む、ガイドR N A。

(項目2)

前記ガイドR N A 標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアライメントした場合、配列番号2の1 2 6 6 6位に対応する位置を含むかまたはその位置に近接している、項目1に記載のガイドR N A。

10

(項目3)

(a) 前記ガイドR N A 標的配列が、配列番号2 2 6 ~ 2 3 9 および2 6 4 ~ 2 6 8 のいずれか1つを含み、かつ/または

(b) 前記D N A 標的化セグメントが、配列番号1 6 2 9 ~ 1 6 4 2 および1 6 4 8 ~ 1 6 5 2 のいずれか1つを含み、かつ/または

(c) 前記ガイドR N A が、配列番号7 0 6 ~ 7 1 9 ; 9 3 6 ~ 9 4 9 ; 1 1 6 6 ~ 1 1 7 9 、1 3 9 6 ~ 1 4 0 9 、7 2 5 ~ 7 2 9 、9 5 5 ~ 9 5 9 、1 1 8 5 ~ 1 1 8 9 、および1 4 1 5 ~ 1 4 1 9 のいずれか1つを含む、項目2に記載のガイドR N A。

(項目4)

(a) 前記ガイドR N A 標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアライメントした場合、配列番号2のエクソン6および/またはイントロン6および/またはエクソン7に対応する領域内であり、かつ/または

20

(b) 前記ガイドR N A 標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアライメントした場合、配列番号2の1 2 6 6 6位に対応する位置から約1 0 0 0 、5 0 0 、4 0 0 、3 0 0 、2 0 0 、1 0 0 、5 0 、4 5 、4 0 、3 5 、3 0 、2 5 、2 0 、1 5 、1 0 、または5ヌクレオチドの範囲内であり、必要に応じて、前記ガイドR N A 標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアライメントした場合、配列番号2の1 2 6 6 6位に対応する位置を含む、項目2または3に記載のガイドR N A。

(項目5)

30

前記ガイドR N A 標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンを含むかまたはそれに近接している、項目1に記載のガイドR N A。

(項目6)

(a) 前記ガイドR N A 標的配列が、配列番号2 0 ~ 8 1 および2 5 9 ~ 2 6 3 のいずれか1つを含み、かつ/または

(b) 前記D N A 標的化セグメントが、配列番号1 4 2 3 ~ 1 4 8 4 および1 6 4 3 ~ 1 6 4 7 のいずれか1つを含み、かつ/または

(c) 前記ガイドR N A が、配列番号5 0 0 ~ 5 6 1 、7 3 0 ~ 7 9 1 、9 6 0 ~ 1 0 2 1 、1 1 9 0 ~ 1 2 5 1 、7 2 0 ~ 7 2 4 、9 5 0 ~ 9 5 4 、1 1 8 0 ~ 1 1 8 4 、および1 4 1 0 ~ 1 4 1 4 のいずれか1つを含む、項目5に記載のガイドR N A。

40

(項目7)

(a) 前記ガイドR N A 標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアライメントした場合、配列番号2のエクソン1に対応する領域内であり、かつ/または

(b) 前記ガイドR N A 標的配列が、前記開始コドンから約1 0 0 0 、5 0 0 、4 0 0 、3 0 0 、2 0 0 、1 0 0 、5 0 、4 5 、4 0 、3 5 、3 0 、2 5 、2 0 、1 5 、1 0 、または5ヌクレオチドの範囲内である、項目5または6に記載のガイドR N A。

(項目8)

前記ガイドR N A 標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の終止コドンを含むかまたはそれに近接している、項目1に記載のガイドR N A。

50

## (項目 9)

(a) 前記ガイドRNA標的配列が、配列番号82～225のいずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記DNA標的化セグメントが、配列番号1485～1628のいずれか1つを含み、かつ／または

(c) 前記ガイドRNAが、配列番号562～705、792～935、1022～1165、および1252～1395のいずれか1つを含む、項目8に記載のガイドRNA。

## (項目10)

(a) 前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン7に対応する領域内であり、かつ／または

(b) 前記ガイドRNA標的配列が、終止コドンから約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内である、項目8または9に記載のガイドRNA。

## (項目11)

前記HSD17B13遺伝子が、ヒトHSD17B13遺伝子またはマウスHsd17b13遺伝子であり、必要に応じて、前記HSD17B13遺伝子が、前記ヒトHSD17B13遺伝子であり、配列番号2を含む、項目1から10までのいずれか一項に記載のガイドRNA。

## (項目12)

前記DNA標的化セグメントを含む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(CRISPR)RNA(crrRNA)およびトランスクレオチド型CRISPR-RNA(tracrRNA)を含む、項目1から11までのいずれか一項に記載のガイドRNA。

## (項目13)

前記crrRNAおよび前記tracrRNAが、互いにハイブリダイズする別々の分子であるモジュラーガイドRNAであり、必要に応じて、前記crrRNAが、配列番号1421に記載の配列を含み、前記tracrRNAが、配列番号1422に記載の配列を含む、項目12に記載のガイドRNA。

## (項目14)

前記crrRNAが前記tracrRNAとリンクを介して融合している単一ガイドRNAであり、必要に応じて、配列番号1420および256～258のいずれか1つに記載の配列を含む、項目12に記載のガイドRNA。

## (項目15)

細胞内のHSD17B13遺伝子を改変する方法、または細胞内のHSD17B13遺伝子の発現を変更するための方法における、項目1から14までのいずれか一項に記載のガイドRNAの使用。

## (項目16)

項目1から14までのいずれか一項に記載のガイドRNAをコードするDNAを含む単離された核酸。

## (項目17)

配列番号4(HSD17B13転写産物A)内の配列とハイブリダイズし、細胞におけるHSD17B13転写産物Aの発現を低減するアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNA。

## (項目18)

(a) 配列番号7(HSD17B13転写産物D)には存在しない、配列番号4(HSD17B13転写産物A)に存在する配列とハイブリダイズし、かつ／または

(b) 配列番号4(HSD17B13転写産物A)のエクソン6とエクソン7との境界にまたがる配列とハイブリダイズする、項目17に記載のアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNA。

10

20

30

40

50

(項目19)

細胞内のHSD17B13遺伝子の発現を変更するための方法における、項目17または18に記載のアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAの使用。

(項目20)

項目17または18に記載のアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAをコードするDNAを含む単離された核酸。

(項目21)

項目16または20に記載の単離された核酸および異種核酸を含むベクター。

(項目22)

項目1から14までのいずれか一項に記載のガイドRNAおよび前記ガイドRNAの安定性を増大させる担体を含む組成物であって、必要に応じて、Casタンパク質をさらに含み、必要に応じて、前記Casタンパク質がCas9である、組成物。

10

(項目23)

項目17または18に記載のアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAと、前記アンチセンスRNA、前記siRNA、または前記shRNAの安定性を増大させる担体とを含む組成物。

(項目24)

項目1から14までのいずれか一項に記載のガイドRNAを含む細胞。

(項目25)

項目17または18に記載のアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAを含む細胞。

20

(項目26)

ヒト細胞であり、必要に応じて、肝細胞である、項目24または25に記載の細胞。

(項目27)

齧歯類細胞、マウス細胞、またはラット細胞であり、必要に応じて、多能性細胞または肝細胞である、項目24または25に記載の細胞。

(項目28)

細胞内のHSD17B13遺伝子を改変する方法であって、前記細胞のゲノムを、

(a) Casタンパク質；および

(b) 前記Casタンパク質と複合体を形成し、前記HSD17B13遺伝子内のガイドRNA標的配列を標的とするガイドRNAであって、前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含むかまたはその位置に近接している、ガイドRNAと接触させるステップを含み、

30

前記Casタンパク質が、前記HSD17B13遺伝子を切断する、方法。

(項目29)

(a) 前記ガイドRNA標的配列が、配列番号226～239および264～268のいずれか1つを含み、かつ／または

(b) 前記DNA標的化セグメントが、配列番号1629～1642および1648～1652のいずれか1つを含み、かつ／または

(c) 前記ガイドRNAが、配列番号706～719；936～949；1166～1179、1396～1409、725～729、955～959、1185～1189、および1415～1419のいずれか1つを含む、項目28に記載の方法。

40

(項目30)

(a) 前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および／またはイントロン6および／またはエクソン7に対応する領域内であり、かつ／または

(b) 前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置から約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20

50

15、10、または5ヌクレオチドの範囲内であり、必要に応じて、前記ガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含む、項目28または29に記載の方法。  
(項目31)

前記ゲノムを、配列番号2の12666位に対応する位置の5'側の標的配列とハイブリダイズする5'相同アームおよび配列番号2の12666位に対応する位置の3'側の標的配列とハイブリダイズする3'相同アームを含む外因性ドナー配列と接触させるステップをさらに含み、前記外因性ドナー配列が、前記HSD17B13遺伝子と組換えられる、項目28から30までのいずれか一項に記載の方法。

(項目32)

前記外因性ドナー配列が、前記5'相同アームと前記3'相同アームとに挟まれた核酸挿入物をさらに含む、項目31に記載の方法。

(項目33)

前記核酸挿入物がチミンを含み、前記外因性ドナー配列が前記HSD17B13遺伝子と組換えられると、前記HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に前記チミンが挿入される、項目32に記載の方法。

(項目34)

(a) 前記外因性ドナー配列が、約50ヌクレオチド～約1kbの長さであり、必要に応じて、前記外因性ドナー配列が、約80ヌクレオチド～約200ヌクレオチドの長さであり、かつ/または

(b) 前記外因性ドナー配列が、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドである、項目31から33までのいずれか一項に記載の方法。

(項目35)

細胞内のHSD17B13遺伝子を改変する方法であって、前記細胞のゲノムを、

(a) Casタンパク質；および

(b) 前記Casタンパク質と複合体を形成し、前記HSD17B13遺伝子内の第1のガイドRNA標的配列を標的とする第1のガイドRNAであって、前記第1のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の開始コドンを含むか、または前記開始コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内である、第1のガイドRNAと接触させるステップを含み、

前記Casタンパク質が、前記HSD17B13遺伝子を切断するかまたは前記HSD17B13遺伝子の発現を変更する、方法。

(項目36)

(a) 前記第1のガイドRNA標的配列が、配列番号20～81および259～263のいずれか1つを含み、必要に応じて、前記第1のガイドRNA標的配列が、配列番号20～41のいずれか1つ、配列番号21～23、33、および35のいずれか1つ、または配列番号33および35のいずれか1つを含み、かつ/または

(b) 前記第1のガイドRNAが、配列番号1423～1484および1643～1647のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、必要に応じて、前記第1のガイドRNAが、配列番号1447～1468のいずれか1つ、配列番号1448～1450、1460、および1462のいずれか1つ；または配列番号1460および1462のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、かつ/または

(c) 前記第1のガイドRNAが、配列番号500～561、730～791、960～1021、1190～1251、720～724、950～954、1180～1184、および1410～1414のいずれか1つを含み、必要に応じて、前記第1のガイドRNAが、配列番号524～545、754～775、984～1005、および1214～1235のいずれか1つ、または配列番号295～297、525～527、755～757、985～987、1215～1217、307、309、537、539、750

10

20

30

40

50

67、769、997、999、1227、および1229のいずれか1つ、または配列番号307、309、537、539、767、769、997、999、1227、および1229のいずれか1つを含む、項目35に記載の方法。

(項目37)

(a) 前記Casタンパク質が、ヌクレアーゼ-活性Casタンパク質である；または

(b) 前記Casタンパク質が、転写活性化ドメインまたは転写リプレッサー-ドメインと融合したヌクレアーゼ-不活性Casタンパク質である、項目35または36のいずれかに記載の方法。

(項目38)

前記細胞のゲノムを、前記Casタンパク質と複合体を形成し、前記HSD17B13遺伝子内の第2のガイドRNA標的配列を標的とする第2のガイドRNAと接触させるステップをさらに含み、前記第2のガイドRNA標的配列が、前記HSD17B13遺伝子の終止コドンを含むか、または前記終止コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内であり、前記細胞が、前記第1のガイドRNA標的配列と前記第2のガイドRNA標的配列との間に欠失を含むように改変されている、項目35から37までのいずれか一項に記載の方法。

10

(項目39)

(a) 前記第2のガイドRNA標的配列が、配列番号82～225のいずれか1つを含み、かつ／または

20

(b) 前記第2のガイドRNAが、配列番号1485～1628のいずれか1つを含むDNA標的化セグメントを含み、かつ／または

(c) 前記第2のガイドRNAが、配列番号562～705、792～935、1022～1165、および1252～1395のいずれか1つを含む、項目38に記載の方法。

(項目40)

細胞内のHSD17B13遺伝子の発現を低減するための方法であって、前記細胞のゲノムを、配列番号4(HSD17B13転写産物A)内の配列とハイブリダイズし、HSD17B13転写産物Aの発現を低減するアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAと接触させるステップを含む、方法。

30

(項目41)

前記アンチセンスRNA、前記siRNA、または前記shRNAが、配列番号7(HSD17B13転写産物D)には存在しない配列番号4(HSD17B13転写産物A)に存在する配列とハイブリダイズし、必要に応じて、前記アンチセンスRNA、前記siRNA、または前記shRNAが、配列番号4(HSD17B13転写産物A)のエクソン6とエクソン7との境界にまたがる配列とハイブリダイズする、項目40に記載の方法。

(項目42)

前記細胞に発現ベクターを導入するステップをさらに含み、前記発現ベクターが、組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む前記組換えHSD17B13遺伝子を含み、必要に応じて、前記組換えHSD17B13遺伝子がヒト遺伝子である、項目35から41までのいずれか一項に記載の方法。

40

(項目43)

前記組換えHSD17B13遺伝子が、前記遺伝子の1つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型HSD17B13遺伝子に対して欠失しているHSD17B13ミニ遺伝子であり、必要に応じて、前記欠失したセグメントが、1つまたは複数のイントロン配列を含み、必要に応じて、前記HSD17B13ミニ遺伝子が、配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のイントロン6に対応するイントロンを含む、項目42に記載の方法。

(項目44)

50

前記細胞に発現ベクターを導入するステップをさらに含み、前記発現ベクターが、配列番号 15 (HSD17B13 アイソフォーム D) と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である HSD17B13 タンパク質をコードする核酸を含み、必要に応じて前記 HSD17B13 タンパク質をコードする前記核酸が、配列番号 7 と最適にアラインメントした場合、配列番号 7 (HSD17B13 転写産物 D) と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である、項目 35 から 41 までのいずれか一項に記載の方法。  
(項目 45)

前記細胞に HSD17B13 タンパク質またはその断片を導入するステップをさらに含み、前記 HSD17B13 タンパク質またはその断片が、配列番号 15 (HSD17B13 アイソフォーム D) と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である、項目 35 から 41 までのいずれか一項に記載の方法。  
(項目 46)

前記 Cas タンパク質が Cas 9 である、項目 28 から 45 までのいずれか一項に記載の方法。  
(項目 47)

細胞を改変するための方法であって、前記細胞に発現ベクターを導入するステップを含み、前記発現ベクターが、組換え HSD17B13 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 12665 位に対応するヌクレオチドと 12666 位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む前記組換え HSD17B13 遺伝子を含み、必要に応じて、前記組換え HSD17B13 遺伝子がヒト遺伝子である、方法。  
(項目 48)

前記組換え HSD17B13 遺伝子が、前記遺伝子の 1 つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型 HSD17B13 遺伝子に対して欠失している HSD17B13 ミニ遺伝子であり、必要に応じて、前記欠失したセグメントが、1 つまたは複数のインtron 配列を含み、必要に応じて、前記 HSD17B13 ミニ遺伝子が、配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 のインtron 6 に対応するインtron を含む、項目 47 に記載の方法。  
(項目 49)

細胞を改変するための方法であって、前記細胞に発現ベクターを導入するステップを含み、前記発現ベクターが、配列番号 15 (HSD17B13 アイソフォーム D) と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である HSD17B13 タンパク質をコードする核酸を含み、必要に応じて、前記 HSD17B13 タンパク質をコードする前記核酸が、配列番号 7 と最適にアラインメントした場合、配列番号 7 (HSD17B13 転写産物 D) と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である、方法。  
(項目 50)

細胞を改変するための方法であって、前記細胞に HSD17B13 タンパク質またはその断片を導入するステップを含み、前記 HSD17B13 タンパク質またはその断片が、配列番号 15 (HSD17B13 アイソフォーム D) と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である、方法。  
(項目 51)

前記細胞が、齧歯類細胞、マウス細胞、またはラット細胞であり、必要に応じて、前記細胞が、多能性細胞または肝細胞である、項目 28 から 50 までのいずれか一項に記載の方法。  
(項目 52)

10

20

30

40

50

前記細胞が、ヒト細胞であり、必要に応じて、前記細胞が、肝細胞である、項目28から50までのいずれか一項に記載の方法。

(項目53)

前記細胞が、*ex vivo*または*in vivo*にある、項目28から52までのいずれか一項に記載の方法。

(項目54)

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象に、

(a) Casタンパク質または前記Casタンパク質をコードする核酸；

(b) ガイドRNAまたは前記ガイドRNAをコードする核酸であって、前記ガイドRNAが、前記Casタンパク質と複合体を形成し、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内のガイドRNA標的配列を標的とし、前記ガイドRNA標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含むかまたはその位置に近接している、ガイドRNAまたは前記ガイドRNAをコードする核酸；および

(c) 配列番号2の12666位に対応する位置の5'側の標的配列とハイブリダイズする5'相同アーム、配列番号2の12666位に対応する位置の3'側の標的配列とハイブリダイズする3'相同アーム、および前記5'相同アームと前記3'相同アームに挟まれたチミンを含む核酸挿入物を含む外因性ドナー配列

を導入するステップを含み、

前記Casタンパク質が、前記対象の肝細胞内で前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を切断し、前記外因性ドナー配列が、前記肝細胞内で前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子と組換えられ、前記外因性ドナー配列が前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子と組換えられると、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に前記チミンが挿入される、方法。

(項目55)

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象に、

(a) Casタンパク質または前記Casタンパク質をコードする核酸；

(b) 第1のガイドRNAまたは前記第1のガイドRNAをコードする核酸であって、前記第1のガイドRNAが、前記Casタンパク質と複合体を形成し、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の第1のガイドRNA標的配列を標的とし、前記第1のガイドRNA標的配列が、前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンを含むか、または前記開始コドンから約100、200、300、400、500、1000、2000、3000、4000、5000、または1,000ヌクレオチドの範囲内であるか、または配列番号20～81から選択される、第1のガイドRNAまたは前記第1のガイドRNAをコードする核酸；および

(c) 組換えH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む前記組換えH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を含む発現ベクターを導入するステップを含み、

前記Casタンパク質が、前記対象の肝細胞内で前記H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を切断するか、またはその発現を変更し、前記発現ベクターが、前記対象の前記肝細胞内で前記組換えH S D 1 7 B 1 3 遺伝子を発現する、方法。

(項目56)

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象に、前記対象の肝細胞内で配列番号4(H S D 1 7 B 1 3 転写産物A)内の配列とハイブリダイズし、H S D 1 7 B 1 3 転写産物Aの発現を低減するアンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAを導入するステップを含む、方法。

10

20

30

40

50

(項目 57)

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象に発現ベクターを導入するステップを含み、前記発現ベクターが、組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位に対応するヌクレオチドと 1 2 6 6 6 位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む前記組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を含み、前記発現ベクターが、前記対象の肝細胞内で前記組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を発現する、方法。

(項目 58)

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象に発現ベクターを導入するステップを含み、前記発現ベクターが、配列番号 1 5 ( H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D ) と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一である H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸を含み、前記発現ベクターが、前記対象の肝細胞内で前記 H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする前記核酸を発現する、方法。

10

(項目 59)

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象にメッセンジャー RNA を導入するステップを含み、前記メッセンジャー RNA が、配列番号 1 5 ( H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D ) と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一である H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードし、前記 mRNA が、前記対象の肝細胞内で前記 H S D 1 7 B 1 3 タンパク質を発現する、方法。

20

(項目 60)

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、前記対象の肝臓に H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片を導入するステップを含み、前記 H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片が、配列番号 1 5 ( H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D ) と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一である、方法。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0067】

【図 1 A】図 1 A および 1 B は、G H S ディスカバリーコホートにおける単一ヌクレオチドバリアントと、アラニンアミノトランスフェラーゼ ( A L T ; 図 1 A ) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ ( A S T ; 図 1 B ) レベル中央値との関連のマンハッタンプロット ( 左側 ) および分位点 - 分位点プロット ( 右側 ) を示す。図 1 A は、 $P < 1.0 \times 10^{-7}$  で A L T レベル ( $N = 41, 414$ ) と有意に関連する 1 6 個の遺伝子中に 3 1 個のバリアントが存在していたことを示す。図 1 B は、 $P < 1.0 \times 10^{-7}$  で A S T レベル ( $N = 40, 753$ ) と有意に関連する 1 0 個の遺伝子中に 1 2 個のバリアントが存在していたことを示す。全ての有意な関連は、表 2 に示される。3 つの別々の欧洲祖先コホートの再現メタ分析において A L T または A S T と依然として有意に関連していた、H S D 1 7 B 1 3 を含む、9 個の遺伝子 ( 本明細書ではその遺伝子名で示される ) 中に 1 3 個のバリアントが存在していた ( 表 3 )。エクソームワイド分位点 - 分位点プロットおよびゲノム対照ラムダ値によって示されるように、関連試験は良好に較正された ( 図 1 A および図 1 B )。

40

【図 1 B】図 1 A および 1 B は、G H S ディスカバリーコホートにおける単一ヌクレオチドバリアントと、アラニンアミノトランスフェラーゼ ( A L T ; 図 1 A ) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ ( A S T ; 図 1 B ) レベル中央値との関連のマンハッタンプロット ( 左側 ) および分位点 - 分位点プロット ( 右側 ) を示す。図 1 A は、 $P < 1.0 \times 10^{-7}$  で A L T レベル ( $N = 41, 414$ ) と有意に関連する 1 6 個の遺伝子中に 3 1 個のバリアントが存在していたことを示す。図 1 B は、 $P < 1.0 \times 10^{-7}$  で A S T レベル ( $N = 40, 753$ ) と有意に関連する 1 0 個の遺伝子中に 1 2 個のバリアントが存在していたことを示す。

50

0 × 1 0 - 7 で A L T レベル ( N = 4 1 , 4 1 4 ) と有意に関連する 1 6 個の遺伝子中に 3 1 個のバリアントが存在していたことを示す。図 1 B は、 P < 1 . 0 × 1 0 - 7 で A S T レベル ( N = 4 0 , 7 5 3 ) と有意に関連する 1 0 個の遺伝子中に 1 2 個のバリアントが存在していたことを示す。全ての有意な関連は、表 2 に示される。3 つの別々の欧州祖先コホートの再現メタ分析において A L T または A S T と依然として有意に関連していた、 H S D 1 7 B 1 3 を含む、 9 個の遺伝子 ( 本明細書ではその遺伝子名で示される ) 中に 1 3 個のバリアントが存在していた ( 表 3 ) 。エクソームワイド分位点 - 分位点プロットおよびゲノム対照ラムダ値によって示されるように、関連試験は良好に較正された ( 図 1 A および図 1 B ) 。

## 【 0 0 6 8 】

【 図 2 A 】 図 2 A および 2 B は、 H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A が、 ディスカバリーコホートにおけるアルコール性および非アルコール性肝疾患表現型のリスクの低下 ( 図 2 A ) 、ならびに肥満外科手術コホートにおける単純脂肪肝から脂肪性肝炎および線維症への進行リスクの低下 ( 図 2 B ) と関連することを示す。オッズ比を、年齢、年齢 2 、性別、 B M I 、および祖先の主成分について調整して、ロジスティック回帰を使用して算出した。ヘテロ接合体 ( H e t O R ) およびホモ接合体 ( H o m O R ) 保因者に関する遺伝子型オッズ比も示される。図 2 A における G H S ディスカバリーコホートにおいては、 H S D 1 7 B 1 3 バリアントは、対立遺伝子用量依存的様式で、非アルコール性およびアルコール性肝疾患、肝硬変、ならびに肝細胞癌のリスクの有意な低下と関連していた。図 2 B における G H S 肥満外科手術コホートにおいては、 H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 は、ヘテロ接合体およびホモ接合体 T A 保因者において、それぞれ、非アルコール性脂肪性肝炎 ( N A S H ) の 1 3 % および 5 2 % 低いオッズ、ならびに線維症の 1 3 % および 6 1 % 低いオッズと関連していた。

【 図 2 B 】 図 2 A および 2 B は、 H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A が、 ディスカバリーコホートにおけるアルコール性および非アルコール性肝疾患表現型のリスクの低下 ( 図 2 A ) 、ならびに肥満外科手術コホートにおける単純脂肪肝から脂肪性肝炎および線維症への進行リスクの低下 ( 国 2 B ) と関連することを示す。オッズ比を、年齢、年齢 2 、性別、 B M I 、および祖先の主成分について調整して、ロジスティック回帰を使用して算出した。ヘテロ接合体 ( H e t O R ) およびホモ接合体 ( H o m O R ) 保因者に関する遺伝子型オッズ比も示される。図 2 A における G H S ディスカバリーコホートにおいては、 H S D 1 7 B 1 3 バリアントは、対立遺伝子用量依存的様式で、非アルコール性およびアルコール性肝疾患、肝硬変、ならびに肝細胞癌のリスクの有意な低下と関連していた。図 2 B における G H S 肥満外科手術コホートにおいては、 H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 は、ヘテロ接合体およびホモ接合体 T A 保因者において、それぞれ、非アルコール性脂肪性肝炎 ( N A S H ) の 1 3 % および 5 2 % 低いオッズ、ならびに線維症の 1 3 % および 6 1 % 低いオッズと関連していた。

## 【 0 0 6 9 】

【 図 3 】 図 3 A ~ 3 D は、 H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 スプライスバリアントのホモ接合体参照 ( T / T ) 、ヘテロ接合体 ( T / T A ) 、およびホモ接合体代替物 ( T A / T A ) 保因者における 4 つの H S D 1 7 B 1 3 転写産物 ( A ~ D ) の発現を示す。各転写産物は、対応する遺伝子モデルと共に例示される。遺伝子モデルにおけるコード領域は、縞模様の囲みで示され、非翻訳領域は、黒色の囲みで示される。図 3 A は、転写産物 A の表示および転写産物 A に関する発現データを示す。図 3 B は、転写産物 B の表示および転写産物 B に関する発現データを示す。転写産物 B において、エクソン 2 はスキップされている。図 3 C は、転写産物 C の表示および転写産物 C に関する発現データを示す。転写産物 C において、エクソン 6 はスキップされている。図 3 D は、転写産物 D の表示および転写産物 D に関する発現データを示す。転写産物 D 中の星印は、タンパク質の早期トランケーションをもたらす、エクソン 6 の 3 ' 末端での r s 7 2 6 1 3 5 6 7 からの G の挿入を示す。転写産物 D は、 H S D 1 7 B 1 3 スプライスバリアントのホモ接合体保因者における優勢な転写産物になる。遺伝子発現は、 F P K M 単位 ( マッピングされたリード 1

10

20

30

40

50

00万あたりの転写産物キロベースあたりの断片数)で示される。図3Bおよび図3Cにおける差込み図は、拡大表示を示す。

【0070】

【図4】図4は、ヒト肝臓のRNA-Seq研究が、6個の新規HSD17B13転写産物(転写産物C~H)を含む、8個のHSD17B13転写産物を示すことを示す。転写産物の発現は、FPKM単位(マッピングされたリード100万あたりの転写産物キロベースあたりの断片数)で示される。転写産物の構造を、図面の右側に提供する。

【0071】

【図5A】図5Aおよび5Bは、それぞれ、ALTおよびASTに関するGHSディスカバリーコホートにおけるHSD17B13のローカスズームプロット(HSD17B13周辺の領域における領域関連プロット)を示す。領域間での有意な組換えは観察されなかった。菱形は、rs72613567スプライスバリアントを示す。それぞれの丸印は、そのバリアントとrs72613567との間の連鎖不均衡(DiscovEHRコホートにおいて算出された $r^2$ )を示す丸印の色と共に単一ヌクレオチドのバリアントを示す。線は、HapMapにおける推定組換え率を示す。下パネルは、遺伝子座中の各遺伝子の相対位置および転写される鎖を示す。ALTまたはASTと、近隣遺伝子HSD17B11中のコードまたはスプライス領域バリアントとの有意な関連は存在しなかった(ALTおよびASTに関する、最も有意なP値は、それぞれ、 $1.4 \times 10^{-1}$ および $4.3 \times 10^{-2}$ である)。

【図5B】図5Aおよび5Bは、それぞれ、ALTおよびASTに関するGHSディスカバリーコホートにおけるHSD17B13のローカスズームプロット(HSD17B13周辺の領域における領域関連プロット)を示す。領域間での有意な組換えは観察されなかった。菱形は、rs72613567スプライスバリアントを示す。それぞれの丸印は、そのバリアントとrs72613567との間の連鎖不均衡(DiscovEHRコホートにおいて算出された $r^2$ )を示す丸印の色と共に単一ヌクレオチドのバリアントを示す。線は、HapMapにおける推定組換え率を示す。下パネルは、遺伝子座中の各遺伝子の相対位置および転写される鎖を示す。ALTまたはASTと、近隣遺伝子HSD17B11中のコードまたはスプライス領域バリアントとの有意な関連は存在しなかった(ALTおよびASTに関する、最も有意なP値は、それぞれ、 $1.4 \times 10^{-1}$ および $4.3 \times 10^{-2}$ である)。

【0072】

【図6】図6A~6Dは、HSD17B13スプライスバリアントのホモ接合体参照(T/T)、ヘテロ接合体(T/TA)、およびホモ接合体代替物(TA/TA)保因者における4つのさらなる新規HSD17B13転写産物(E~H)のmRNA発現を示す。各転写産物は、対応する遺伝子モデルと共に例示される。遺伝子モデルにおけるコード領域は、縞模様の囲みで示され、非翻訳領域は、黒色の囲みで示される。図6Aおよび6Dは、転写産物EおよびHがエクソン3と4との間にさらなるエクソンを含有することを示す。図6Bは、転写産物Fがエクソン6からイントロン6までのリードスルーを含むことを示す。図6Cは、転写産物Gにおいて、エクソン2がスキップされていることを示す。転写産物GおよびHにおける星印(それぞれ、図6Cおよび6D)は、タンパク質の早期トランケーションをもたらす、エクソン6の3'末端でのrs72613567からのGの挿入を示す。転写産物は、ボックスプロットに示されるように、HSD17B13遺伝子型に従って示差的に発現される。mRNA発現は、FPKM単位(マッピングされたリード100万あたりの転写産物キロベースあたりの断片数)で示される。

【0073】

【図7A】図7A~7Bは、HSD17B13タンパク質アイソフォームA~Hのタンパク質配列アラインメントを示す。

【図7B】図7A~7Bは、HSD17B13タンパク質アイソフォームA~Hのタンパク質配列アラインメントを示す。

【0074】

10

20

30

40

50

【図8】図8は、HSD17B13 rs72613567 : TAが、アルコール性および非アルコール性肝疾患表現型のリスクの低下と関連することを示す。具体的には、図8は、Dallas Liver Studyにおいて、HSD17B13 rs72613567が、対立遺伝子用量依存的様式で、任意の肝疾患のより低いオッズと関連していたことを示す。同様の対立遺伝子用量依存的効果は、肝疾患サブタイプにわたって観察された。オッズ比を、年齢、年齢<sup>2</sup>、性別、BMI、および自己報告された民族性について調整して、ロジスティック回帰を使用して算出した。

【0075】

【図9】図9は、HSD17B13 rs72613567が、単純脂肪肝から脂肪性肝炎および線維症への進行リスクの低下と関連することを示す。具体的には、それは、GHS肥満外科手術コホートに由来する肝臓生検を有する2,391人の個体におけるHSD17B13 rs72613567遺伝子型による組織病理学的に特徴付けられた肝疾患の有病率を示す。正常な肝臓の有病率は、遺伝子型によって異ならないと考えられた（割合における傾向に関するカイニ乗検定によるP = 0.5）が、それぞれのTA対立遺伝子に関して、NAS/Hの有病率は減少し（P = 1.6 × 10<sup>-4</sup>）、単純脂肪肝の有病率は増大した（P = 1.1 × 10<sup>-3</sup>）。

10

【0076】

【図10ABC】図10A～10Eは、新規HSD17B13転写産物の発現、細胞内局在化、および酵素活性を示す。図10Aは、HSD17B13転写産物AおよびDを過剰発現するHePG2細胞に由来するウェスタンプロットを示し、HSD17B13転写産物Dが、HSD17B13転写産物Aと比較して低い分子量を有するトランケートされたタンパク質に翻訳されたことを示す。図10Bは、新鮮な凍結ヒト肝臓およびHEK293細胞試料に由来するHSD17B13ウェスタンプロットを示す。ヒト肝臓試料は、HSD17B13 rs72613567スプライスバリエントのホモ接合体参照（T/T）、ヘテロ接合体（T/TA）、およびホモ接合体代替物（TA/TA）保因者に由来するものである。細胞試料は、非タグ付きHSD17B13転写産物AおよびDを過剰発現するHEK293細胞に由来するものである。HSD17B13転写産物Dは、HSD17B13 IsoAよりも低い分子量を有するトランケートされたタンパク質IsoDに翻訳された。図10Cは、HSD17B13 IsoDタンパク質レベルが、ヒト肝臓（左）と細胞（右）試料の両方に由来するIsoAタンパク質レベルよりも低かったことを示す。アクチンに対して正規化されたタンパク質レベルを、棒カラムで示す；\*\*P < 0.001、\*P < 0.05。図10Dは、17-ベータエストラジオール（エストラジオール）、ロイコトリエンB4（LTB4）、および13-ヒドロキシオクタデカジエン酸（13(S)-HODE）に対するHSD17B13アイソフォームAおよびDの酵素活性を示す。HSD17B13アイソフォームDは、アイソフォームAに関する対応する値の10%未満の酵素活性を示す。図10Eは、HSD17B13アイソフォームDが、HEK293細胞中で過剰発現された場合、培養培地中で測定された場合にエストラジオール（基質）のエストロン（生成物）への変換をあまり示さなかつたが、過剰発現されたHSD17B13アイソフォームAがロバストな変換を示したことを示す。

20

30

【図10DE】図10A～10Eは、新規HSD17B13転写産物の発現、細胞内局在化、および酵素活性を示す。図10Aは、HSD17B13転写産物AおよびDを過剰発現するHePG2細胞に由来するウェスタンプロットを示し、HSD17B13転写産物Dが、HSD17B13転写産物Aと比較して低い分子量を有するトランケートされたタンパク質に翻訳されたことを示す。図10Bは、新鮮な凍結ヒト肝臓およびHEK293細胞試料に由来するHSD17B13ウェスタンプロットを示す。ヒト肝臓試料は、HSD17B13 rs72613567スプライスバリエントのホモ接合体参照（T/T）、ヘテロ接合体（T/TA）、およびホモ接合体代替物（TA/TA）保因者に由来するものである。細胞試料は、非タグ付きHSD17B13転写産物AおよびDを過剰発現するHEK293細胞に由来するものである。HSD17B13転写産物Dは、HSD17B13 IsoAよりも低い分子量を有するトランケートされたタンパク質IsoDに翻

40

50

訳された。図10Cは、HSD17B13 IsoDタンパク質レベルが、ヒト肝臓（左）と細胞（右）試料の両方に由来するIsoAタンパク質レベルよりも低かったことを示す。アクチンに対して正規化されたタンパク質レベルを、棒カラムで示す；\*\*P<0.001、\*P<0.05。図10Dは、17-ペータエストラジオール（エストラジオール）、ロイコトリエンB4（LTB4）、および13-ヒドロキシオクタデカジエン酸（13(S)-HODE）に対するHSD17B13アイソフォームAおよびDの酵素活性を示す。HSD17B13アイソフォームDは、アイソフォームAに関する対応する値の10%未満の酵素活性を示す。図10Eは、HSD17B13アイソフォームDが、HEK293細胞中で過剰発現された場合、培養培地中で測定された場合にエストラジオール（基質）のエストロン（生成物）への変換をあまり示さなかったが、過剰発現されたHSD17B13アイソフォームAがロバストな変換を示したことを示す。

#### 【0077】

【図11】図11A～11Cは、HSD17B13アイソフォームDタンパク質がより低い分子量を有し、HEK293細胞中で過剰発現された場合、不安定であることを示す。図11Aは、HSD17B13 IsoD RNAレベルがIsoA RNAレベルよりも高かったことを示す、HSD17B13転写産物A（IsoA）およびD（IsoD）を過剰発現するHEK293細胞に由来するHSD17B13のRT-PCRを示す。図11Bは、HSD17B13転写産物Dが、HSD17B13転写産物Aと比較して低い分子量を有するトランケートされたタンパク質に翻訳されたことを示す、同じ細胞株に由来するウェスタンプロットを示す。図11Cは、HSD17B13 IsoDタンパク質レベルがIsoAタンパク質レベルよりも低かったが、RNAレベルは高かったことを示す。HSD17B13タンパク質レベルを、アクチンに対して正規化した；\*P<0.05。

#### 【0078】

【図12】図12は、HepG2安定細胞株に由来する単離された脂肪滴（LD）に対するHSD17B13アイソフォームAおよびアイソフォームDの類似する局在化パターンを示す。ADRPおよびTIP47を、脂肪滴マーカーとして使用した。LAMP1、カルレティキュリン、およびCOX IVを、それぞれ、リソソーム、小胞体、およびミトコンドリア区画のためのマーカーとして使用した。GAPDHを細胞質マーカーとして含有させ、アクチンを細胞骨格マーカーとして使用した。この実験を、HepG2細胞中で2回反復し、上記は両方の泳動の代表である。PNs=後核画分；TM=総膜。

#### 【0079】

【図13】図13A～13Dは、オレイン酸が、HSD17B13転写産物AまたはDを過剰発現するHepG2細胞中のトリグリセリド含量を増加させたことを示す。図13Aは、高濃度のオレイン酸による処理が、対照（GFPを過剰発現する細胞）ならびにHSD17B13転写産物AおよびD細胞株において同程度までトリグリセリド（TG）含量を増加させたことを示す。図13Bは、HSD17B13転写産物AおよびDのRNAレベルが細胞株において類似していたことを示す。RNAレベルを、マッピングされたリード100万あたりの転写産物キロベースあたりのリード数（RPKM）で示す。図13Cは、HSD17B13転写産物AおよびDを過剰発現するHepG2細胞に由来するウェスタンプロットを示す。HSD17B13転写産物Dは、HSD17B13転写産物Aと比較して低い分子量を有するトランケートされたタンパク質に翻訳された。図13Dは、HSD17B13 IsoDタンパク質レベルが、IsoAタンパク質レベルよりも低かったことを示す。タンパク質レベルを、アクチンに対して正規化した；\*\*P<0.01。

#### 【0080】

【図14】図14は、精製された組換えHSD17B13タンパク質を使用したエストラジオールに関するK<sub>m</sub>およびV<sub>max</sub>値を示す。K<sub>m</sub>およびV<sub>max</sub>の決定のために、0.2 μM～200 μMの17-エストラジールの用量範囲および5分～180分の時点と共に、500 μMのNAD<sup>+</sup>および228 nMのHSD17B13を用いてアッセイを実行した。次いで、Michaelis-MentenモデルおよびPrismソフトウェア（GraphPad Software, USA）を使用して、V<sub>max</sub>およびK<sub>m</sub>

10

20

30

40

50

を決定した。

【0081】

【図15】図15は、ハイブリッド野生型マウス（75%のC57BL/6NTac、25%の129S6/SvEvTac）から単離された初代肝細胞における次世代配列決定（NGS）によって決定されたマウスHsd17b13遺伝子座でのゲノム編集率（%）（溶解した細胞のプールに由来するPCR反応中の配列リードの総数にわたる、Cas9誘導性DNA切断のいずれかの側での20塩基対のウィンドウ内で観察された挿入または欠失の総数）を示す。試験した試料は、Cas9と、マウスHsd17b13遺伝子座を標的化するように設計されたガイドRNAとを含有するリボ核タンパク質複合体で処理された肝細胞を含んでいた。

10

【0082】

【図16】図16は、マウスHsd17b13をCas9-readyマウスに標的化するように設計されたsgRNA発現カセットを含有するAAV8の注射の3週後にマウス肝臓から単離された試料中の次世代配列決定（NGS）によって決定されたマウスHsd17b13遺伝子座でのゲノム編集率（%）（溶解した細胞のプールに由来するPCR反応中の配列リードの総数にわたって観察された挿入または欠失の総数）を示す。いかなるCas9も発現しない野生型マウスに、全てのsgRNA発現カセットを含有するAAV8を注射したものを陰性対照として使用した。

【0083】

【図17】図17Aおよび17Bは、マウスHsd17b13を標的化するように設計されたガイドRNA発現カセットを担持するAAV8で処置されたCas9-readyマウスに由来する肝臓試料中のRT-qPCRによって決定された、それぞれ、マウスHsd17b13および非標的HSDファミリーメンバーに関する相対mRNA発現を示す。いかなるCas9も発現しない野生型マウスに、全てのガイドRNAのためのガイドRNA発現カセットを担持するAAV8を注射したものを陰性対照として使用した。

20

【発明を実施するための形態】

【0084】

定義

「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」という用語は、本明細書では互換的に使用され、コードアミノ酸および非コードアミノ酸ならびに化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸を含めた、任意の長さのポリマー形態のアミノ酸を含む。この用語は、修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドなどの、修飾されたポリマーも含む。

30

【0085】

タンパク質は、「N末端」および「C末端」を有すると言える。「N末端」という用語は、遊離のアミン基（-NH<sub>2</sub>）を有するアミノ酸を末端とする、タンパク質またはポリペプチドの出発点に関する。「C末端」という用語は、遊離のカルボキシル基（-COOH）を末端とする、アミノ酸の鎖（タンパク質またはポリペプチド）の終了点に関する。

【0086】

「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書では互換的に使用され、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはその類似体もしくは修飾バージョンを含めた、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドを含む。これらの用語は、プリン塩基、ピリミジン塩基、または他の天然、化学的に修飾された、生化学的に修飾された、非天然、もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含む、一本鎖、二本鎖、および多重鎖DNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、ならびにポリマーを含む。

40

【0087】

核酸は、モノヌクレオチドが、1つのモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸がその近くの3'酸素にリン酸ジエステル連結によって一方向に付着するように反応してオリゴヌクレオチドが生じるので、「5'末端」および「3'末端」を有すると言える。オリゴヌクレ

50

オチドの末端は、その 5' リン酸がモノヌクレオチドペントース環の 3' 酸素と連結していなければ、「5' 末端」と称される。オリゴヌクレオチドの末端は、その 3' 酸素が別のモノヌクレオチドペントース環の 5' リン酸と連結していなければ、「3' 末端」と称される。核酸配列も、より大きなオリゴヌクレオチドの内部にあったとしても、5' および 3' 末端を有すると言われ得る。直鎖状または環状DNA分子のいずれでも、別個のエレメントは、「下流」または 3' エレメントの「上流」または 5' 側にあると称される。

#### 【0088】

「野生型」という用語は、正常な状態または状況（突然変異体、疾患にかかっている、変更された状態または状況などとは対照的に）において見出される構造および／または活性を有する実体を包含する。野生型遺伝子およびポリペプチドは、多くの場合、多数の異なる形態（例えば、対立遺伝子）で存在する。

10

#### 【0089】

タンパク質および核酸に関して「単離された」という用語は、タンパク質およびポリヌクレオチドの実質的に純粋な調製物に至るまで、およびそれを含めた、in situにおいて通常存在し得る他の細菌性、ウイルス性、または細胞性構成成分に関して比較的精製されたタンパク質および核酸を含む。「単離された」という用語は、天然に存在する対応物を有さない、化学的に合成された、したがって、他のタンパク質もしくは核酸が実質的に混入していない、または、天然では付随する他の大多数の細胞性構成成分（例えば、他の細胞タンパク質、ポリヌクレオチド、もしくは細胞性構成成分）から分離もしくは精製されたタンパク質および核酸も含む。

20

#### 【0090】

「外因性」分子または配列は、通常は細胞内にその形態では存在しない分子または配列を含む。通常存在するとは、細胞の特定の発生段階および環境条件に関して存在することを含む。外因性分子または配列は、例えば、細胞内の対応する内因性配列の突然変異バージョンを含み得る、または細胞内の内因性配列に対応するが、形態が異なる（すなわち、染色体内にない）配列を含み得る。対照的に、内因性分子または配列は、特定の環境条件下で特定の発生段階にある特定の細胞内にその形態で通常存在する分子または配列を含む。

#### 【0091】

「異種」という用語は、核酸またはタンパク質に関して使用される場合、その核酸またはタンパク質が、天然には一緒に存在しない少なくとも 2 つの部分を含むことを示す。同様に、「異種」という用語は、タンパク質をコードする核酸と作動可能に連結したプロモーターに関して使用される場合、そのプロモーターおよびタンパク質をコードする核酸が、天然には一緒に存在しない（すなわち、天然には作動可能に連結していない）ことを示す。例えば、「異種」という用語は、核酸の一部分またはタンパク質の一部分に関連して使用される場合、その核酸またはタンパク質が、天然では同じ互いとの関係（例えば、接合している）では見出されない 2 つまたはそれよりも多くの部分配列を含むことを示す。一例として、核酸ベクターの「異種」領域は、天然では他の分子と関連しては見出されない、別の核酸分子内にあるかまたはそれに付着した核酸のセグメントである。例えば、核酸ベクターの異種領域は、天然ではコード配列と関連しては見出されない配列に挟まれたコード配列を含み得る。同様に、タンパク質の「異種」領域は、天然では他のペプチド分子と関連しては見出されない、別のペプチド分子内にあるかまたはそれに付着したアミノ酸のセグメント（例えば、融合タンパク質、またはタグを有するタンパク質）である。同様に、核酸またはタンパク質は、異種標識または異種分泌もしくは局在化配列を含み得る。

30

#### 【0092】

「標識」という用語は、標的化合物に付着させた場合に直接的または間接的に検出可能な（例えば、そのスペクトル性質、コンフォメーション、または活性に起因して）化学的部分またはタンパク質を指す。標識は、直接検出可能なものの（フルオロフォア）であっても間接的に検出可能なものの（ハプテン、酵素、またはフルオロフォアクエンチャー）であってもよい。そのような標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的手段によって検出可能であり得る。そのような標識としては、例えば、放射線計測デバ

40

50

イスを用いて測定することができる放射標識；分光光度計を用いて視覚的に観察または測定することができる顔料、色素または他の色素原；スピニラベル分析機器を用いて測定することができるスピニラベル；および、出力シグナルを適切な分子付加物の励起によって生じさせ、色素によって吸収される光を用いた励起によって可視化することができる、または標準の蛍光光度計もしくはイメージングシステムを用いて測定することができる蛍光標識（フルオロフォア）が挙げられる。標識はまた、例えば、出力シグナルをシグナル化合物の化学修飾によって生じさせる化学発光物質；金属含有物質；または、無色の基質からの呈色生成物の形成などの、酵素に依存したシグナルの二次的生成が生じる、酵素であってもよい。「標識」という用語は、コンジュゲート分子に、その後基質と一緒に添加した際に、検出可能なシグナルの生成にコンジュゲート分子が使用されるように選択的に結合させることができる「タグ」またはハプテンも指し得る。例えば、ビオチンをタグとして使用し、次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）のアビジンまたはストレプトアビジンコンジュゲートを使用してタグと結合させ、次いで、熱量測定基質（例えば、テトラメチルベンジジン（T M B））または蛍光発生基質を使用してH R Pの存在を検出することができる。「標識」という用語は、例えば、精製を容易にするために使用することができるタグも指し得る。そのようなタグの非限定的な例としては、m y c、H A、F L A Gまたは $3 \times$  F L A G、 $6 \times$  H i sまたはポリヒスチジン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（G S T）、マルトース結合タンパク質、エピトープタグ、または免疫グロブリンのF c部分が挙げられる。多数の標識が公知であり、それらとして、例えば、粒子、フルオロフォア、ハプテン、酵素およびそれらの熱量測定基質、蛍光発生基質および化学発光基質ならびに他の標識が挙げられる。

#### 【0093】

「コドン最適化」は、アミノ酸を指定する3塩基対のコドンの組合せの多重性によって示される通り、コドンの縮重を活用し、一般に、特定の宿主細胞における発現の増強のために、ネイティブなアミノ酸配列を維持しながらネイティブな配列の少なくとも1つのコドンを宿主細胞の遺伝子においてより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンで置き換えることによって核酸配列を改変するプロセスを含む。例えば、Cas 9タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、天然に存在する核酸配列と比較して、細菌細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、または任意の他の宿主細胞を含めた所与の原核細胞または真核細胞において使用の頻度が高いコドンに置換されるように改変することができる。コドン使用表は、例えば「Codon Usage Database」において容易に利用可能である。これらの表は、いくつかのやり方で適合させることができる。あらゆる目的に關してその全体が参考により本明細書に組み込まれるNakamuraら（2000年）Nucleic Acids Research 28巻：292頁を参照されたい。特定の宿主において発現させるための特定の配列のコドン最適化のためのコンピュータアルゴリズムも利用可能である（例えば、Gene Forgeを参照されたい）。

#### 【0094】

「遺伝子座」という用語は、遺伝子（もしくは意味のある配列）の特定の場所、D N A配列、ポリペプチドをコードする配列、または生物体のゲノムの染色体上の位置を指す。例えば、「H S D 1 7 B 1 3 遺伝子座」は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の特定の場所、H S D 1 7 B 1 3 D N A配列、H S D 1 7 B 1 3をコードする配列、またはそのような配列が存在すると同定された生物体のゲノムの染色体上のH S D 1 7 B 1 3の位置を指し得る。「H S D 1 7 B 1 3 遺伝子座」は、例えば、エンハンサー、プロモーター、5'および/もしくは3' U T R、またはこれらの組合せを含めた、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の制御エレメントを含み得る。

#### 【0095】

「遺伝子」という用語は、産物（例えば、R N A産物および/またはポリペプチド産物）をコードする、染色体内のD N A配列を指し、1つまたは複数の非コードイントロンに遮られたコード領域ならびに5'および3'末端の両方でコード領域に隣接して位置する配列

10

20

30

40

50

を含み、したがって、遺伝子は、全長mRNA(5'および3'非翻訳配列を含む)に対応する。「遺伝子」という用語は、制御配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、および転写因子結合性部位)、ポリアデニル化シグナル、配列内リボソーム進入部位、サイレンサー、絶縁配列(*insulating sequence*)、およびマトリックス付着領域を含めた他の非コード配列も含む。これらの配列は、遺伝子のコード領域の近く(例えば、10kb以内)または遠位部位にあり得、遺伝子の転写および翻訳レベルまたは率に影響を及ぼす。「遺伝子」という用語は、「ミニ遺伝子」も包含する。

#### 【0096】

「ミニ遺伝子」という用語は、遺伝子の1つまたは複数の非必須セグメントが対応する天然に存在する生殖細胞系列遺伝子に対して欠失しているが、少なくとも1つのイントロンは残っている遺伝子を指す。欠失したセグメントは、イントロン配列であり得る。例えば、欠失したセグメントは、少なくとも約500塩基対~数キロベースのイントロン配列であり得る。一般には、必須の制御エレメントを包含しないイントロン配列が欠失している。ミニ遺伝子を含む遺伝子セグメントは、生殖細胞系列遺伝子に存在するのと同じ直線的順序で配置されるが、必ずしもそうではない。一部の所望の制御エレメント(例えば、エンハンサー、サイレンサー)は、比較的位置非感受性であり得、したがって、制御エレメントは、ミニ遺伝子において対応する生殖細胞系列遺伝子とは違うように配置されていたとしても正確に機能する。例えば、エンハンサーは、プロモーターからの異なる距離、異なる方向、および/または異なる直線的順序で位置し得る。例えば、生殖細胞系列立体配置においてプロモーターの3'側に位置するエンハンサーが、ミニ遺伝子ではプロモーターの5'側に位置し得る。同様に、一部の遺伝子は、RNAレベルで選択的にスプライシングされるエクソンを有し得る。したがって、ミニ遺伝子は、対応する生殖細胞系列遺伝子よりも少ないエクソンおよび/または直線的順序が異なるエクソンを有し得、それでもなお、機能的な遺伝子産物をコードする。遺伝子産物をコードするcDNAを使用してミニ遺伝子を構築することもできる(例えば、ハイブリッドcDNA-ゲノム融合物)。

#### 【0097】

「対立遺伝子」という用語は、遺伝子のバリエント形態を指す。一部の遺伝子は、染色体の同じ位置または遺伝子座に位置する種々の異なる形態を有する。二倍体の生物体は、各遺伝子座に2つの対立遺伝子を有する。対立遺伝子の各対は、特定の遺伝子座の遺伝子型を表す。遺伝子型は、特定の遺伝子座に2つの同一の対立遺伝子が存在する場合にはホモ接合体と記載され、2つの対立遺伝子が異なる場合にはヘテロ接合体と記載される。

#### 【0098】

「バリエント」または「遺伝子バリエント」という用語は、集団内に最も広く行きわたっている配列とは異なる(例えば、1ヌクレオチドが異なる)ヌクレオチド配列を指す。例えば、ヌクレオチド配列の一部の変化または置換により、コドンが変更され、したがって、異なるアミノ酸がコードされ、その結果、遺伝子バリエントポリペプチドが生じる。「バリエント」という用語は、集団内に最も広く行きわたっている配列と、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列が変化しない位置で配列が異なる遺伝子も指し得る(すなわち、保存的変化)。遺伝子バリエントは、リスクに関連する場合もあり、保護に関連する場合もあり、中性の場合もある。

#### 【0099】

「プロモーター」は、DNAの制御領域であり、通常、特定のポリヌクレオチド配列に対して妥当な転写開始部位でRNA合成を開始するようにRNAポリメラーゼIIを方向付けることができるTATAボックスを含む。プロモーターは、転写開始率に影響を及ぼす他の領域をさらに含み得る。本明細書に開示されるプロモーター配列は、作動可能に連結したポリヌクレオチドの転写をモジュレートする。プロモーターは、本明細書に開示される細胞型(例えば、真核細胞、非ヒト哺乳動物細胞、ヒト細胞、齧歯類細胞、多能性細胞、分化細胞、またはこれらの組合せ)の1つまたは複数において活性であってよい。プロモーターは、例えば、構成的に活性なプロモーター、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、時間的に制限されたプロモーター(例えば、発生制御型プロモーター)、また

10

20

30

40

50

は空間的に制限されたプロモーター（例えば、細胞特異的または組織特異的プロモーター）であつてよい。プロモーターの例は、例えば、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれるWO 2013/176772に見出すことができる。

#### 【0100】

誘導性プロモーターの例としては、例えば、化学的制御型プロモーターおよび物理的制御型プロモーターが挙げられる。化学的制御型プロモーターとしては、例えば、アルコール制御型プロモーター（例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ（alcA）遺伝子プロモーター）、テトラサイクリン制御型プロモーター（例えば、テトラサイクリン応答性プロモーター、テトラサイクリンオペレーター配列（tetO）、tet-O<sub>n</sub>プロモーター、もしくはtet-O<sub>ff</sub>プロモーター）、ステロイド制御型プロモーター（例えば、ラットグルココルチコイド受容体、エストロゲン受容体のプロモーター、もしくはエクジソン受容体のプロモーター）、または金属制御型プロモーター（例えば、金属タンパク質プロモーター）が挙げられる。物理的制御型プロモーターとしては、例えば、温度制御型プロモーター（例えば、熱ショックプロモーター）および光制御型プロモーター（例えば、光誘導性プロモーターまたは光抑制性プロモーター）が挙げられる。

10

#### 【0101】

組織特異的プロモーターは、例えば、神経特異的プロモーター、グリア特異的プロモーター、筋肉細胞特異的プロモーター、心臓細胞特異的プロモーター、腎臓細胞特異的プロモーター、骨細胞特異的プロモーター、内皮細胞特異的プロモーター、または免疫細胞特異的プロモーター（例えば、B細胞プロモーターまたはT細胞プロモーター）であつてよい。

20

#### 【0102】

発生制御型プロモーターとしては、例えば、発生の胚形成期の間にのみ、または成体細胞においてのみ活性であるプロモーターが挙げられる。

#### 【0103】

「作動可能な連結」または「作動可能に連結した」とは、2つまたはそれよりも多くの構成成分（例えば、プロモーターおよび別の配列エレメント）が、どちらの構成成分も正常に機能し、構成成分の少なくとも1つが他の構成成分の少なくとも1つに対して発揮される機能を媒介し得る可能性が許容されるように近位にあることを含む。例えば、プロモーターがコード配列の転写のレベルを1つまたは複数の転写制御因子の存在または非存在に応答して調節する場合、プロモーターはコード配列に作動可能に連結している可能性がある。作動可能な連結は、互いに連続しているまたはトランスに作用する配列を含み得る（例えば、制御配列は、コード配列の転写を調節するための距離で作用し得る）。

30

#### 【0104】

「プライマー」という用語は、ポリヌクレオチドと相補的なプライマー伸長産物の合成が触媒される条件下に置かれると、相補鎖に沿ったポリヌクレオチド合成の開始点として作用することが可能なオリゴヌクレオチドを指す。そのような条件は、4つの異なるヌクレオチド三リン酸またはヌクレオシド類似体ならびにDNAポリメラーゼおよび/または逆転写酵素などの1つまたは複数の重合用作用剤が、妥当な緩衝剤（補助因子であるか、またはpH、イオン強度などに影響を及ぼす置換基を含む）中、適切な温度で存在することを含む。配列特異的なプライマーの伸長としては、例えば、PCRの方法、DNA配列決定、DNA伸長、DNA重合、RNA転写、または逆転写を挙げることができる。プライマーは、ポリメラーゼの代わりの作用剤の存在下で伸長産物の合成を刺激するのに十分長くなければならない。典型的なプライマーは、標的配列と実質的に相補的な少なくとも約5ヌクレオチドの長さの配列であるが、より長いプライマーが好ましい。一般には、プライマーは、約15～30ヌクレオチドの長さであるが、より長いプライマーを使用することもできる。プライマー配列は、鑄型または標的配列に対して正確に相補的である必要はないが、鑄型または標的配列とハイブリダイズするのに十分相補的でなければならない。

40

「プライマー対」という用語は、増幅されるDNA配列の5'末端とハイブリダイズする5'上流プライマー、および増幅される配列の3'末端の相補物とハイブリダイズする3'下流プライマーを含むプライマーのセットを意味する。プライマー対は、標的ポリヌクレオチ

50

ドを増幅させる（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）または他の従来の核酸増幅方法によって）ために使用することができる。「P C R」または「ポリメラーゼ連鎖反応」は、特定のD N Aセグメントを増幅させるために使用される技法である（それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,683,195号および同第4,800,159号を参照されたい）。

【0105】

「プローブ」という用語は、構造が異なる標的分子間を検出可能に区別することができる分子を指す。検出は、使用されるプローブの型および標的分子の型に応じて様々な異なるやり方で実現することができる。したがって、例えば、検出は、標的分子の活性レベルの識別に基づくものであってよいが、特異的結合の検出に基づくものであることが好ましい。そのような特異的結合の例としては、抗体結合および核酸プローブハイブリダイゼーションが挙げられる。したがって、プローブとして、例えば、酵素基質、抗体および抗体断片、ならびに核酸ハイブリダイゼーションプローブを挙げることができる。例えば、プローブは、放射性同位元素、リガンド、化学発光剤、酵素などの従来の検出可能な標識またはレポーター分子に付着させた単離されたポリヌクレオチドであってよい。そのようなプローブは、H S D 1 7 B 1 3 - r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントまたは特定のH S D 1 7 B 1 3 - m R N A 転写産物を含むポリヌクレオチドなどの標的ポリヌクレオチド鎖と相補的である。デオキシリボ核酸プローブは、H S D 1 7 B 1 3 - m R N A / c D N A 特異的プライマーもしくはH S D 1 7 B 1 3 - r s 7 2 6 1 3 5 6 7 特異的プライマー、i n v i t r o で合成されたオリゴヌクレオチドプローブ、または細菌人工染色体、フォスミド、もしくはコスミドライブライマーから得られたD N Aを使用してP C Rによって生成したものと含んでよい。プローブは、デオキシリボ核酸またはリボ核酸だけでなく、標的D N A配列の存在を特異的に検出することができるポリアミドおよび他のプローブ材料も含む。核酸プローブに関しては、検出試薬として、例えば、放射標識されたプローブ、酵素標識されたプローブ（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼ）、親和性標識されたプローブ（例えば、ビオチン、アビジン、およびストレプトアビジン）、および蛍光標識されたプローブ（例えば、6-F A M、V I C、T A M R A、M G B、フルオレセイン、ローダミン、およびテキサスレッド）を挙げることができる。本明細書に記載の核酸プローブは、周知の確立されたキット形式の1つに容易に組み入れることができる。

【0106】

「アンチセンスR N A」という用語は、細胞において転写されるメッセンジャーR N A鎖と相補的な一本鎖R N Aを指す。

【0107】

「低分子干渉R N A（s i R N A）」という用語は、R N A干渉（R N A i）経路を誘導する、一般には二本鎖のR N A分子を指す。これらの分子は、長さが変動し得（一般に、18~30塩基対）、アンチセンス鎖内のそれらの標的m R N Aに対して種々の程度の相補性を含有する。s i R N Aの全てではないが一部は、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の5'または3'末端に、対合していない突出した塩基を有する。「s i R N A」という用語は、2つの別々の鎖の2重鎖、ならびに2重鎖領域を含むヘアピン構造を形成し得る一本鎖を包含する。二本鎖構造は、例えば、20、25、30、35、40、45、または50ヌクレオチド未満の長さであり得る。例えば、二本鎖構造は、約21~23ヌクレオチドの長さ、約19~25ヌクレオチドの長さ、または約19~23ヌクレオチドの長さであり得る。

【0108】

「低分子ヘアピン型R N A（s h R N A）」という用語は、自己ハイブリダイズしてヘアピン構造になり、プロセシングの際にR N A干渉（R N A i）経路を誘導する可能一本鎖のR N A塩基を指す。これらの分子は、長さが変動し得る（一般に、約50~90ヌクレオチドの長さ、または一部の場合では、例えば、マイクロR N Aに適合させたs h R N Aに関しては250ヌクレオチドを超えるまでの長さである）。s h R N A分子は

10

20

30

40

50

細胞内でプロセシングされて s i R N A を形成し、今度はそれにより遺伝子発現がノックダウンされ得る。 s h R N A は、ベクターに組み入れることができる。「 s h R N A 」という用語は、それから低分子ヘアピン R N A 分子を転写することができる D N A 分子も指す。

【 0 1 0 9 】

核酸の「相補性」とは、核酸の一方の鎖内のヌクレオチド配列が、その核酸塩基群の配向に起因して、対向する核酸鎖上の別の配列と水素結合を形成することを意味する。 D N A 内の相補的な塩基は一般には A と T および C と G である。 R N A では、相補的な塩基は一般には C と G および U と A である。相補性は、完全なものまたは実質的 / 十分なものであり得る。 2 つの核酸間の完全な相補性とは、2 つの核酸が、2 重鎖内のあらゆる塩基が相補的な塩基とワトソン・クリック対形成によって結合した2重鎖を形成できることを意味する。「実質的な」または「十分な」相補性とは、一方の鎖内の配列が対向する鎖内の配列と徹底的におよび / または完全に相補的ではないが、ハイブリダイゼーション条件のセット（例えば、塩濃度および温度）の下で2つの鎖上の塩基間に十分な結合が生じて安定なハイブリッド複合体が形成されることを意味する。そのような条件は、ハイブリダイズした鎖の T m (融解温度) を予測するためのシーケンスおよび標準の数学的算出を使用することにより、または常套的な方法を使用することによって T m を経験的に決定することにより、予測することができる。 T m は、2 つの核酸鎖の間で形成されるハイブリダイゼーション複合体の集団が 50 % 变性する（すなわち、二本鎖核酸分子の集団が半分解離して一本鎖になる）温度を含む。 T m を下回る温度ではハイブリダイゼーション複合体の形成が有利であるが、 T m を上回る温度ではハイブリダイゼーション複合体の鎖の融解または分離が有利である。 T m は、水性 1 M N a C l 溶液中の G + C 含有量が分かっている核酸に関しては、例えば、 T m = 81.5 + 0.41 ( % G + C ) を使用することによって推定することができるが、他の公知の T m コンピュータ計算では、核酸の構造特性を考慮に入れる。

10

20

30

【 0 1 1 0 】

「ハイブリダイゼーション条件」は、1 つの核酸鎖が第 2 の核酸鎖と相補鎖相互作用および水素結合によって結合してハイブリダイゼーション複合体が生じる累積的環境を含む。そのような条件は、核酸を含有する水性または有機溶液の化学成分およびそれらの濃度（例えば、塩、キレート剤、ホルムアミド）、ならびに混合物の温度を含む。インキュベート時間の長さまたは反応チャンバーの寸法などの他の因子が環境に寄与し得る。例えば、あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる Sambrook ら、 Molecular Cloning、A Laboratory Manual、第 2 版、1.90 ~ 1.91 頁、9.47 ~ 9.51 頁、11.47 ~ 11.57 頁 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 年) を参照されたい。

40

【 0 1 1 1 】

ハイブリダイゼーションには、2 つの核酸が相補配列を含有することが必要であるが、塩基間にミスマッチがある可能性がある。2 つの核酸間のハイブリダイゼーションのための妥当な条件は、周知の変数である核酸の長さおよび相補の度合いに依存する。2 つのヌクレオチド配列間の相補の度合いが大きいほど、それらの配列を有する核酸のハイブリッドの融解温度 ( T m ) の値が大きい。短い相補性のひと続き（例えば、35 ヌクレオチドもしくはそれ未満、30 ヌクレオチドもしくはそれ未満、25 ヌクレオチドもしくはそれ未満、22 ヌクレオチドもしくはそれ未満、20 ヌクレオチドもしくはそれ未満、または 18 ヌクレオチドもしくはそれ未満にわたる相補性）を有する核酸間のハイブリダイゼーションに関しては、ミスマッチの位置が重要になる（Sambrook ら、上記、11.7 ~ 11.8 頁を参照されたい）。一般には、ハイブリダイズ可能な核酸の長さは、少なくとも約 10 ヌクレオチドである。ハイブリダイズ可能な核酸の例示的な最小長としては、少なくとも約 15 ヌクレオチド、少なくとも約 20 ヌクレオチド、少なくとも約 22 ヌクレオチド、少なくとも約 25 ヌクレオチド、および少なくとも約 30 ヌクレオチドが挙げられる。さらに、相補領域の長さおよび相補の度合いなどの因子に応じて、必要に応じて温度お

50

および洗浄溶液の塩濃度を調整することができる。

【0112】

ポリヌクレオチドの配列は、特異的にハイブリダイズ可能なその標的核酸のポリヌクレオチド配列と100%相補的である必要はない。さらに、ポリヌクレオチドは、介在するか、または隣接するセグメントがハイブリダイゼーション事象に関与しないように1つまたは複数のセグメントを超えてハイブリダイズし得る（例えば、ループ構造またはヘアピン構造）。ポリヌクレオチド（例えば、gRNA）は、標的とされる標的核酸配列内の標的領域に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、または100%の配列相補性を含み得る。例えば、20ヌクレオチドのうち18ヌクレオチドが標的領域と相補的であり、したがって、それと特異的にハイブリダイズするgRNAは、90%の相補性になる。この例では、残りの非相補性ヌクレオチドは、密集していても相補的なヌクレオチドが散在していてもよく、互いとまたは相補的なヌクレオチドと連続している必要はない。

10

【0113】

核酸内の核酸配列の特定のひと続き間のパーセント相補性は、BLASTプログラム（基本的な局所的アラインメント検索ツール）およびPower BLASTプログラム（Altschulら（1990年）J. Mol. Biol.、215巻：403～410頁；ZhangおよびMadden（1997年）Genome Res.、7巻：649～656頁）を使用して、または、SmithおよびWaterman（Adv. Appl. Math.、1981年、2巻、482～489頁）のアルゴリズムを使用する、デフォルト設定を使用したGapプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package、Version 8 for Unix（登録商標）、Genetics Computer Group、University Research Park、Madison Wis.）を使用することにより、常套的に決定することができる。

20

【0114】

本明細書において提示される方法および組成物では、種々の異なる構成成分を使用する。説明全体を通して、一部の構成成分は、活性なバリアントおよび断片を有し得る。そのような構成成分としては、例えば、Cas9タンパク質、CRISPR RNA、tracrRNA、およびガイドRNAが挙げられる。これらの構成成分のそれぞれについての生物活性は本明細書の他の箇所に記載されている。

30

【0115】

「配列同一性」または「同一性」は、2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関しては、2つの配列内の、指定の比較ウインドウにわたって最大の対応でアラインメントした場合に同じである残基に言及する。タンパク質に関して配列同一性のパーセンテージが使用される場合、同一でない残基の位置は、多くの場合、保存的アミノ酸置換によって異なっており、その場合、アミノ酸残基は、類似の化学的性質（例えば、電荷または疎水性）を有する他のアミノ酸残基で置換されるため、分子の機能的性質は変化しない。配列が保存的置換によって異なる場合、パーセント配列同一性を上向きに調整して置換の保存的性質を補正することができる。そのような保存的置換によって異なる配列は、「配列類似性」または「類似性」を有すると言える。この調整を行う方法は周知である。一般には、これは、保存的置換を完全なミスマッチではなく部分的なミスマッチとしてスコアリングし、それにより、パーセンテージ配列同一性を増大させることを伴う。したがって、例えば、同一のアミノ酸にはスコア1を付し、非保存的置換にはスコアゼロを付す場合、保存的置換には、ゼロと1との間のスコアを付す。保存的置換のスコアリングは、例えば、プログラムPC/GENE（IntelliGenetics、Mountain View、California）で実行される通り算出される。

40

【0116】

「配列同一性のパーセンテージ」は、2つの最適にアラインメントされた配列（完全にマッチする残基の数が最大）を比較ウインドウにわたって比較することによって決定される値を含み、ここで、比較ウインドウ内のポリヌクレオチド配列の一部分は、2つの配列の

50

最適なアラインメントのために、参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでよい。パーセンテージは、両方の配列内に同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が存在する位置の数を決定してマッチする位置の数を得、マッチする位置の数を比較のウインドウ内の位置の総数で割り、結果に 100 を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって算出される。別段の指定がない限り（例えば、短い方の配列は連結した異種配列を含む）、比較ウインドウは、比較される 2 つの配列の短い方の全長である。

#### 【 0 1 1 7 】

別段の指定のない限り、配列同一性 / 類似性値は、GAP バージョン 10 を以下のパラメーターを使用して得られる値を含む：ギャップ重みづけ 50 および長さ重みづけ 3、ならびに n w s g a p d n a . c m p スコアリング行列を使用したヌクレオチド配列についての % 同一性および % 類似性；ギャップ重みづけ 8 および長さ重みづけ 2、ならびに BLOSUM62 スコアリング行列を使用したアミノ酸配列についての % 同一性および % 類似性；またはその任意の等価のプログラム。「等価のプログラム」は、問題の任意の 2 つの配列について、GAP バージョン 10 によって生じた対応するアラインメントと比較して同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基マッチおよび同一のパーセント配列同一性を有するアラインメントを生じさせる任意の配列比較プログラムを含む。

10

#### 【 0 1 1 8 】

「保存的アミノ酸置換」という用語は、配列内に通常存在するアミノ酸の、サイズ、電荷、または極性が同様の異なるアミノ酸による置換を指す。保存的置換の例としては、イソロイシン、バリン、またはロイシンなどの非極性（疎水性）残基による別の非極性残基の置換が挙げられる。同様に、保存的置換の例としては、1 つの極性（親水性）残基による別の極性（親水性）残基の置換、例えば、アルギニンとリシンとの間の置換、グルタミンとアスパラギンとの間の置換、またはグリシンとセリンとの間の置換が挙げられる。さらに、リシン、アルギニン、もしくはヒスチジンなどの塩基性残基による別の塩基性残基の置換、またはアスパラギン酸もしくはグルタミン酸などの 1 つの酸性残基による別の酸性残基の置換が保存的置換のさらなる例である。非保存的置換の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、もしくはメチオニンなどの非極性（疎水性）アミノ酸残基によるシステイン、グルタミン、グルタミン酸もしくはリシンなどの極性（親水性）残基の置換および / または極性残基による非極性残基の置換が挙げられる。典型的なアミノ酸カテゴリー化を以下に要約する。

20

30

40

50

【表 A】

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

## 【0119】

プライマーまたはガイドRNAなどの主題の核酸は、参照核酸内の指定のヌクレオチド位から約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内の近接している位置とハイブリダイズするもしくはそれを標的とするか、またはそれを含む。

## 【0120】

「生体試料」という用語は、核酸またはタンパク質が回収可能である、対象内または対象から入手可能な生物材料の試料を指す。生体試料という用語は、細胞またはそれらの後代などの、試料を処理することによって得られる任意の材料も包含し得る。生体試料の処理は、濾過、蒸留、抽出、濃縮、固定、干渉する構成成分の不活性などの1つまたは複数を伴い得る。一部の実施形態では、生体試料は、ゲノムDNA、cDNA、またはmRNAなどの核酸を含む。一部の実施形態では、生体試料は、タンパク質を含む。対象は、例えば、ヒト、非ヒト哺乳動物、齧歯類、マウス、またはラットを含めた任意の生物体であつてよい。生体試料は、対象由来の任意の細胞、組織、または生体液に由来してよい。試料は、任意の臨床的に関連する組織、例えば、骨髄試料、腫瘍生検材料、穿刺吸引材料、または、血液、血漿、血清、リンパ液、腹水、囊胞液、もしくは尿などの体液試料を含み得る。一部の場合では、試料は、頬スワブを含む。本明細書に開示される方法において使用される試料は、アッセイ形式、検出方法の性質、および試料として使用される組織、細胞、または抽出物に基づいて変動する。

## 【0121】

「対照試料」という用語は、HSD17B13 rs72613567バリアントを有さない、好ましくは、HSD17B13遺伝子の野生型対立遺伝子に関してホモ接合体である対象から得られた試料を指す。そのような試料は、生体試料と同時に得ることもでき、

10

20

30

40

50

異なる時に得ることもできる。生体試料および対照試料はどちらも同じ組織または体液から得ることができる。

【0122】

「相同な」配列（例えば、核酸配列）は、既知の参照配列と同一であるかまたは実質的に同様である配列を含み、したがって、相同な配列は、例えば、既知の参照配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。相同な配列としては、例えば、オルソロガス配列およびパラロガス配列を挙げることができる。相同な遺伝子は、例えば、一般には共通祖先のDNA配列から種分化事象（オルソロガス遺伝子）または遺伝子重複事象（パラロガス遺伝子）のいずれかを通じて伝わる。「オルソロガス」遺伝子は、共通祖先の遺伝子から種分化によって進化した異なる種の遺伝子を含む。オルソログは、一般には進化の過程で同じ機能を保持する。「パラロガス」遺伝子は、ゲノム内の重複によって関連する遺伝子を含む。パラログは進化の過程で新しい機能を進化させ得る。

10

【0123】

「*in vitro*」という用語は、人工的な環境、および人工的な環境（例えば、試験管）内で起こるプロセスまたは反応を包含する。「*in vivo*」という用語は、天然の環境（例えば、細胞または生物体または体、例えば、生物体内または体内の細胞）および天然の環境内で起こるプロセスまたは反応を包含する。「*ex vivo*」という用語は、個体の体から取り出された細胞およびそのような細胞内で起こるプロセスまたは反応を包含する。

20

【0124】

1つまたは複数の記載されている要素を「含む（*comprising*）」または「含む（*including*）」組成物または方法は、具体的に記載されていない他の要素を含み得る。例えば、タンパク質を「含む（*comprises*）」または「含む（*includes*）」組成物は、タンパク質を単独で、または他の成分と組み合わせて含有し得る。「から本質的になる（*consisting essentially of*）」という移行句は、特許請求の範囲が、請求項に記載されている指定の要素ならびに特許請求された発明の基本および新規の特性（複数可）に実質的に影響を及ぼさない要素を包含するものと解釈されるべきであることを意味する。したがって、「から本質的になる（*consisting essentially of*）」という用語は、本発明の請求項において使用される場合、「含む（*comprising*）」と同等であると解釈されることを意図しない。

30

【0125】

「任意選択の」または「必要に応じて」とは、その後に記載されている事象または状況が生じる場合と生じない場合があること、ならびに、当該説明が、事象または状況が生じる例および事象または状況が生じない例を含むことを意味する。

【0126】

値の範囲の明示は、範囲内のまたは範囲を規定する全ての整数、および範囲内の整数によって規定される全ての部分範囲を含む。

40

【0127】

文脈からそうでないことが明らかでない限り、「約」という用語は、記載値の標準の測定の誤差限界（例えば、SEM）の範囲内の値を包含する。

【0128】

「および／または」という用語は、関連する列挙されている項目の1つまたは複数のありとあらゆる可能性のある組合せ、ならびに代替（「または」）として解釈される場合には組合せがないことを指し、それを包含する。

【0129】

「または（*or*）」という用語は、特定の一覧のうちの任意の1メンバーを指し、その一

50

覧のメンバーの任意の組合せも含む。

【0130】

「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という単数形の冠詞は、文脈によりそうでないことが明確に規定されない限り、複数の参照対象を含む。例えば、「1つの(a)Cas9タンパク質」または「少なくとも1つの(at least one)Cas9タンパク質」という用語は、それらの混合物を含めた複数のCas9タンパク質を含み得る。

【0131】

統計的に有意なとは、p 0.05であることを意味する。

【0132】

詳細な説明

I. 概要

アラニンおよびアスパラギン酸トランスアミナーゼレベルの低下；非アルコール性およびアルコール性脂肪性肝疾患、肝硬変、および肝細胞癌を含めた慢性肝疾患のリスクの低下；ならびに単純な脂肪症からより臨床的に進行した段階の慢性肝疾患への進行の低減に関連することが発見されたHSD17B13バリアントが本明細書において提示される。以前に同定されていない、バリアントに関連するHSD17B13遺伝子の転写産物も本明細書において提示される。

【0133】

HSD17B13のバリアントに関連する単離された核酸およびタンパク質、ならびにこれらの核酸およびタンパク質を含む細胞が本明細書において提示される。HSD17B13タンパク質をコードする組換えHSD17B13遺伝子または核酸を発現するためのスクレアーゼ作用剤、外因性ドナー配列、転写活性化因子、転写リプレッサー、および発現ベクターの任意の組合せの使用を通じて細胞を変更するための方法も提供される。慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症するリスクがある対象を処置するための治療および予防方法も提供される。

【0134】

II. HSD17B13バリアント

HSD17B13のバリアントに関連する単離された核酸およびタンパク質（水酸化ステロイド17-ベータデヒドロゲナーゼ13、17-ベータ-水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼ13、17-水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼ-13、17-HSD13、短鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼ9、SCDR9、HMFN0376、NILL497、およびSDR16C3としても公知）が本明細書において提示される。ヒトHSD17B13遺伝子は、およそ19kbの長さであり、ゲノム内の4q22.1に位置する7つのエクソンおよび6つのインtronを含む。例示的なヒトHSD17B13タンパク質配列には、UniProt受託番号Q7Z5P4（配列番号240および241；それぞれQ7Z5P4-1およびQ7Z5P4-2）およびNCBI Reference Sequence番号NP\_835236およびNP\_001129702（それぞれ配列番号242および243）が割り当てられる。例示的なヒトHSD17B13mRNAには、NCBI Reference Sequence番号NM\_178135およびNM\_001136230（それぞれ配列番号244および245）が割り当てられる。

【0135】

特に、インtron6内のドナースプライス部位に隣接してアデニンが挿入されたスプライスHSD17B13のバリアント(rs72613567)が本明細書において提示される。アデニンは、染色体のフォワード（プラス）鎖における挿入物であり、これは、染色体のリバース（マイナス）鎖に挿入されるチミンに対応する。ヒトHSD17B13遺伝子は逆方向に転写されるので、このスクレオチド挿入は、配列番号1として提示される例示的な野生型HSD17B13遺伝子配列に対して配列番号2として提示される例示的なHSD17B13 rs72613567バリアント配列へのチミンの挿入として反映される。したがって、この挿入は、本明細書では、配列番号1の12665位と12666

10

20

30

40

50

位との間または配列番号 2 の 1 2 6 6 位へのチミンの挿入と称される。

【 0 1 3 6 】

野生型 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を有する対象では 2 つの m R N A 転写産物 ( A および B ; それぞれ配列番号 4 および 5 ) が発現されることが以前に同定された。転写産物 A は H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の 7 つのエクソンを全て含むが、転写産物 B ではエクソン 2 がスキップされている。転写産物 A は、野生型対象において優位の転写産物である。しかし、発現される 6 種の追加的な以前に同定されていない H S D 1 7 B 1 3 転写産物 ( C ~ H 、それぞれ配列番号 6 ~ 1 1 ) が本明細書において提示される。これらの転写産物を図 4 に示す。転写産物 C では、転写産物 A と比較してエクソン 6 がスキップされている。転写産物 D では、エクソン 6 の 3' にグアニンが挿入されており、その結果、転写産物 A と比較してエクソン 7 におけるフレームシフトおよびエクソン 7 の中途短縮が生じている。転写産物 E では、転写産物 A と比較してエクソン 3 と 4 との間に追加的なエクソンが存在する。H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアント保因者においてのみ発現される転写産物 F では、転写産物 A と比較してエクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーが存在する。転写産物 G では、エクソン 2 がスキップされており、また、エクソン 6 の 3' にグアニンが挿入されており、その結果、転写産物 A と比較してエクソン 7 におけるフレームシフトおよびエクソン 7 の中途短縮が生じている。転写産物 H では、エクソン 3 と 4 との間に追加的なエクソンが存在し、かつ、エクソン 6 の 3' にグアニンが挿入されており、その結果、転写産物 A と比較してエクソン 7 におけるフレームシフトおよびエクソン 7 の中途短縮が生じている。転写産物 C 、 D 、 F 、 G 、および H は、 H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアント保因者において優位であり、転写産物 D は H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者において最も豊富な転写産物である。低レベルで発現する 1 種の追加的な以前に同定されていない H S D 1 7 B 1 3 転写産物 ( F ' 、配列番号 2 4 6 ) も本明細書において提示される。転写産物 F と同様に、転写産物 F ' も転写産物 A と比較してエクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーを含むが、転写産物 F ' とは対照的に、このリードスルーは、 H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアント遺伝子に存在するチミンの挿入を含まない。各転写産物についての H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内のエクソンのヌクレオチド位を以下に提示する。

【 0 1 3 7 】

【表 B 】

野生型 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子についてホモ接合性の対象においてより広く行きわたっている H S D 1 7 B 1 3 転写産物のエクソンについての、配列番号 1 におけるヌクレオチド位置。

	転写産物 A	転写産物 B	転写産物 E	転写産物 F'
エクソン 1	1-275	1-275	1-275	1-275
エクソン 2	4471-4578	スキップ	4471-4578	4471-4578
エクソン 3	5684-5815	5684-5815	5684-5815	5684-5815
エクソン 3'	存在しない	存在しない	6210-6281	存在しない
エクソン 4	7308-7414	7308-7414	7308-7414	7308-7414
エクソン 5	8947-9084	8947-9084	8947-9084	8947-9084
エクソン 6	12548-12664	12548-12664	12548-12664	12548-13501*
エクソン 7	17599-19118	17599-19118	17599-19118	スキップ

\*エクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーを含む:リードスルー=12665 ~ 13501 位

【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

50

## 【表 C】

rs72613567 HSD17B13 バリアント遺伝子(12666 位への T の挿入)についてホモ接合性である対象においてより広く行きわたっている HSD17B13 転写産物のエクソンについての、配列番号 2 におけるヌクレオチド位置。

	転写産物 C	転写産物 D	転写産物 F	転写産物 G	転写産物 H
エクソン 1	1-275	1-275	1-275	1-275	1-275
エクソン 2	4471-4578	4471-4578	4471-4578	スキップ	4471-4578
エクソン 3	5684-5815	5684-5815	5684-5815	5684-5815	5684-5815
エクソン 3'	存在しない	存在しない	存在しない	存在しない	6210-6281
エクソン 4	7308-7414	7308-7414	7308-7414	7308-7414	7308-7414
エクソン 5	8947-9084	8947-9084	8947-9084	8947-9084	8947-9084
エクソン 6	スキップ	12548-12665^	12548-13502*	12548-12665^	12548-12665^
エクソン 7	17600-19119	17600-19119	スキップ	17600-19119	17600-19119

^転写産物 A と比較して 3'末端に追加的な残基 12665 を含む

\*エクソン 6 からインtron 6 へのリードスルーリードスルー=12665～13502 位

## 【0139】

本明細書の他の箇所でより詳細に説明されている通り、HSD17B13 rs72613567 バリアントは、アラニンおよびアスパラギン酸トランスマニナーゼレベルの低下、ならびに非アルコール性およびアルコール性脂肪性肝疾患、肝硬変、および肝細胞癌を含めた慢性肝疾患のリスクの低下に関連する。HSD17B13 rs72613567 バリアントはまた、単純な脂肪症からより臨床的に進行した段階の慢性肝疾患への進行の低減にも関連する。

## 【0140】

## A. 核酸

HSD17B13 バリアントおよびバリアント HSD17B13 転写産物に関連する単離された核酸が本明細書に開示される。本明細書に開示される核酸のいずれかとストリングエントなまたは中等度の条件でハイブリダイズする単離された核酸も開示される。そのような核酸は、例えば、HSD17B13 バリアントタンパク質を発現させるのに、または、それが本明細書の他の箇所に詳しく記載されているプライマー、プローブ、外因性ドナー配列、ガイド RNA、アンチセンス RNA、s h RNA、および si RNA として有用であり得る。

## 【0141】

開示されるポリヌクレオチドと相互作用することが可能な機能的核酸も開示される。機能的核酸は、標的分子への結合または特定の反応の触媒などの特定の機能を有する核酸分子である。機能的核酸の例としては、アンチセンス分子、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子、および外部ガイド配列が挙げられる。機能的核酸分子は、エフェクター、阻害剤、モジュレーター、および標的分子が有する特異的活性の刺激物質としての機能を果たし得るか、または、機能的核酸分子は、任意の他の分子とは独立した新規の活性を有し得る。

## 【0142】

アンチセンス分子は、標的核酸分子と規範的または非規範的塩基対合のいずれかを通じて相互作用するように設計される。アンチセンス分子と標的分子の相互作用は、標的分子の、例えば RNAse H 媒介性 RNA - DNA ハイブリッド分解による破壊を促進するように設計される。あるいは、アンチセンス分子は、転写または複製などの標的分子に対して通常なされるプロセシング機能を妨害するように設計される。アンチセンス分子は、標的分子の配列に基づいて設計することができる。最も利用しやすい標的分子の領域を見つけることによってアンチセンス効率を最適化するための多数の方法が存在する。例示的な方法は、in vitro 選択実験ならびに DMS および DEPC を使用した DNA 改変試

10

20

30

40

50

験である。アンチセンス分子は、一般に、標的分子に 10 - 6 未満もしくはそれと等しい解離定数 (  $k_d$  ) 、 10 - 8 未満もしくはそれと等しい解離定数 (  $k_d$  ) 、 10 - 10 未満もしくはそれと等しい解離定数 (  $k_d$  ) 、または 10 - 12 未満もしくはそれと等しい解離定数 (  $k_d$  ) で結合する。アンチセンス分子の設計および使用を補助する方法および技法の代表的な試料は、以下の非限定的な米国特許の一覧において見出すことができる：米国特許第 5,135,917 号；同第 5,294,533 号；同第 5,627,158 号；同第 5,641,754 号；同第 5,691,317 号；同第 5,780,607 号；同第 5,786,138 号；同第 5,849,903 号；同第 5,856,103 号；同第 5,919,772 号；同第 5,955,590 号；同第 5,990,088 号；同第 5,994,320 号；同第 5,998,602 号；同第 6,005,095 号；同第 6,007,995 号；同第 6,013,522 号；同第 6,017,898 号；同第 6,018,042 号；同第 6,025,198 号；同第 6,033,910 号；同第 6,040,296 号；同第 6,046,004 号；同第 6,046,319 号；および同第 6,057,437 号、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる。アンチセンス分子の例としては、アンチセンス RNA、低分子干渉 RNA ( siRNA ) 、および低分子ヘアピン型 RNA ( shRNA ) が挙げられ、これらは、本明細書の他の箇所でより詳細に記載されている。

#### 【 0143 】

本明細書に開示される単離された核酸は、RNA、DNA、またはRNAおよびDNAの両方を含み得る。単離された核酸はまた、例えばベクター内で異種核酸配列と、または異種標識と連結または融合することもできる。例えば、本明細書に開示される単離された核酸は、単離された核酸および異種核酸配列を含むベクターまたは外因性ドナー配列内にあってよい。単離された核酸はまた、蛍光標識などの異種標識と連結または融合することもできる。標識の他の例は、本明細書の他の箇所で開示される。

#### 【 0144 】

開示される核酸分子は、例えば、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体もしくはヌクレオチド置換体などの非天然もしくは修飾ヌクレオチドで構成されてよい。そのようなヌクレオチドは、修飾塩基、糖もしくはリン酸基を含有するヌクレオチド、またはその構造内に非天然部分が組み入れられたヌクレオチドを含む。非天然ヌクレオチドの例としては、ジデオキシヌクレオチド、ビオチン化ヌクレオチド、アミノ化ヌクレオチド、脱アミノ化ヌクレオチド、アルキル化ヌクレオチド、ベンジル化ヌクレオチドおよびフルオロフォアで標識されたヌクレオチドが挙げられる。

#### 【 0145 】

本明細書に開示される核酸分子は、1つまたは複数のヌクレオチド類似体または置換を含み得る。ヌクレオチド類似体は、塩基部分、糖部分、またはリン酸部分のいずれかに、ある型の修飾を含有するヌクレオチドである。塩基部分に対する修飾は、A、C、G、およびT/Uの天然および合成的修飾ならびに異なるプリンまたはピリミジン塩基、例えば、プソイドウリジン、ウラシル-5-イル、ヒポキサンチン-9-イル(I)、および2-アミノアデニン-9-イルを含む。修飾塩基としては、例えば、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンが挙げられる。追加的な塩基修飾は、例えば、それぞれが、あらゆる目的に関し

10

20

30

40

50

てその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第3,687,808号；Englischら(1991年)Angewandte Chemie, International Edition, 30巻:613頁；およびSanghvi, Y. S.、第15章、Antisense Research and Applications, 289～302頁、Crooke, S. T.およびLebleu, B.編、CRC Press, 1993年において見出すことができる。2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、5-プロピニルシトシン、および5-メチルシトシンを含めた5置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびにN-2、N-6およびO-6置換プリンなどのある特定のヌクレオチド類似体では、2重鎖形成の安定性が増大し得る。多くの場合、塩基修飾は、2重鎖安定性の増大などの独特の性質を実現するために、例えば、2'-O-メトキシエチルなどの糖修飾と組み合わせることができる。塩基修飾の範囲を詳述および記載している米国特許第4,845,205号；同第5,130,302号；同第5,134,066号；同第5,175,273号；同第5,367,066号；同第5,432,272号；同第5,457,187号；同第5,459,255号；同第5,484,908号；同第5,502,177号；同第5,525,711号；同第5,552,540号；同第5,587,469号；同第5,594,121号、同第5,596,091号；同第5,614,617号；および同第5,681,941号などの多数の米国特許が存在する。これらのそれぞれは、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0146】

ヌクレオチド類似体は、糖部分の修飾も含み得る。糖部分に対する修飾としては、例えば、リボースおよびデオキシリボースに対する天然修飾ならびに合成的修飾を挙げができる。糖修飾としては、例えば、2'位における以下の修飾が挙げられる：OH；F；O-、S-、もしくはN-アルキル；O-、S-、もしくはN-アルケニル；O-、S-もしくはN-アルキニル；またはO-アルキル-O-アルキル、ここで、アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、置換または非置換C1～C10アルキルまたはC2～C10アルケニルおよびアルキニルであり得る。例示的な2'糖修飾としては、例えば、-O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-ONH<sub>2</sub>、および-O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>も挙げられ、ここで、nおよびmは1から約10までである。

## 【0147】

2'位における他の修飾としては、例えば、C<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリール、アラルキル、O-アルカリールまたはO-アラルキル、SH、SCH<sub>3</sub>、OCN、C1、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、ONO<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターラーカー、オリゴヌクレオチドの薬物動態的性質を改善するための基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学的性質を改善するための基、および同様の性質を有する他の置換基が挙げられる。糖の他の位置、特に、3'末端ヌクレオチドまたは2'～5'連結オリゴヌクレオチドの糖の3'位および5'末端ヌクレオチドの5'位にも同様の修飾を行うことができる。修飾糖は、CH<sub>2</sub>およびSなどの、架橋環酸素に修飾を含有する糖も含み得る。ヌクレオチド糖類似体は、ペントフラノシリル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣体を有してもよい。そのような修飾糖構造の調製を教示している多数の米国特許、例えば、それぞれが、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,981,957号；同第5,118,800号；同第5,319,080号；同第5,359,044号；同第5,393,878号；同第5,446,137号；同第5,466,786号；同第5,514,785号；同第5,519,134号；同第5,567,811号；同第5,576,427号；同第5,591,722号；同第5,597,909号；同第5,610,300号；同第5,627,053号；同第5,639,873号；同第5,646,265号；同第5,658,873号；同第5,670,633号；および同第5,700,920号が存在する。

## 【0148】

10

20

30

40

50

ヌクレオチド類似体は、リン酸部分において修飾されていてもよい。修飾リン酸部分としては、例えば、2つのヌクレオチド間の連結が、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含めたメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホラミデートおよびアミノアルキルホスホラミデートを含めたホスホラミデート、チオノホスホラミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびにボラノホスフェートを含有するように修飾されたリン酸部分が挙げられる。これらの、2つのヌクレオチド間のリン酸または修飾リン酸連結は、3'-5'連結または2'-5'連結によるものであってよく、連結は、3'-5'から5'-3'へまたは2'-5'から5'-2'への方向性の逆転を含有してよい。種々の塩、混合塩および遊離酸形態も含まれる。多数の米国特許が、修飾リン酸を含有するヌクレオチドの作出および使用の仕方を教示しており、それらとして、例えば、それぞれが、あらゆる目的に關してその全体が参考により本明細書に組み込まれる、米国特許第3,687,808号；同第4,469,863号；同第4,476,301号；同第5,023,243号；同第5,177,196号；同第5,188,897号；同第5,264,423号；同第5,276,019号；同第5,278,302号；同第5,286,717号；同第5,321,131号；同第5,399,676号；同第5,405,939号；同第5,453,496号；同第5,455,233号；同第5,466,677号；同第5,476,925号；同第5,519,126号；同第5,536,821号；同第5,541,306号；同第5,550,111号；同第5,563,253号；同第5,571,799号；同第5,587,361号；および同第5,625,050号が挙げられる。

## 【0149】

ヌクレオチド置換体は、ヌクレオチドと同様の機能的性質を有するがリン酸部分を含有しない分子、例えば、ペプチド核酸(PNA)を含む。ヌクレオチド置換体は、核酸をワトソン・クリックまたはフーグスティーン様式で認識するが、リン酸部分以外の部分を通じて連結する分子を含む。ヌクレオチド置換体は、妥当な標的核酸と相互作用した場合、二重らせん型構造に従うことができる。

## 【0150】

ヌクレオチド置換体はまた、リン酸部分または糖部分が置き換えられたヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体も含む。ヌクレオチド置換体は、標準のリン原子を含有しない場合がある。リン酸に対する置換体は、例えば、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、または1つもしくは複数の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環式ヌクレオシド間連結であり得る。これらとしては、モルホリノ連結(一部ヌクレオシドの糖部分から形成される)；シロキサン骨格；硫化物、スルホキシドおよびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファミン酸骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドロジノ骨格；スルホン酸およびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに混合N、O、SおよびCH<sub>2</sub>構成部分を有するその他のものを有するものが挙げられる。多数の米国特許が、これらの型のリン酸置換の作出および使用の仕方を開示しており、それらとして、これだけに限定されないが、それぞれが、あらゆる目的に關してその全体が参考により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,034,506号；同第5,166,315号；同第5,185,444号；同第5,214,134号；同第5,216,141号；同第5,235,033号；同第5,264,562号；同第5,264,564号；同第5,405,938号；同第5,434,257号；同第5,466,677号；同第5,470,967号；同第5,489,677号；同第5,541,307号；同第5,561,225号；同第5,596,086号；同第5,602,240号；同第5,610,289号；同第5,602,240号；同第5,608,046号；同第5,610,289号；同第5,618,704号；同第5,623,070号；同第5,663,312号；同

20

30

40

50

第5, 633, 360号；同第5, 677, 437号；および同第5, 677, 439号が挙げられる。

【0151】

ヌクレオチド置換体では、ヌクレオチドの糖部分およびリン酸部分の両方を、例えば、アミド型連結（アミノエチルグリシン）（PNA）によって置き換えることができることも理解される。米国特許第5, 539, 082号；同第5, 714, 331号；および同第5, 719, 262号はPNA分子の作出および使用の仕方を教示しており、それぞれが、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる。あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれるNielsenら（1991年）Science、254巻：1497～1500頁も参照されたい。

10

【0152】

例えば、細胞内取り込みを増強するために、他の型の分子（コンジュゲート）をヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体に連結することも可能である。コンジュゲートは、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体に化学的に連結することができる。そのようなコンジュゲートとしては、例えば、脂質部分、例えば、コレステロール部分（Letsingerら（1989年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻：6553～6556頁、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、コール酸（Manoharanら（1994年）Bioorg. Med. Chem. Lett.、4巻：1053～1060頁、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ヘキシリ-S-トリチルチオールなどのチオエーテル（Manoharanら（1992年）Ann. N.Y. Acad. Sci.、660巻：306～309頁；Manoharanら（1993年）Bioorg. Med. Chem. Lett.、3巻：2765～2770頁、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、チオコレステロール（Oberhauserら（1992年）Nucl. Acids Res.、20巻：533～538頁、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基などの脂肪族鎖（Saison-Behmoarasら（1991年）EMBO J.、10巻：1111～1118頁；Kabanovら（1990年）FEBS Lett.、259巻：327～330頁；Svinarchukら（1993年）Bioc himie、75巻：49～54頁、それぞれが、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム1, 2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネートなどのリン脂質（Manoharanら（1995年）Tetrahedron Lett.、36巻：3651～3654頁；Sheaら（1990年）Nucl. Acids Res.、18巻：3777～3783頁、それぞれが、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖（Manoharanら（1995年）Nucleosides & Nucleotides、14巻：969～973頁、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、またはアダマンタン酢酸（Manoharanら（1995年）Tetrahedron Lett.、36巻：3651～3654頁、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、パルミチル部分（Mishraら（1995年）Biochim. Biophys. Acta、1264巻：229～237頁）、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシリアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分（Crookeら（1996年）J. Pharmacol. Exp. Ther.、277巻：923～937頁、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）が挙げられる。多数の米国特許が、そのようなコンジュゲートの調製を教示しており、それらとして、例えば、それぞれが、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4, 828, 979号；同第4, 948, 882号；同第5, 218, 105号；同第5, 525, 465号；同第5, 541, 313号；同第5, 545, 730号；同第5, 552, 538号；同第5, 578, 717号、同第5, 580, 731号；同第5, 580, 731号；同第5, 580, 731号；同第5, 591, 584号；同第5, 109, 124号；同第5, 118, 802号；同第5, 138, 045号；同第5, 414, 077号；同第5, 486, 603号；同第5, 512, 439号；同第5, 578, 718号；同第5, 608,

20

30

40

50

046号；同第4, 587, 044号；同第4, 605, 735号；同第4, 667, 025号；同第4, 762, 779号；同第4, 789, 737号；同第4, 824, 941号；同第4, 835, 263号；同第4, 876, 335号；同第4, 904, 582号；同第4, 958, 013号；同第5, 082, 830号；同第5, 112, 963号；同第5, 214, 136号；同第5, 082, 830号；同第5, 112, 963号；同第5, 214, 136号；同第5, 245, 022号；同第5, 254, 469号；同第5, 258, 506号；同第5, 262, 536号；同第5, 272, 250号；同第5, 292, 873号；同第5, 317, 098号；同第5, 371, 241号、同第5, 391, 723号；同第5, 416, 203号、同第5, 451, 463号；同第5, 510, 475号；同第5, 512, 667号；同第5, 514, 785号；同第5, 565, 552号；同第5, 567, 810号；同第5, 574, 142号；同第5, 585, 481号；同第5, 587, 371号；同第5, 595, 726号；同第5, 597, 696号；同第5, 599, 923号；同第5, 599, 928号および同第5, 688, 941号が挙げられる。

#### 【0153】

本明細書に開示される単離された核酸は、天然に存在するHSD17B13遺伝子またはmRNA転写産物のヌクレオチド配列を含む場合もあり、天然に存在しない配列を含む場合もある。一例では、天然に存在しない配列は、天然に存在しない配列と、同義の突然変異またはコードされるHSD17B13タンパク質に影響を及ぼさない突然変異に起因して異なり得る。例えば、配列は、同義の突然変異またはコードされるHSD17B13タンパク質に影響を及ぼさない突然変異を除いて同一であり得る。同義の突然変異または置換とは、もたらされるアミノ酸配列が改変されないような、タンパク質をコードする遺伝子のエクソン内の1つのヌクレオチドでの別のヌクレオチドの置換である。これは、いくつかのアミノ酸が1つよりも多くの3塩基対コドンによってコードされる遺伝暗号の縮重が原因で可能性が生じる。同義の置換は、例えば、コドン最適化のプロセスで使用される。

#### 【0154】

本明細書に開示される核酸によってコードされるタンパク質ならびに本明細書に開示される単離された核酸またはタンパク質および単離された核酸またはタンパク質の安定性を増大させる（例えば、所与の保管条件下（例えば、-20、4、もしくは周囲温度）で分解生成物が閾値未満、例えば出発核酸もしくはタンパク質の0.5重量%未満に留まる期間を延長させる；またはin vivoにおける安定性を増大させる）担体を含む組成物も本明細書に開示される。そのような担体の非限定的な例としては、ポリ（乳酸）（PLA）マイクロスフェア、ポリ（D,L-乳酸・ポリグリコール酸共重合体）（PLGA）マイクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コクリエート、および脂質微小管（lipid microtubule）が挙げられる。

#### 【0155】

(1) HSD17B13 rs72613567バリアントの突然変異体残基を含む核酸HSD17B13遺伝子の少なくとも15個連続したヌクレオチドを含み、HSD17B13 rs72613567バリアントと最適にアラインメントした場合、HSD17B13 rs72613567バリアント（配列番号2）の12666位に対応する位置にチミンを有する（または12666位および12667位に対応する位置にチミンを有する）単離された核酸が本明細書に開示される。すなわち、HSD17B13遺伝子の少なくとも15個連続したヌクレオチドを含み、野生型HSD17B13遺伝子と最適にアラインメントした場合、野生型HSD17B13遺伝子（配列番号1）の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む単離された核酸が本明細書に開示される。そのような単離された核酸は、例えば、HSD17B13バリアント転写産物およびタンパク質を発現させるのに、または外因性ドナー配列として有用であり得る。そのような単離された核酸は、例えば、ガイドRNA、プライマー、およびプローブとしても有用であり得る。

#### 【0156】

10

20

30

30

40

50

H S D 1 7 B 1 3 遺伝子は、任意の生物体に由来する H S D 1 7 B 1 3 遺伝子であってよい。例えば、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子は、ヒト H S D 1 7 B 1 3 遺伝子または非ヒト哺乳動物、齧歯類、マウス、またはラットなどの別の生物体に由来するオルソログであってよい。

【 0 1 5 7 】

集団内の遺伝子配列は、一塩基多型などの多型に起因して変動し得ることが理解される。本明細書において提示される例は、単に例示的な配列である。他の配列も可能である。一例として、少なくとも 1 5 個連續したヌクレオチドは、配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位または 1 2 6 6 6 位および 1 2 6 6 7 位を含む H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアント（配列番号 2）の対応する配列と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であってよい。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位または 1 2 6 6 6 位および 1 2 6 6 7 位を含む、配列番号 2 の少なくとも 1 5 個連續したヌクレオチドを含む。別の例として、少なくとも 1 5 個連續したヌクレオチドは、配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位および 1 2 6 6 6 位を含む野生型 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子（配列番号 1）の対応する配列と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であり得、ここで、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位に対応する位置と 1 2 6 6 6 位に対応する位置との間にチミンが存在する。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位および 1 2 6 6 6 位を含む、配列番号 1 の少なくとも 1 5 個連續したヌクレオチドを含み、ここで、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位に対応する位置と 1 2 6 6 6 位に対応する位置との間にチミンが存在する。

【 0 1 5 8 】

単離された核酸は、例えば、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の少なくとも 2 0 個、2 5 個、3 0 個、3 5 個、4 0 個、4 5 個、5 0 個、6 0 個、7 0 個、8 0 個、9 0 個、1 0 0 個、2 0 0 個、3 0 0 個、4 0 0 個、5 0 0 個、6 0 0 個、7 0 0 個、8 0 0 個、9 0 0 個、または 1 0 0 0 個連續したヌクレオチドを含み得る。あるいは、単離された核酸は、例えば、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の少なくとも 1 0 0 0 個、2 0 0 0 個、3 0 0 0 個、4 0 0 0 個、5 0 0 0 個、6 0 0 0 個、7 0 0 0 個、8 0 0 0 個、9 0 0 0 個、1 0 0 0 0 個、1 1 0 0 0 個、1 2 0 0 0 個、1 3 0 0 0 個、1 4 0 0 0 個、1 5 0 0 0 個、1 6 0 0 0 個、1 7 0 0 0 個、1 8 0 0 0 個、または 1 9 0 0 0 個連續したヌクレオチドを含み得る。

【 0 1 5 9 】

一部の場合では、単離された核酸は、遺伝子の 1 つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に対して欠失している H S D 1 7 B 1 3 ミニ遺伝子を含み得る。一例として、欠失したセグメントは、1 つまたは複数のインtron 配列を含む。そのような H S D 1 7 B 1 3 ミニ遺伝子は、例えば、H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D 由来のエクソン 1 ~ 7 に対応するエクソン、および配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 のインtron 6 に対応するインtron を含み得る。一例として、H S D 1 7 B 1 3 ミニ遺伝子は、配列番号 2 由来のエクソン 1 ~ 7 およびインtron 6 を含み得る。ミニ遺伝子は、本明細書の他の箇所でより詳細に記載されている。

【 0 1 6 0 】

( 2 ) H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの突然変異体残基に隣接するかまたはそれを含む配列とハイブリダイズする核酸

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントと最適にアラインメントした場合、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアント（配列番号 2）の 1 2 6 6 6 位または 1 2 6 6 6 位および 1 2 6 6 7 位に対応する位置を含むかまたはそれから 1 0 0 0 、5 0 0 、4 0 0 、3 0 0 、2 0 0 、1 0 0 、5 0 、4 5 、4 0 、3 5 、3 0 、2 5 、2 0 、1 5 、1 0 、または 5 ヌクレオチドの範囲内であるセグメントで H S D 1 7 B 1 3 遺伝子（例えば、H S D 1 7 B 1 3 ミニ遺伝子）とハイブリダイズする少なくとも 1 5 個連續したヌクレオチドを含む単離された核酸も本明細書に開示される。そのような単離された核

10

20

30

40

50

酸は、例えば、ガイドRNA、プライマー、プローブ、または外因性ドナー配列として有用であり得る。

【0161】

HSD17B13遺伝子は、任意の生物体に由来するHSD17B13遺伝子であってよい。例えば、HSD17B13遺伝子は、ヒトHSD17B13遺伝子であっても非ヒト哺乳動物、マウス、またはラットなどの別の生物体由来のオルソログであってもよい。

【0162】

一例として、少なくとも15個連続したヌクレオチドは、配列番号2と最適にアラインメントした場合、HSD17B13 rs72613567バリアント（配列番号2）の対応する配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるHSD17B13遺伝子のセグメントまたはHSD17B13ミニ遺伝子とハイブリダイズし得る。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号2の少なくとも15個連続したヌクレオチドとハイブリダイズし得る。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位もしくは12666位および12667位または配列番号2の12666位もしくは12666位および12667位に対応する位置を含むセグメントとハイブリダイズする。

【0163】

単離された核酸がハイブリダイズし得るセグメントは、例えば、HSD17B13遺伝子の少なくとも20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、75個、90個、95個、100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個、または1000個連続したヌクレオチドを含み得る。あるいは、単離された核酸は、例えば、HSD17B13遺伝子の少なくとも1000個、2000個、3000個、4000個、5000個、6000個、7000個、8000個、9000個、10000個、11000個、12000個、13000個、14000個、15000個、16000個、17000個、18000個、または19000個連続したヌクレオチドを含み得る。あるいは、単離された核酸がハイブリダイズし得るセグメントは、例えば、HSD17B13遺伝子の最大20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、75個、90個、95個、100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個、または1000個連続したヌクレオチドであり得る。例えば、セグメントは、約15～100ヌクレオチドの長さ、または約15～35ヌクレオチドの長さであり得る。

【0164】

(3) HSD17B13 rs72613567バリアントによって生じるcDNAおよびバリアント転写産物

転写産物A～Hのいずれか1つと最適にアラインメントした場合、転写産物A～H（それぞれ配列番号4～11）、特に転写産物C～Hのいずれか1つに対応するmRNA転写産物またはcDNAの全部または一部に対応する核酸も提供される。集団内の遺伝子配列およびそのような遺伝子から転写されるmRNA配列は、一塩基多型などの多型に起因して変動し得ることが理解される。各転写産物について本明細書において提示される配列は、単に例示的な配列である。他の配列も可能である。具体的な非限定的な例を以下に提示する。そのような単離された核酸は、例えば、HSD17B13バリアント転写産物およびタンパク質を発現させるのに有用であり得る。

【0165】

単離された核酸は、任意の長さであってよい。例えば、単離された核酸は、HSD17B13タンパク質の全部または一部をコードする少なくとも10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個、1000個、または2000個連続したヌクレオチドを含み得る。一部の場合では

10

20

30

40

50

、単離された核酸は、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の全部または一部をコードする連続したヌクレオチドを含み、連続したヌクレオチドは、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の少なくとも2つの異なるエクソンに由来する配列（例えば、イントロンの介在を伴わず、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の少なくとも1つのエクソンとエクソンとの境界にまたがる）を含む。

【0166】

H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D（配列番号7）、転写産物 G（配列番号10）、および転写産物 H（配列番号11）は、エクソン6の3'末端にグアニンの挿入を含み、その結果、転写産物 A と比較してエクソン7のフレームシフトおよびエクソン7によってコードされる H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の領域の中途短縮が生じている。したがって、転写産物 A（またはその断片またはホモログ）には存在しない、転写産物 D、G、およびH（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメント（例えば、少なくとも15個連続したヌクレオチド）を含む単離された核酸が本明細書において提示される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の全部または一部をコードする少なくとも15個連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも20個連続したヌクレオチドまたは少なくとも30個連続したヌクレオチド）を含み、連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも5個連続したヌクレオチド、少なくとも10個連続したヌクレオチドまたは少なくとも15個連続したヌクレオチド）のセグメントが、それぞれ配列番号7、10、または11と最適にアラインメントした場合、配列番号7（H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D）、配列番号10（H S D 1 7 B 1 3 転写産物 G）、または配列番号11（H S D 1 7 B 1 3 転写産物 H）のエクソン6とエクソン7との境界にまたがる領域と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であり、かつ、セグメントが、配列番号7のエクソン6の3'末端の残基878に対応する残基にグアニンを含む（すなわち、転写産物 A と比べて、エクソン7の出発点のグアニンに加えて、エクソン6の3'末端にグアニンが挿入されている）か、配列番号10のエクソン6の3'末端の残基770に対応する残基にグアニンを含む（すなわち、転写産物 B と比べて、エクソン7の出発点のグアニンに加えて、エクソン6の3'末端にグアニンが挿入されている）か、または配列番号11のエクソン6の3'末端の残基950に対応する残基にグアニンを含む（すなわち、転写産物 E と比べて、エクソン7の出発点のグアニンに加えて、エクソン6の3'末端にグアニンが挿入されている）、単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、エクソン6および7のそれぞれに、グアニンの挿入がH S D 1 7 B 1 3 転写産物の他の特徴（例えば、エクソン7の出発点のグアニン、転写産物 F におけるイントロン6へのリードスルー、または転写産物 C におけるエクソン6の欠失）と区別されるのに十分な数のヌクレオチドを含むであろうことが理解される。

【0167】

一例として、単離された核酸は、エクソン6とエクソン7との境界にまたがる配列番号7の少なくとも15個連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも20個連続したヌクレオチドまたは少なくとも30個連続したヌクレオチド）を含み得、必要に応じて、配列番号7のエクソン6および7を含み、必要に応じて、配列番号7の配列全体を含む。

【0168】

必要に応じて、単離された核酸は、転写産物 G（またはその断片またはホモログ）には存在しない、転写産物 D（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメントをさらに含み、単離された核酸は、転写産物 H（またはその断片またはホモログ）には存在しない、転写産物 D（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメントをさらに含む。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、そのような単離された核酸は、転写産物 H と区別されるように、配列番号7と最適にアラインメントした場合、配列番号7（H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D）のエクソン3と4との境界にまたがる領域と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも5個連続したヌクレオチド、少なくとも10個連続した

10

20

30

40

50

ヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) のセグメントを含み得る。同様に、そのような単離された核酸は、転写産物 G と区別されるように、配列番号 7 と最適にアラインメントした場合、配列番号 7 (HSD17B13 転写産物 D) のエクソン 2 内の領域、配列番号 7 のエクソン 1 とエクソン 2 との境界にまたがる領域、または配列番号 7 のエクソン 2 とエクソン 3 との境界にまたがる領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である連続したヌクレオチド(例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) のセグメントを含み得る。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号 7 に記載の配列 (HSD17B13 転写産物 D) と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である配列を含み、配列番号 15 に記載の配列 (HSD17B13 アイソフォーム D) を含む HSD17B13 タンパク質をコードする。転写産物 D と同様に、転写産物 H (配列番号 11) は、転写産物 A と比較して、エクソン 6 の 3' にグアニンの挿入を含む。転写産物 H は、転写産物 A および転写産物 D と比較して、エクソン 3 と 4 との間に追加的なエクソン(エクソン 3') をさらに含む。したがって、上記に関して記載されている通り、転写産物 A (またはその断片またはホモログ) には存在しない、転写産物 D、G、および H (またはその断片またはホモログ) に存在するセグメントを含むが、転写産物 D (またはその断片またはホモログ) には存在しない、転写産物 H (またはその断片またはホモログ) のセグメント(例えば、少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) をさらに含む、単離された核酸が本明細書において提示される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、連続したヌクレオチド(例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) のセグメントが、配列番号 11 と最適にアラインメントした場合、配列番号 11 (HSD17B13 転写産物 H) のエクソン 3' 内の領域、配列番号 11 のエクソン 3 とエクソン 3' との境界にまたがる領域、または配列番号 11 のエクソン 3' とエクソン 4 との境界にまたがる領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である、転写産物 D について記載されている単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、エクソン 3 および 3' のそれぞれまたはエクソン 3' および 4 のそれぞれに、HSD17B13 転写産物の他の特徴(例えば、エクソン 3 と 4 との境界) と区別されるのに十分な数のヌクレオチドを含むであろうことが理解される。例えば、エクソン 3' の領域は、エクソン 3' 全体を含み得る。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号 11 に記載の配列 (HSD17B13 転写産物 H) と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である配列を含み、配列番号 19 に記載の配列 (HSD17B13 アイソフォーム H) を含む HSD17B13 タンパク質をコードする。

#### 【0169】

一例として、単離された核酸は、エクソン 3' 内の領域、エクソン 3 とエクソン 3' との境界にまたがる領域、またはエクソン 3' とエクソン 4 との境界にまたがる領域を含む配列番号 11 の少なくとも 15 個連続したヌクレオチド(例えば、少なくとも 20 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 30 個連続したヌクレオチド) を含み得、必要に応じて、配列番号 11 のエクソン 3' 全体を含み、必要に応じて、配列番号 11 の配列全体を含む。

#### 【0170】

転写産物 D と同様に、転写産物 G (配列番号 10) は、転写産物 A と比較して、エクソン 6 の 3' にグアニンの挿入を含む。しかし、さらに、転写産物 G では、転写産物 A および D には存在しないエクソン 1 とエクソン 3 との境界を含む)。したがって、転写産物 A (またはその断片またはホモログ) には存在しない、転写産物 D、G、および H (またはその断片またはホモログ) に存在するセグメントを含むが、転写産物 D (またはその断片

10

20

30

40

50

またはホモログ)には存在しない、転写産物G(またはその断片またはホモログ)由来のセグメント(例えば、少なくとも15個連続したヌクレオチド)をさらに含む、上記の単離された核酸が本明細書において提示される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、連続したヌクレオチド(例えば、少なくとも5個連続したヌクレオチド、少なくとも10個連続したヌクレオチドまたは少なくとも15個連続したヌクレオチド)のセグメントが、配列番号10と最適にアラインメントした場合、配列番号10(HSD17B13転写産物G)のエクソン1とエクソン3との境界にまたがる領域と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、転写産物Dについて記載されている単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、エクソン1および3のそれぞれに、HSD17B13転写産物の他の特徴(例えば、エクソン1と2との境界またはエクソン2と3との境界)と区別されるのに十分な数のヌクレオチドを含むであろうことが理解される。例えば、領域は、配列番号10のエクソン1および3の全体を含み得る。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号10に記載の配列(HSD17B13転写産物G)と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含み、配列番号18に記載の配列(HSD17B13アイソフォームG)を含むHSD17B13タンパク質をコードする。

#### 【0171】

一例として、単離された核酸は、エクソン1とエクソン3との境界にまたがる領域を含む配列番号10の少なくとも15個連続したヌクレオチド(例えば、少なくとも20個連続したヌクレオチドまたは少なくとも30個連続したヌクレオチド)を含み得、必要に応じて、配列番号10のエクソン1および3を含み、必要に応じて、配列番号10の配列全体を含む。

#### 【0172】

転写産物A(またはその断片またはホモログ)には存在しない、転写産物E(またはその断片またはホモログ)に存在するセグメント(例えば、少なくとも15個連続したヌクレオチド)を含む単離された核酸も本明細書において提示される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。転写産物E(配列番号8)は、転写産物Aと比較して、エクソン3と4との間に追加的なエクソンを含む。したがって、HSD17B13タンパク質の全部または一部をコードする少なくとも15個連続したヌクレオチド(例えば、少なくとも20個連続したヌクレオチドまたは少なくとも30個連続したヌクレオチド)を含み、連続したヌクレオチド(例えば、少なくとも5個連続したヌクレオチド、少なくとも10個連続したヌクレオチドまたは少なくとも15個連続したヌクレオチド)のセグメントが、配列番号8と最適にアラインメントした場合、配列番号8(HSD17B13転写産物E)のエクソン3'内の領域、配列番号8のエクソン3とエクソン3'との境界にまたがる領域、または配列番号8のエクソン3'とエクソン4との境界にまたがる領域と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、エクソン3および3'のそれぞれまたはエクソン3'および4のそれぞれに、HSD17B13転写産物の他の特徴(例えば、エクソン3と4との境界)と区別されるのに十分な数のヌクレオチドを含むであろうことが理解される。例えば、エクソン3'の領域は、エクソン3'全体を含み得る。必要に応じて、単離された核酸は、転写産物H(またはその断片またはホモログ)には存在しない、転写産物E(またはその断片またはホモログ)由来のセグメント(例えば、少なくとも15個連続したヌクレオチド)をさらに含む。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、連続したヌクレオチド(例えば、少なくとも5個連続したヌクレオチド、少なくとも10個連続したヌクレオチドまたは少なくとも15個連続したヌクレオチド)のセグメントが、配列番号8と最適にアラインメントした場合、配列番号8(HSD17B13転写産物E)のエクソン6とエクソン7

10

20

30

40

50

との境界にまたがる領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である、上記の単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、エクソン 6 および 7 のそれそれに、HSD17B13 転写産物の他の特徴（特に、転写産物 H のエクソン 6 の 3' 末端の追加的なグアニン）と区別されるのに十分な数のヌクレオチドを含むであろうことが理解される。例えば、領域は、配列番号 8 のエクソン 6 および 7 の全体を含み得る。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号 8 に記載の配列（HSD17B13 転写産物 E）と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である配列を含み、配列番号 16 に記載の配列（HSD17B13 アイソフォーム E）を含む HSD17B13 タンパク質をコードする。

10

#### 【0173】

一例として、単離された核酸は、エクソン 3' 内の領域、エクソン 3 とエクソン 3' との境界にまたがる領域、またはエクソン 3' とエクソン 4 との境界にまたがる領域を含む配列番号 8 の少なくとも 15 個連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも 20 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 30 個連続したヌクレオチド）を含み得、必要に応じて、配列番号 8 のエクソン 3' 全体を含み、必要に応じて、配列番号 8 の配列全体を含む。

#### 【0174】

転写産物 A（またはその断片またはホモログ）には存在しない、転写産物 F（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメント（例えば、少なくとも 15 個連続したヌクレオチド）を含む単離された核酸も本明細書において提示される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。転写産物 F（配列番号 9）は、転写産物 A と比較して、エクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーを含み、リードスルーは、HSD17B13 rs72613567 バリアント遺伝子に存在するチミンの挿入を含む。したがって、HSD17B13 タンパク質の全部または一部をコードする少なくとも 15 個連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも 20 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 30 個連続したヌクレオチド）を含み、連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド）のセグメントが、配列番号 9 と最適にアライメントした場合、配列番号 9（HSD17B13 転写産物 F）のイントロン 6 へのリードスルー内の領域または配列番号 9 のイントロン 6 へのリードスルーと残りのエクソン 6 との境界にまたがる領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である、単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、リードスルーに、リードスルーが HSD17B13 転写産物の他の特徴（例えば、他の HSD17B13 転写産物のエクソン 6 と 7 との境界）と区別されるのに十分な数のヌクレオチドを含むであろうことが理解される。必要に応じて、連続したヌクレオチドは、転写産物 F'（配列番号 246）には存在しない、転写産物 F に存在する配列（すなわち、チミンの挿入）を含む。転写産物 F' はまた、転写産物 A と比較して、エクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーも含むが、リードスルーは、HSD17B13 rs72613567 バリアント遺伝子に存在するチミンの挿入を含まない。例えば、領域は、配列番号 9 のイントロン 6 へのリードスルー全体であり得る。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号 9 に記載の配列（HSD17B13 転写産物 F）と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である配列を含み、配列番号 17（HSD17B13 アイソフォーム F）に記載の配列を含む HSD17B13 タンパク質をコードする。

20

#### 【0175】

一例として、単離された核酸は、イントロン 6 へのリードスルー内の領域またはイントロン 6 へのリードスルーと残りのエクソン 6 との境界にまたがる領域を含む配列番号 9 の少なくとも 15 個連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも 20 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 30 個連続したヌクレオチド）を含み得、必要に応じて、イントロン 6 に記載の配列を含む HSD17B13 タンパク質をコードする。

30

#### 【0176】

一例として、単離された核酸は、イントロン 6 へのリードスルー内の領域またはイントロン 6 へのリードスルーと残りのエクソン 6 との境界にまたがる領域を含む配列番号 9 の少なくとも 15 個連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも 20 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 30 個連続したヌクレオチド）を含み得、必要に応じて、イントロン 6 に記載の配列を含む HSD17B13 タンパク質をコードする。

40

#### 【0177】

一例として、単離された核酸は、イントロン 6 へのリードスルー内の領域またはイントロン 6 へのリードスルーと残りのエクソン 6 との境界にまたがる領域を含む配列番号 9 の少なくとも 15 個連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも 20 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 30 個連続したヌクレオチド）を含み得、必要に応じて、イントロン 6 に記載の配列を含む HSD17B13 タンパク質をコードする。

50

へのリードスルー全体を含み、必要に応じて、配列番号 9 の配列全体を含む。

【 0 1 7 6 】

転写産物 A (またはその断片またはホモログ) には存在しない、転写産物 F' (またはその断片またはホモログ) に存在するセグメント (例えば、少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) を含む単離された核酸も本明細書において提示される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。転写産物 F' (配列番号 246) は、転写産物 A と比較して、エクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーを含み、リードスルーは、HSD17B13 rs72613567 バリアント遺伝子に存在するチミンの挿入を含まない。したがって、HSD17B13 タンパク質の全部または一部をコードする少なくとも 15 個連続したヌクレオチド (例えば、少なくとも 20 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 30 個連続したヌクレオチド) を含み、連続したヌクレオチド (例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) のセグメントが、配列番号 246 と最適にアラインメントした場合、配列番号 246 (HSD17B13 転写産物 F') のイントロン 6 へのリードスルー内の領域または配列番号 246 のイントロン 6 へのリードスルーと残りのエクソン 6 との境界にまたがる領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である、単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、リードスルーに、リードスルーが HSD17B13 転写産物の他の特徴 (例えば、他の HSD17B13 転写産物のエクソン 6 と 7 との境界) と区別されるのに十分な数のヌクレオチドを含むであろうことが理解される。必要に応じて、連続したヌクレオチドは、転写産物 F (配列番号 9) には存在しない、転写産物 F' に存在する配列を含む。転写産物 F のリードスルーは、HSD17B13 rs72613567 バリアント遺伝子に存在するチミンの挿入を含むが、転写産物 F' のリードスルーはそれを含まない。例えば、領域は、配列番号 246 のイントロン 6 へのリードスルー全体であり得る。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号 246 に記載の配列 (HSD17B13 転写産物 F') と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一である配列を含み、配列番号 247 に記載の配列 (HSD17B13 アイソフォーム F') を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる HSD17B13 タンパク質をコードする。

【 0 1 7 7 】

一例として、単離された核酸は、イントロン 6 へのリードスルー内の領域またはイントロン 6 へのリードスルーと残りのエクソン 6 との境界にまたがる領域を含む配列番号 246 の少なくとも 15 個連続したヌクレオチド (例えば、少なくとも 20 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 30 個連続したヌクレオチド) を含み得、必要に応じて、イントロン 6 へのリードスルー全体を含み、必要に応じて、配列番号 246 の配列全体を含む。

【 0 1 7 8 】

転写産物 A (またはその断片またはホモログ) には存在しない、転写産物 C (またはその断片またはホモログ) に存在するセグメント (例えば、少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) を含む単離された核酸も本明細書において提示される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。転写産物 C (配列番号 6) では、転写産物 A と比較して、エクソン 6 が欠けている (すなわち、転写産物 C は、転写産物 A には存在しないエクソン 5 とエクソン 7 との境界を含む)。したがって、HSD17B13 タンパク質の全部または一部をコードする少なくとも 15 個連続したヌクレオチド (例えば、少なくとも 20 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 30 個連続したヌクレオチド) を含み、連続したヌクレオチド (例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) のセグメントが、配列番号 6 と最適にアラインメントした場合、配列番号 6 (HSD17B13 転写産物 C) のエクソン 5 とエクソン 7 との境界にまたがる領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 9

10

20

30

40

50

8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である、単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、エクソン 5 および 7 のそれぞれに、H S D 1 7 B 1 3 転写産物の他の特徴（例えば、他の H S D 1 7 B 1 3 転写産物のエクソン 5 と 6 との境界またはエクソン 6 と 7 との境界）と区別されるのに十分な数のヌクレオチドを含むであろうことが理解される。例えば、領域は、配列番号 6 のエクソン 5 および 7 の全体を含み得る。必要に応じて、単離された核酸は、配列番号 6 に記載の配列（H S D 1 7 B 1 3 転写産物 C）と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一である配列を含み、配列番号 1 4 に記載の配列（H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C）を含む H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする。

## 【 0 1 7 9 】

10

一例として、単離された核酸は、エクソン 5 とエクソン 7 との境界にまたがる領域を含む配列番号 6 の少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも 2 0 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 3 0 個連続したヌクレオチド）を含み得、必要に応じて、配列番号 6 のエクソン 5 および 7 の全体を含み、必要に応じて、配列番号 6 の配列全体を含む。

## 【 0 1 8 0 】

( 4 ) c D N A およびバリアント H S D 1 7 B 1 3 転写産物とハイブリダイズする核酸  
転写産物 A ~ H のいずれか 1 つと最適にアラインメントした場合、転写産物 A ~ H ( それ  
ぞれ配列番号 4 ~ 1 1 )、特に転写産物 C ~ H のいずれか 1 つに対応する m R N A 転写産  
物または c D N A のセグメントとハイブリダイズする核酸も提供される。具体的な非限定  
的な例を以下に提示する。そのような単離された核酸は、例えば、プライマー、プローブ  
、アンチセンス R N A 、 s i R N A 、または s h R N A として有用であり得る。

20

## 【 0 1 8 1 】

単離された核酸がハイブリダイズし得るセグメントは、例えば、H S D 1 7 B 1 3 タンパ  
ク質をコードする核酸の少なくとも 5 個、少なくとも 1 0 個、または少なくとも 1 5 個連  
続したヌクレオチドを含み得る。単離された核酸がハイブリダイズし得るセグメントは、  
例えば、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の少なくとも 2 0 個、2 5 個、3  
0 個、3 5 個、4 0 個、4 5 個、5 0 個、5 5 個、6 0 個、6 5 個、7 0 個、7 5 個、8  
0 個、7 5 個、9 0 個、9 5 個、1 0 0 個、2 0 0 個、3 0 0 個、4 0 0 個、5 0 0 個、  
6 0 0 個、7 0 0 個、8 0 0 個、9 0 0 個、1 0 0 0 個、または 2 0 0 0 個連続したヌク  
レオチドを含み得る。あるいは、単離された核酸がハイブリダイズし得るセグメントは、  
例えば、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の最大 2 0 個、2 5 個、3 0 個、  
3 5 個、4 0 個、4 5 個、5 0 個、5 5 個、6 0 個、6 5 個、7 0 個、7 5 個、8 0 個、  
7 5 個、9 0 個、9 5 個、1 0 0 個、2 0 0 個、3 0 0 個、4 0 0 個、5 0 0 個、6 0 0  
個、7 0 0 個、8 0 0 個、9 0 0 個、または 1 0 0 0 個連続したヌクレオチドであり得る。  
。例えば、セグメントは、約 1 5 ~ 1 0 0 ヌクレオチドの長さ、または約 1 5 ~ 3 5 ヌク  
レオチドの長さであり得る。

30

## 【 0 1 8 2 】

H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ( 配列番号 7 ) 、転写産物 G ( 配列番号 1 0 ) 、および転写  
産物 H ( 配列番号 1 1 ) は、エクソン 6 の 3' 末端にグアニンの挿入を含み、その結果、転  
写産物 A と比較してエクソン 7 におけるフレームシフトおよびエクソン 7 の中途短縮が生  
じている。したがって、転写産物 A ( またはその断片またはホモログ ) には存在しない、  
転写産物 D 、 G 、および H ( またはその断片またはホモログ ) に存在するセグメントとハイ  
ブリダイズする領域（例えば、少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）を含む単離さ  
れた核酸が本明細書において提示される。そのような領域は、転写産物の配列を比較する  
ことによって容易に同定することができる。例えば、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコー  
ドする核酸の少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチドとハイブリダイズする単離された核  
酸であって、連続したヌクレオチドが、配列番号 7 と最適にアラインメントした場合、配  
列番号 7 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ) のエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる  
領域と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少

40

50

なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるセグメント（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 1 0 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）を含み、セグメントが、配列番号 7 のエクソン 6 の 3' 末端の残基 8 7 8 に対応する残基にグアニンを含む（すなわち、転写産物 A と比べて、エクソン 7 の出発点のグアニンに加えて、エクソン 6 の 3' 末端にグアニンが挿入されている）、単離された核酸が本明細書において提示される。あるいは、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチドであるセグメントとハイブリダイズする単離された核酸であって、連続したヌクレオチドが、配列番号 1 0 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 0 (H S D 1 7 B 1 3 転写産物 G) のエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる領域と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるセグメント（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 1 0 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）を含み、セグメントが、配列番号 1 0 のエクソン 6 の 3' 末端の残基 7 7 0 に対応する残基にグアニンを含む（すなわち、転写産物 B と比べて、エクソン 7 の出発点のグアニンに加えて、エクソン 6 の 3' 末端にグアニンが挿入されている）、単離された核酸が本明細書において提示される。あるいは、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチドとハイブリダイズする単離された核酸であって、連続したヌクレオチドが、配列番号 1 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 1 (H S D 1 7 B 1 3 転写産物 H) のエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる領域と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるセグメント（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 1 0 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）を含み、セグメントが、配列番号 1 1 のエクソン 6 の 3' 末端の残基 9 5 0 に対応する残基にグアニンを含む（すなわち、転写産物 E と比べて、エクソン 7 の出発点のグアニンに加えて、エクソン 6 の 3' 末端にグアニンが挿入されている）、単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、エクソン 6 および 7 のそれぞれの、グアニンの挿入が H S D 1 7 B 1 3 転写産物の他の特徴（例えば、転写産物 F におけるイントロン 6 へのリードスルーや転写産物 C におけるエクソン 6 の欠失）と区別されるのに十分な数のヌクレオチドとハイブリダイズするように設計されようことが理解される。

#### 【 0 1 8 3 】

一例として、セグメントは、配列番号 7 のエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる（すなわち、配列番号 7 の残基 8 7 8 のグアニンを含む）領域を含み得る。別の例として、セグメントは、配列番号 1 0 のエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる（すなわち、配列番号 1 0 の残基 7 7 0 のグアニンを含む）領域を含み得る。別の例として、セグメントは、配列番号 1 1 のエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる（すなわち、配列番号 1 1 の残基 9 5 0 のグアニンを含む）領域を含み得る。

#### 【 0 1 8 4 】

必要に応じて、単離された核酸は、転写産物 G（またはその断片またはホモログ）には存在しない、転写産物 D（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメントとハイブリダイズする領域（例えば、1 5 個連続したヌクレオチド）をさらに含み、単離された核酸は、転写産物 H（またはその断片またはホモログ）には存在しない、転写産物 D（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメントとハイブリダイズする領域をさらに含む。そのようなセグメントは、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、転写産物 H（またはその断片またはホモログ）には存在しない、転写産物 D（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメント（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 1 0 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）は、転写産物 H と区別されるように、配列番号 7 と最適にアラインメントした場合、配列番号 7 (H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D) のエクソン 3 と 4 との境界にまたがる領域と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少な

10

20

30

40

50

くとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一であってよい。同様に、転写産物 G (またはその断片またはホモログ) には存在しない、転写産物 D (またはその断片またはホモログ) に存在するセグメント (例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) は、転写産物 G と区別されるように、配列番号 7 と最適にアラインメントした場合、配列番号 7 (HSD17B13 転写産物 D) のエクソン 2 内の領域、配列番号 7 のエクソン 1 とエクソン 2 との境界にまたがる領域、または配列番号 7 のエクソン 2 とエクソン 3 との境界にまたがる領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一であってよい。

## 【0185】

10

転写産物 D と同様に、転写産物 H (配列番号 11) は、転写産物 A と比較して、エクソン 6 の 3' 末端にグアニンの挿入を含む。転写産物 H は、転写産物 A および転写産物 D と比較して、エクソン 3 と 4 との間に追加的なエクソンをさらに含む。したがって、転写産物 A (またはその断片またはホモログ) には存在しない、転写産物 D、G、および H (またはその断片またはホモログ) に存在するセグメントとハイブリダイズする領域を含むが、転写産物 H (またはその断片またはホモログ) には存在するが転写産物 D (またはその断片またはホモログ) には存在しないセグメントとハイブリダイズする領域 (例えば、少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) をさらに含む、上記の単離された核酸が本明細書において提示される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、セグメントは、配列番号 11 と最適にアラインメントした場合、配列番号 11 (HSD17B13 転写産物 H) のエクソン 3' 内の領域 (例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド)、配列番号 11 のエクソン 3 とエクソン 3' との境界にまたがる領域、または配列番号 11 のエクソン 3' とエクソン 4 との境界にまたがる領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であってよい。そのような核酸は、エクソン 3 および 3' のそれぞれまたはエクソン 3' および 4 のそれぞれの、HSD17B13 転写産物の他の特徴 (例えば、エクソン 3 と 4 との境界) と区別されるのに十分な数のヌクレオチドとハイブリダイズするように設計されようことが理解される。

## 【0186】

20

一例として、セグメントは、エクソン 3' 内にあるか、エクソン 3 とエクソン 3' との境界にまたがるか、またはエクソン 3' とエクソン 4 との境界にまたがる、配列番号 11 の領域を含み得る。

## 【0187】

30

転写産物 D と同様に、転写産物 G (配列番号 10) は、転写産物 A と比較して、エクソン 6 の 3' 末端にグアニンの挿入を含む。しかし、さらに、転写産物 G では、転写産物 A および転写産物 D と比較してエクソン 2 が欠けている (すなわち、転写産物 G は、転写産物 A および D には存在しないエクソン 1 とエクソン 3 との境界を含む)。したがって、転写産物 A (またはその断片またはホモログ) には存在しない、転写産物 D、G、および H (またはその断片またはホモログ) に存在するセグメントとハイブリダイズする領域を含むが、転写産物 G (またはその断片またはホモログ) には存在するが転写産物 D (またはその断片またはホモログ) には存在しないセグメントとハイブリダイズする領域 (例えば、少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) をさらに含む、上記の単離された核酸が本明細書において提示される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、セグメントは、配列番号 10 と最適にアラインメントした場合、配列番号 10 (HSD17B13 転写産物 G) のエクソン 1 とエクソン 3 との境界にまたがる領域 (例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であってよい。そのような核酸は、エクソン 1 および 3

40

50

のそれぞれの、H S D 1 7 B 1 3 転写産物の他の特徴（例えば、エクソン 1 と 2 との境界またはエクソン 2 と 3 との境界）と区別されるのに十分な数のヌクレオチドとハイブリダイズするように設計されようことが理解される。

【 0 1 8 8 】

一例として、セグメントは、エクソン 1 とエクソン 3 との境界にまたがる配列番号 1 0 の領域を含み得る。

【 0 1 8 9 】

転写産物 E（またはその断片またはホモログ）には存在するが、転写産物 A（またはその断片またはホモログ）には存在しない、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸のセグメントとハイブリダイズする領域（例えば、少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）を含む単離された核酸も提供される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。転写産物 E（配列番号 8）は、転写産物 A と比較して、エクソン 3 と 4 との間に追加的なエクソンを含む。したがって、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチドとハイブリダイズする単離された核酸であって、連続したヌクレオチドが、配列番号 8 と最適にアラインメントした場合、配列番号 8（H S D 1 7 B 1 3 転写産物 E）のエクソン 3' 内の領域（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 1 0 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）、配列番号 8 のエクソン 3 とエクソン 3' との境界にまたがる領域、または配列番号 8 のエクソン 3' とエクソン 4 との境界にまたがる領域と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるセグメントを含む、単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、エクソン 3 および 3' のそれぞれまたはエクソン 3' および 4 のそれぞれの、H S D 1 7 B 1 3 転写産物の他の特徴（例えば、エクソン 3 と 4 との境界）と区別されるのに十分な数のヌクレオチドとハイブリダイズするように設計されようことが理解される。

【 0 1 9 0 】

一例として、セグメントは、エクソン 3' 内にあるか、配列番号 8 のエクソン 3 とエクソン 3' との境界にまたがるか、またはエクソン 3' とエクソン 4 との境界にまたがる、配列番号 8 の領域を含み得る。

【 0 1 9 1 】

必要に応じて、単離された核酸は、転写産物 H（またはその断片またはホモログ）には存在しない、転写産物 E（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメントとハイブリダイズする領域（例えば、1 5 個連続したヌクレオチド）をさらに含む。そのようなセグメントは、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、転写産物 H（またはその断片またはホモログ）には存在しない、転写産物 E（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメント（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 1 0 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）は、転写産物 G と区別されるように、配列番号 8 と最適にアラインメントした場合、配列番号 8（H S D 1 7 B 1 3 転写産物 E）のエクソン 6 と 7 との境界にまたがる領域と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 同一であってよい。そのような核酸は、エクソン 6 および 7 のそれぞれの、H S D 1 7 B 1 3 転写産物の他の特徴（特に、転写産物 H のエクソン 6 の 3' 末端の追加的なグアニン）と区別されるのに十分な数のヌクレオチドとハイブリダイズするように設計されようことが理解される。

【 0 1 9 2 】

転写産物 F（またはその断片またはホモログ）には存在するが、転写産物 A（またはその断片またはホモログ）には存在しない、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸のセグメントとハイブリダイズする領域（例えば、少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）を含む単離された核酸も提供される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。転写産物 F（配列番号 9）は、転写産物 A と比

10

20

30

40

50

較して、エクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーを含む。したがって、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチドとハイブリダイズする単離された核酸であって、連続したヌクレオチドが、配列番号 9 と最適にアライメントした場合、配列番号 9 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 F ) のイントロン 6 へのリードスルー内の領域または配列番号 9 のイントロン 6 へのリードスルーと残りのエクソン 6 との境界にまたがる領域と少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % 同一であるセグメント ( 例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 1 0 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド ) を含む単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、リードスルー内の、リードスルーが H S D 1 7 B 1 3 転写産物の他の特徴 ( 例えば、他の H S D 1 7 B 1 3 転写産物のエクソン 6 と 7 との境界 ) と区別されるのに十分な数のヌクレオチドとハイブリダイズするように設計されようことが理解される。必要に応じて、連続したヌクレオチドは、転写産物 F ' ( 配列番号 2 4 6 ) には存在しない、転写産物 F に存在する配列 ( すなわち、チミンの挿入 ) を含む。転写産物 F ' はまた、転写産物 A と比較して、エクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーも含むが、リードスルーは、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアント遺伝子に存在するチミンの挿入を含まない。

【 0 1 9 3 】

一例として、セグメントは、イントロン 6 へのリードスルー内にあるか、またはイントロン 6 へのリードスルーと残りのエクソン 6 との境界にまたがる、配列番号 9 の領域を含み得る。

【 0 1 9 4 】

転写産物 F' (またはその断片またはホモログ) には存在するが、転写産物 A (またはその断片またはホモログ) には存在しない、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸のセグメントとハイブリダイズする領域 (例えば、少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) を含む単離された核酸も提供される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。転写産物 F' (配列番号 246) は、転写産物 A と比較して、エクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーレを含む。したがって、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の少なくとも 15 個連続したヌクレオチドとハイブリダイズする単離された核酸であって、連続したヌクレオチドが、配列番号 246 と最適にアラインメントした場合、配列番号 246 (H S D 1 7 B 1 3 転写産物 F') のイントロン 6 へのリードスルーレ内の領域または配列番号 246 のイントロン 6 へのリードスルーレと残りのエクソン 6 との境界にまたがる領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるセグメント (例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド) を含む、単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、リードスルーレ内の、リードスルーレが H S D 1 7 B 1 3 転写産物の他の特徴 (例えば、他の H S D 1 7 B 1 3 転写産物のエクソン 6 と 7 との境界) と区別されるのに十分な数のヌクレオチドとハイブリダイズするように設計されようことが理解される。必要に応じて、連続したヌクレオチドは、転写産物 F (配列番号 9) には存在しない、転写産物 F' に存在する配列を含む。転写産物 F のリードスルーレは、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアント遺伝子に存在するチミンの挿入を含むが、転写産物 F' のリードスルーレはそれを含まない。

【 0 1 9 5 】

一例として、セグメントは、イントロン 6 へのリードスルー内にあるか、またはイントロン 6 へのリードスルーと残りのエクソン 6 との境界にまたがる、配列番号 246 の領域を含み得る。

【 0 1 9 6 】

転写産物 C ( またはその断片またはホモログ ) には存在するが、転写産物 A ( またはその断片またはホモログ ) には存在しない、 H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の

セグメントとハイブリダイズする領域（例えば、少なくとも 15 個連続したヌクレオチド）を含む単離された核酸も提供される。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。転写産物 C（配列番号 6）では、転写産物 A と比較して、エクソン 6 が欠けている（すなわち、転写産物 C は、転写産物 A には存在しないエクソン 5 とエクソン 7 との境界を含む）。したがって、HSD17B13 タンパク質をコードする核酸の少なくとも 15 個連続したヌクレオチドとハイブリダイズする単離された核酸であって、連続したヌクレオチドが、配列番号 6 と最適にアラインメントした場合、配列番号 6（HSD17B13 転写産物 C）のエクソン 5 とエクソン 7 との境界にまたがる領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるセグメント（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド）を含む、単離された核酸が本明細書において提示される。そのような核酸は、エクソン 5 および 7 の、HSD17B13 転写産物の他の特徴（例えば、他の HSD17B13 転写産物のエクソン 5 と 6 との境界またはエクソン 6 と 7 との境界）と区別されるのに十分な数のヌクレオチドとハイブリダイズするように設計されようことが理解される。

#### 【0197】

一例として、セグメントは、エクソン 5 とエクソン 7 との境界にまたがる、配列番号 6 由来の領域を含み得る。

#### 【0198】

HSD17B13 タンパク質をコードする核酸の少なくとも 15 個連続したヌクレオチドとハイブリダイズする単離された核酸（例えば、アンチセンス RNA、siRNA、または shRNA）であって、連続したヌクレオチドが、HSD17B13 転写産物 D（配列番号 7）の領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるセグメント（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド）を含む、単離された核酸（例えば、アンチセンス RNA、siRNA、または shRNA）も本明細書において提示される。単離された核酸は、転写産物 A（またはその断片またはホモログ）には存在しない、転写産物 D（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメントとハイブリダイズする領域（例えば、少なくとも 15 個連続したヌクレオチド）を含み得る。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。HSD17B13 転写産物 D（配列番号 7）は、エクソン 6 の 3' 末端におけるグアニンの挿入を含み、その結果、転写産物 A（配列番号 4）と比較してエクソン 7 におけるフレームシフトおよびエクソン 7 の中途短縮が生じている。例えば、HSD17B13 タンパク質をコードする核酸の少なくとも 15 個連続したヌクレオチドとハイブリダイズする単離された核酸であって、連続したヌクレオチドが、配列番号 7 と最適にアラインメントした場合、配列番号 7（HSD17B13 転写産物 D）のエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる領域と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一であるセグメント（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 10 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 15 個連続したヌクレオチド）を含む、単離された核酸が本明細書において提示される。セグメントは、配列番号 7 のエクソン 6 の 3' 末端の残基 878 に対応する残基にグアニンを含み得る（すなわち、転写産物 A と比べて、エクソン 7 の出発点のグアニンに加えて、エクソン 6 の 3' 末端にグアニンが挿入されている）。そのような核酸は、エクソン 6 および 7 のそれぞれの、グアニンの挿入が HSD17B13 転写産物の他の特徴（例えば、転写産物 F におけるイントロン 6 へのリードスルーまたは転写産物 C におけるエクソン 6 の欠失）と区別されるのに十分な数のヌクレオチドとハイブリダイズするように設計されようことが理解される。

#### 【0199】

10

20

30

40

50

H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチドとハイブリダイズする単離された核酸（例えば、アンチセンス R N A 、 s i R N A 、または s h R N A ）であって、連続したヌクレオチドが、 H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A ( 配列番号 4 ) の領域と少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % 同一であるセグメント（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 1 0 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）を含む、単離された核酸（例えば、アンチセンス R N A 、 s i R N A 、または s h R N A ）も本明細書において提示される。単離された核酸は、転写産物 D ( またはその断片またはホモログ ) には存在しない、転写産物 A ( またはその断片またはホモログ ) に存在するセグメントとハイブリダイズする領域（例えば、少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）を含み得る。そのような領域は、転写産物の配列を比較することによって容易に同定することができる。 H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ( 配列番号 7 ) は、エクソン 6 の 3 ' 末端におけるグアニンの挿入を含み、その結果、転写産物 A ( 配列番号 4 ) と比較してエクソン 7 におけるフレームシフトおよびエクソン 7 の中途短縮が生じている。例えば、 H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチドとハイブリダイズする単離された核酸であって、連続したヌクレオチドが、配列番号 4 と最適にアラインメントした場合、配列番号 4 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A ) のエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる領域と少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % 同一であるセグメント（例えば、少なくとも 5 個連続したヌクレオチド、少なくとも 1 0 個連続したヌクレオチドまたは少なくとも 1 5 個連続したヌクレオチド）を含む、単離された核酸が本明細書において提示される。  
10

#### 【 0 2 0 0 】

##### （ 5 ）ベクター

本明細書に開示される核酸のいずれかおよび異種核酸を含むベクターも提供される。ベクターは、核酸を運搬することが可能なウイルスまたは非ウイルスベクターであってよい。一部の場合では、ベクターは、プラスミド（例えば、追加的な D N A セグメントをライゲーションすることができる環状二本鎖 D N A ）であってよい。一部の場合では、ベクターは、ウイルスベクターであってよく、追加的な D N A セグメントをウイルスゲノム内にライゲーションすることができる。一部の場合では、ベクターは、それが導入された宿主細胞において自律的に複製することができる（例えば、細菌複製開始点を有する細菌ベクターおよびエピソーム性哺乳動物ベクター）。他の場合では、ベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノムに組み込まれることが可能であり、それにより、宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、ある特定のベクターは、それらが作動可能に連結した遺伝子の発現を方向付けることができる。そのようなベクターは、「組換え発現ベクター」または「発現ベクター」と称され得る。そのようなベクターはまた、本明細書の他の箇所で開示される標的化ベクター（すなわち、外因性ドナー配列）の場合もある。  
20

#### 【 0 2 0 1 】

一部の場合では、開示される遺伝子バリエントをコードする核酸を発現ベクターに遺伝子が転写および翻訳調節配列などの必要な発現調節配列に作動可能に連結するように挿入することにより、開示される遺伝子バリエントによってコードされるタンパク質を発現させる。発現ベクターとしては、例えば、プラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ A A V ）、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルスなどの植物ウイルス、コスミド、 Y A C 、 E B V 由来エピソームなどを挙げることができる。一部の例では、開示される遺伝子バリエントを含む核酸をベクター内にベクター内の転写および翻訳調節配列が遺伝子バリエントの転写および翻訳を制御するというそれらの意図された機能を果たすようにライゲーションすることができる。発現ベクターおよび発現調節配列は、使用される発現宿主細胞に適合するように選択される。開示される遺伝子バリエントを含む核酸配列は、別々のベクターに挿入することもでき、同じ発現ベクター  
30

に挿入することもできる。開示される遺伝子バリエントを含む核酸配列は、標準の方法（例えば、開示される遺伝子バリエントを含む核酸の相補的な制限部位とベクターのライゲーション、または制限部位が存在しない場合には平滑末端ライゲーション）によって発現ベクターに挿入することができる。

#### 【0202】

開示される遺伝子バリエントを含む核酸配列に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞における遺伝子バリエントの発現を調節する制御配列を有し得る。制御配列の選択を含めた発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選出、所望のタンパク質の発現のレベルなどの因子に依存し得る。哺乳動物宿主細胞での発現のために好ましい制御配列としては、例えば、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を方向付けるウイルスエレメント、例えば、レトロウイルスLTR、サイトメガロウイルス(CMV)（例えば、CMVプロモーター／エンハンサー）、シミアンウイルス40(SV40)（例えば、SV40プロモーター／エンハンサー）、アデノウイルス、（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP)）、ポリオーマに由来するプロモーターおよび／またはエンハンサーならびにネイティブな免疫グロブリンおよびアクチンプロモーターなどの強力な哺乳動物プロモーターを挙げることができる。ウイルス制御エレメント、およびその配列に関するさらなる説明は、それそれが、あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,168,062号；同第4,510,245号；および同第4,968,615号に提示されている。ポリペプチドを細菌細胞または真菌細胞（例えば、酵母細胞）において発現させる方法も周知である。

10

20

#### 【0203】

開示される遺伝子バリエントを含む核酸配列および制御配列に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を制御する配列（例えば、複製開始点）および選択性マーカー遺伝子などの追加的な配列を有し得る。選択性マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にすることができる（例えば、それそれが、あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,399,216号；同第4,634,665号；および同第5,179,017号を参照されたい）。例えば、選択性マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞にG418、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与することができる。例示的な選択性マーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子(dhfr-宿主細胞においてメトトレキサート選択／増幅を用いて使用するため)、neo遺伝子(G418選択のため)、およびグルタミン酸シンテターゼ(GS)遺伝子が挙げられる。

30

#### 【0204】

##### B. タンパク質

単離されたHSD17B13タンパク質およびその断片、特に、HSD17B13 rs72613567バリエントによって生じるHSD17B13タンパク質およびその断片が本明細書に開示される。

#### 【0205】

本明細書に開示される単離されたタンパク質は、天然に存在するHSD17B13タンパク質のアミノ酸配列を含む場合もあり、天然に存在しない配列を含む場合もある。一例では、天然に存在しない配列は、天然に存在しない配列と、保存的アミノ酸置換に起因して異なり得る。例えば、配列は、保存的アミノ酸置換を除いて同一であり得る。

40

#### 【0206】

本明細書に開示される単離されたタンパク質は、異種ポリペプチドまたは異種分子または標識と連結または融合することができ、その多数の例は、本明細書の他の箇所で開示される。例えば、タンパク質を、安定性の増大または低減をもたらす異種ポリペプチドと融合することができる。融合したドメインまたは異種ポリペプチドは、タンパク質のN末端、C末端、または内部に位置し得る。融合パートナーは、例えば、Tヘルパーエピトープの提供を補助し得るか（免疫学的融合パートナー）、またはタンパク質をネイティブな組換

50

えタンパク質よりも高い収率で発現させるのに役立ち得る（発現エンハンサー）。ある特定の融合パートナーは、免疫および発現の両方を増強する融合パートナーである。他の融合パートナーは、ポリペプチドの溶解性が増大するように、またはポリペプチドを所望の細胞内区画にターゲティングすることが可能になるように選択することができる。さらに別の融合パートナーとして、ポリペプチドの精製を容易にするアフィニティータグが挙げられる。

#### 【0207】

融合タンパク質は、異種分子と直接融合することもでき、ペプチドリンカーなどのリンカーを介して異種分子と連結することもできる。適切なペプチドリンカー配列は、例えば、以下の因子に基づいて選択することができる：（1）柔軟な広がったコンフォメーションをとることができること；（2）第1および第2のポリペプチド上の機能的なエピトープと相互作用し得る二次構造をとることができないこと；および（3）ポリペプチドの機能的なエピトープと反応し得る疎水性または荷電残基がないこと。例えば、ペプチドリンカー配列は、Gly、AsnおよびSer残基を含有し得る。ThrおよびAlaなどの他の中性付近のアミノ酸もリンカー配列に使用することができる。リンカーとして有用に使用することができるアミノ酸配列としては、それぞれが、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Marateaら（1985年）Gene、40巻：39～46頁；Murphyら（1986年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA、83巻：8258～8262頁；米国特許第4,935,233号；および米国特許第4,751,180号に開示されているものが挙げられる。リンカー配列は、一般に、例えば、1～約50アミノ酸の長さであつてよい。リンカー配列は、一般に、第1および第2のポリペプチドが、機能的ドメインを分離し、立体的干渉を防止するために使用することができる非必須N末端アミノ酸領域を有する場合には必要ない。

10

#### 【0208】

タンパク質を細胞透過性ドメインに作動可能に連結することもできる。例えば、細胞透過性ドメインは、HIV-1 TATタンパク質、ヒトB型肝炎ウイルス由来のTLR細胞透過性モチーフ、MPG、Pep-1、VP22、単純ヘルペスウイルス由来の細胞透過性ペプチド、またはポリアルギニンペプチド配列に由来してよい。例えば、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2014/089290を参考されたい。細胞透過性ドメインは、タンパク質のN末端、C末端、またはタンパク質内の任意の場所に位置し得る。

20

#### 【0209】

タンパク質を蛍光タンパク質、精製タグ、またはエピトープタグなどの追跡または精製をしやすくするための異種ポリペプチドに作動可能に連結することもできる。蛍光タンパク質の例としては、緑色蛍光タンパク質（例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、eGFP、Emerald、Azami Green、Monomeric Azami Green、CopGFP、AcGFP、ZsGreen1）、黄色蛍光タンパク質（例えば、YFP、eYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow）、青色蛍光タンパク質（例えば、eBFP、eBFP2、Azurite、mKalama1、GFPuv、Sapphire、T-sapphire）、シアン蛍光タンパク質（例えば、eCFP、Cerulean、Cypet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan）、赤色蛍光タンパク質（例えば、mKate、mKate2、mPlum、DsRed单量体、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRasberry、mStrawberry、Jred）、オレンジ蛍光タンパク質（例えば、mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato）、および任意の他の適切な蛍光タンパク質が挙げられる。タグの例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、キチン結合タンパク質（CBP）、マルトース結合タンパク質、

30

40

50

チオレドキシン( TRX )、ポリ( NAP )、タンデムアフィニティー精製( TAP )タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、赤血球凝集素( HA )、nus、Softag1、Softag3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、ヒスチジン( His )、ビオチンカルボキシリル担体タンパク質( BCCP )、およびカルモジュリンが挙げられる。

【0210】

本明細書の単離されたタンパク質は、非天然または修飾アミノ酸またはペプチド類似体も含み得る。例えば、天然に存在するアミノ酸とは異なる機能的置換基を有するD-アミノ酸またはアミノ酸が多数存在する。天然に存在するペプチドの逆の立体異性体、ならびにペプチド類似体の立体異性体が開示される。これらのアミノ酸は、tRNA分子に選択されたアミノ酸を負荷し、例えばアンバーコドンを利用する遺伝子構築物を工学的に作出して、類似体アミノ酸をペプチド鎖に部位特異的に挿入することによってポリペプチド鎖に容易に組み入れることができる( Thorsonら( 1991年 ) Methods Molec. Biol.、77巻: 43~73頁; Zoller( 1992年 ) Current Opinion in Biotechnology 、3巻: 348~354頁; Ibba、( 1995年 ) Biotechnology & Genetic Engineering Reviews、13巻: 197~216頁; Cahillら( 1989年 ) TIBS、14巻( 10号 ): 400~403頁; Benner( 1993年 ) TIB Tech、12巻: 158~163頁; ならびにIbbaおよびHennecke( 1994年 ) Biotechnology、12巻: 678~682頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる)。

10

【0211】

ペプチドと似ているが、天然のペプチド連結によって接続されていない分子を作出することができる。例えば、アミノ酸またはアミノ酸類似体の連結は、CH<sub>2</sub>NH- - - - - 、 - - CH<sub>2</sub>S- - - - - 、 - - CH<sub>2</sub>- - - - - 、 - - CH=CH- - (シスおよびトランス)、 - - COCH<sub>2</sub>- - - - - 、 - - CH(OH)CH<sub>2</sub>- - - - - 、および - - CHH<sub>2</sub>SO- - - - - を含み得る( 例えば、それぞれがあらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれるSpatola, A.F.、Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins、B. Weinstein編、Marcel Dekker、New York、267頁( 1983年 ) ; Spatola, A. F.、Vega Data( 1983年3月 )、1巻、3号、Peptide Backbone Modifications (general review) ; Morley( 1994年 ) Trends Pharm Sci、15巻( 12号 ): 463~468頁; Hudsonら( 1979年 ) Int J Pept Prot Res 、14巻: 177~185頁; Spatolaら( 1986年 ) Life Sci、38巻: 1243~1249頁; Hann( 1982年 ) Chem. Soc Perkin Trans. I 307~314頁 ; Almquistら( 1980年 ) J. Med. Chem.、23巻: 1392~1398頁; Jennings-Whiteら( 1982年 ) Tetrahedron Lett 23巻: 2533頁 ) ; Szelkeら、欧洲出願EP45665CA( 1982年 ) : 97巻: 39405頁( 1982年 ) ; Hollandら( 1983年 ) Tetrahedron Lett、24巻: 4401~4404頁 ; およびHubry( 1982年 ) Life Sci、31巻: 189~199頁を参照されたい)。例えば、b-アラニン、アミノ酪酸など、ペプチド類似体は、結合原子間に1つよりも多くの原子を有し得る。

20

【0212】

アミノ酸類似体およびペプチド類似体は、多くの場合、より経済的な产生、より大きな化学的安定性、増強された薬理学的性質( 半減期、吸收、効力、有効性など )、変更された特異性( 例えば、広域スペクトルの生物活性 )、低減した抗原性、およびその他の望ましい特性などの増強されたまたは望ましい特性を有する。

30

【0213】

D-アミノ酸はペプチダーゼなどによって認識されないので、D-アミノ酸を使用してより安定なペプチドを生成することができる。コンセンサス配列の1つまたは複数のアミノ酸の同じ型のD-アミノ酸での系統的置換( 例えば、L-リシンの代わりにD-リシン )を使用してより安定なペプチドを生成することができる。システイン残基を使用して、2

40

50

つまたはそれよりも多くのペプチドを環化または付着し合わせることができる。これは、ペプチドを特定のコンフォメーションに制約するのに有益であり得る（例えば、その全体があらゆる目的に関して参照により本明細書に組み込まれるRizoおよびGiersch（1992年）Ann. Rev. Biochem.、61巻：387頁を参照されたい）。

【0214】

本明細書に開示されるタンパク質のいずれかをコードする核酸も本明細書に開示される。これは、特定のポリペプチド配列に関連する全ての縮重配列（すなわち、1つの特定のポリペプチド配列をコードする配列を有する全ての核酸ならびにタンパク質配列の開示されるバリエントおよび誘導体をコードする縮重核酸を含めた全ての核酸）を含む。したがって、特定の核酸配列それぞれを本明細書に記載することはできないが、ありとあらゆる配列が開示されるポリペプチド配列を通して実際に本明細書に開示され、記載される。

10

【0215】

本明細書に開示される単離されたポリペプチドまたはタンパク質、および単離されたポリペプチドの安定性を増大させる担体を含む組成物も本明細書に開示される。そのような担体の非限定的な例としては、ポリ（乳酸）（PLA）マイクロスフェア、ポリ（D,L-乳酸・ポリグリコール酸共重合体）（PLGA）マイクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コクリエート、および脂質微小管が挙げられる。

【0216】

（1）HSD17B13タンパク質および断片

単離されたHSD17B13タンパク質およびその断片、特に、HSD17B13 rs 72613567バリエントによって生じるHSD17B13タンパク質およびその断片、または特に、HSD17B13アイソフォームC、D、E、F、F'、G、およびHが本明細書に開示される。そのようなタンパク質としては、例えば、HSD17B13アイソフォームC、D、E、F、F'、G、もしくHまたはその断片の少なくとも5個、6個、8個、10個、12個、14個、15個、16個、18個、20個、22個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、150個、200個、250個、または300個連続したアミノ酸を含む単離されたポリペプチドを挙げることができる。集団内の遺伝子配列およびそのような遺伝子によってコードされるタンパク質は、一塩基多型などの多型に起因して変動し得ることが理解される。各HSD17B13アイソフォームについて本明細書において提示される配列は、単に例示的な配列である。他の配列も可能である。例えば、単離されたポリペプチドは、それぞれアイソフォームC、D、E、F、F'、G、またはHと最適にアラインメントした場合、HSD17B13アイソフォームC、D、E、F、F'、G、またはHと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるアミノ酸配列（例えば、連続したアミノ酸の配列）を含む。必要に応じて、単離されたポリペプチドは、HSD17B13アイソフォームC、D、E、F、F'、G、またはHと同一である配列を含む。

20

30

【0217】

一例として、単離されたポリペプチドは、アイソフォームA（またはその断片またはホモログ）には存在しない、アイソフォームD、G、およびH（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメント（例えば、少なくとも8個連続したアミノ酸）を含み得る。そのような領域は、アイソフォームの配列を比較することによって容易に同定することができる。アイソフォームD、G、およびHにおいてエクソン7によってコードされる領域は、アイソフォームAにおいてエクソン7によってコードされる領域と比較してフレームシフトし、短縮されている。したがって、そのような単離されたポリペプチドは、HSD17B13タンパク質の少なくとも5個、6個、8個、10個、12個、14個、15個、16個、18個、20個、22個、24個、25個、30個、35個、40個、45個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、150個、または200個連続したアミノ酸（例えば、HSD17B13タンパク質の少なくとも8個連続したアミノ酸、少なくとも10個連続したアミノ酸、または少なくとも15個連続したアミノ酸）を含み

40

50

得、ここで、連続したアミノ酸（例えば、少なくとも3個連続したアミノ酸、少なくとも5個連続したアミノ酸、少なくとも8個連続したアミノ酸、少なくとも10個連続したアミノ酸、または少なくとも15個連続したアミノ酸）のセグメントは、単離されたポリペプチドをそれぞれ配列番号15、18、または19と最適にアラインメントした場合、配列番号15（HSD17B13アイソフォームD）、配列番号18（HSD17B13アイソフォームG）、または配列番号19（HSD17B13アイソフォームH）におけるエクソン7によってコードされる領域の少なくとも一部分を含むセグメントと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である。

## 【0218】

10  
そのような単離されたポリペプチドは、アイソフォームG（またはその断片またはホモログ）には存在しない、アイソフォームD（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメントをさらに含み得、アイソフォームH（またはその断片またはホモログ）には存在しない、アイソフォームD（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメントをさらに含み得る。そのような領域は、アイソフォームの配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、そのような単離されたポリペプチドは、アイソフォームHと区別されるように、配列番号15と最適にアラインメントした場合、配列番号15（HSD17B13アイソフォームD）のエクソン3によってコードされる領域とエクソン4によってコードされる領域との境界にまたがるセグメントと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、連続したアミノ酸（例えば、少なくとも3個連続したアミノ酸、少なくとも5個連続したアミノ酸、少なくとも8個連続したアミノ酸、少なくとも10個連続したアミノ酸、または少なくとも15個連続したアミノ酸）のセグメントを含み得る。同様に、そのような単離されたポリペプチドは、アイソフォームGと区別されるように、配列番号15と最適にアラインメントした場合、配列番号15（HSD17B13アイソフォームD）のエクソン2によってコードされる領域内のセグメント、配列番号15のエクソン1によってコードされる領域とエクソン2によってコードされる領域との境界にまたがるセグメント、または配列番号15のエクソン2によってコードされる領域とエクソン3によってコードされる領域との境界にまたがるセグメントと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、連続したアミノ酸（例えば、少なくとも3個連続したアミノ酸、少なくとも5個連続したアミノ酸、少なくとも8個連続したアミノ酸、少なくとも10個連続したアミノ酸、または少なくとも15個連続したアミノ酸）のセグメントを含み得る。

## 【0219】

アイソフォームDと同様に、アイソフォームHにおいてエクソン7によってコードされる領域（配列番号19）は、アイソフォームAと比較してフレームシフトし、短縮されている。しかし、さらに、アイソフォームHは、アイソフォームAおよびDと比較して、エクソン3と4との間の追加的なエクソン（エクソン3'）によってコードされる領域を含む。したがって、そのような単離されたポリペプチドは上記の通りであり得、アイソフォームA（またはその断片またはホモログ）には存在しない、アイソフォームD、G、およびH（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメントを含むが、アイソフォームD（またはその断片またはホモログ）には存在しない、アイソフォームH（またはその断片またはホモログ）に由来するセグメント（例えば、少なくとも8個連続したアミノ酸）をさらに含む。そのような領域は、アイソフォームの配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、そのような単離されたポリペプチドは、単離されたポリペプチドを配列番号19と最適にアラインメントした場合、配列番号19（HSD17B13アイソフォームH）のエクソン3'によってコードされる領域の少なくとも一部分を含むセグメントと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である連続したアミノ酸（例えば、少なくとも3個連続したアミノ酸、少なくとも5個連続したアミノ酸、少なくとも

10

20

30

40

50

も 8 個連続したアミノ酸、少なくとも 10 個連続したアミノ酸、または少なくとも 15 個連続したアミノ酸) のセグメントをさらに含み得る。

#### 【 0 2 2 0 】

アイソフォーム D と同様に、アイソフォーム G においてエクソン 7 によってコードされる領域 (配列番号 18) は、アイソフォーム A と比較してフレームシフトし、短縮されている。しかし、さらに、アイソフォーム G は、アイソフォーム A および D と比較して、エクソン 2 によってコードされる領域が欠けており、したがって、イソフォーム A および D には存在しないエクソン 1 とエクソン 3 との境界を含む。したがって、そのような単離されたポリペプチドは、上記の通りであり得、アイソフォーム A (またはその断片またはホモログ) には存在しない、アイソフォーム D、G、および H (またはその断片またはホモログ) に存在するセグメントを含むが、アイソフォーム D (またはその断片またはホモログ) には存在しない、アイソフォーム G (またはその断片またはホモログ) に由来するセグメント (例えば、少なくとも 8 個連続したアミノ酸) をさらに含む。そのような領域は、アイソフォームの配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、そのような単離されたポリペプチドは、単離されたポリペプチドを配列番号 18 と最適にアライメントした場合、配列番号 18 (H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム G) のエクソン 1 によってコードされる領域とエクソン 3 によってコードされる領域との境界にまたがるセグメントと少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である連続したアミノ酸 (例えば、少なくとも 3 個連続したアミノ酸、少なくとも 5 個連続したアミノ酸、少なくとも 8 個連続したアミノ酸、少なくとも 10 個連続したアミノ酸、または少なくとも 15 個連続したアミノ酸) のセグメントをさらに含み得る。

10

#### 【 0 2 2 1 】

アイソフォーム A (またはその断片またはホモログ) には存在しない、アイソフォーム E (またはその断片またはホモログ) に存在するセグメント (例えば、少なくとも 8 個連続したアミノ酸) を含む単離されたポリペプチドも本明細書において提示される。アイソフォーム E は、アイソフォーム A には存在しない、エクソン 3 と 4 との間の追加的なエクソン (エクソン 3') によってコードされる領域を含む。そのような領域は、アイソフォームの配列を比較することによって容易に同定することができる。したがって、単離されたポリペプチドは、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の少なくとも 5 個、6 個、8 個、10 個、1 2 個、1 4 個、1 5 個、1 6 個、1 8 個、2 0 個、2 2 個、2 4 個、2 5 個、3 0 個、3 5 個、4 0 個、4 5 個、5 0 個、6 0 個、7 0 個、8 0 個、9 0 個、1 0 0 個、1 5 0 個、または 2 0 0 個連続したアミノ酸 (例えば、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の少なくとも 8 個連続したアミノ酸、少なくとも 10 個連続したアミノ酸、または少なくとも 15 個連続したアミノ酸) を含み得、ここで、連続したアミノ酸 (例えば、少なくとも 3 個連続したアミノ酸、少なくとも 5 個連続したアミノ酸、少なくとも 8 個連続したアミノ酸、少なくとも 10 個連続したアミノ酸、または少なくとも 15 個連続したアミノ酸) のセグメントは、単離されたポリペプチドをそれぞれ配列番号 16 または 19 と最適にアライメントした場合、配列番号 16 (H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム E) または配列番号 19 (H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム H) のエクソン 3' によってコードされる領域の少なくとも一部分を含むセグメントと少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である。必要に応じて、そのような単離されたポリペプチドは、アイソフォーム H (またはその断片またはホモログ) には存在しない、アイソフォーム E (またはその断片またはホモログ) に由来するセグメント (例えば、少なくとも 8 個連続したアミノ酸) をさらに含み得る。そのような領域は、アイソフォームの配列を比較することによって容易に同定することができる。例えば、そのような単離されたポリペプチドは、単離されたポリペプチドを配列番号 16 と最適にアライメントした場合、配列番号 16 (H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム E) のエクソン 6 によってコードされる領域とエクソン 7 によってコードされる領域との境界にまたがるセグメントと少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 9

20

30

40

50

6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一である連続したアミノ酸（例えば、少なくとも 3 個連続したアミノ酸、少なくとも 5 個連続したアミノ酸、少なくとも 8 個連続したアミノ酸、少なくとも 1 0 個連続したアミノ酸、または少なくとも 1 5 個連続したアミノ酸）のセグメントをさらに含み得る。

【 0 2 2 2 】

アイソフォーム A（またはその断片またはホモログ）には存在しない、アイソフォーム F（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメント（例えば、少なくとも 8 個連続したアミノ酸）を含む単離されたポリペプチドも提供される。アイソフォーム F は、アイソフォーム A には存在しない、エクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーによってコードされる領域を含む。そのような領域は、アイソフォームの配列を比較することによって容易に同定することができる。したがって、単離されたポリペプチドは、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の少なくとも 5 個、6 個、8 個、1 0 個、1 2 個、1 4 個、1 5 個、1 6 個、1 8 個、2 0 個、2 2 個、2 4 個、2 5 個、3 0 個、3 5 個、4 0 個、4 5 個、5 0 個、6 0 個、7 0 個、8 0 個、9 0 個、1 0 0 個、1 5 0 個、または 2 0 0 個連続したアミノ酸（例えば、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の少なくとも 8 個連続したアミノ酸、少なくとも 1 0 個連続したアミノ酸、または少なくとも 1 5 個連続したアミノ酸）を含み得、ここで、連続したアミノ酸（例えば、少なくとも 3 個連続したアミノ酸、少なくとも 5 個連続したアミノ酸、少なくとも 8 個連続したアミノ酸、少なくとも 1 0 個連続したアミノ酸、または少なくとも 1 5 個連続したアミノ酸）のセグメントは、単離されたポリペプチドを配列番号 1 7 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 7（H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム F）のイントロン 6 へのリードスルーによってコードされる領域の少なくとも一部分を含むセグメントと少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一である。

【 0 2 2 3 】

アイソフォーム A（またはその断片またはホモログ）には存在しない、アイソフォーム C（またはその断片またはホモログ）に存在するセグメント（例えば、少なくとも 8 個連続したアミノ酸）を含む単離されたポリペプチドも提供される。アイソフォーム C は、アイソフォーム A と比較して、エクソン 6 によってコードされる領域が欠けており、アイソフォーム A には存在しないエクソン 5 とエクソン 7 との境界を含む。そのような領域は、アイソフォームの配列を比較することによって容易に同定することができる。したがって、単離されたポリペプチドは、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の少なくとも 5 個、6 個、8 個、1 0 個、1 2 個、1 4 個、1 5 個、1 6 個、1 8 個、2 0 個、2 2 個、2 4 個、2 5 個、3 0 個、3 5 個、4 0 個、4 5 個、5 0 個、6 0 個、7 0 個、8 0 個、9 0 個、1 0 0 個、1 5 0 個、または 2 0 0 個連続したアミノ酸（例えば、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の少なくとも 8 個連続したアミノ酸、少なくとも 1 0 個連続したアミノ酸、または少なくとも 1 5 個連続したアミノ酸）を含み得、ここで、連続したアミノ酸（例えば、少なくとも 3 個連続したアミノ酸、少なくとも 5 個連続したアミノ酸、少なくとも 8 個連続したアミノ酸、少なくとも 1 0 個連続したアミノ酸、または少なくとも 1 5 個連続したアミノ酸）のセグメントは、単離されたポリペプチドを配列番号 1 4 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 4（H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C）のエクソン 5 によってコードされる領域とエクソン 7 によってコードされる領域との境界にまたがるセグメントと少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 同一である。

【 0 2 2 4 】

本明細書に開示される単離されたポリペプチドはいずれも、異種分子または異種標識に連結することができる。そのような異種分子または標識の例は、本明細書の他の箇所で開示される。例えば、異種分子は、免疫グロブリン F c ドメイン、本明細書の他の箇所で開示されるペプチドタグ、ポリ（エチレンギリコール）、ポリシアル酸、またはグリコール酸であってよい。

【 0 2 2 5 】

10

20

30

40

50

## (2) H S D 1 7 B 1 3 タンパク質または断片を作製する方法

本明細書に開示される H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片のいずれかを作製する方法も開示される。そのような H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片は、任意の適切な方法で作製することができる。例えば、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片を、そのような H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片をコードする核酸（例えば、組換え発現ベクター）を含む宿主細胞から作製することができる。そのような方法は、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片をコードする核酸（例えば、組換え発現ベクター）を含む宿主細胞を培養し、それにより、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片を作製するステップを含み得る。核酸を宿主細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結することができ、核酸が発現する条件下で培養を行うことができる。そのような方法は、発現した H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片を回収するステップをさらに含み得る。回収するステップは、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片を精製することをさらに含み得る。

### 【0226】

タンパク質発現のための適切な系の例としては、細菌細胞発現系（例えば、*E s c h e r i c h i a c o l i*、*L a c t o c o c c u s l a c t i s*）、酵母細胞発現系（例えば、*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e*、*P i c h i a p a s t o r i s*）、昆虫細胞発現系（例えば、バキュロウイルス媒介性タンパク質発現）、および哺乳動物細胞発現系が挙げられる。

### 【0227】

H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸またはその断片の例は、本明細書の他の箇所でより詳細に開示される。必要に応じて、そのような核酸を宿主細胞における発現のためにコドン最適化する。必要に応じて、そのような核酸を宿主細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結する。プロモーターは、異種プロモーター（すなわち、天然に存在する H S D 1 7 B 1 3 プロモーターではないプロモーター）であってよい。*E s c h e r i c h i a c o l i* に適したプロモーターの例としては、アラビノース、*l a c*、*t a c*、および T 7 プロモーターが挙げられる。*L a c t o c o c c u s l a c t i s* に適したプロモーターの例としては、P 1 7 0 およびナイシンプロモーターが挙げられる。*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* に適したプロモーターの例としては、アルコールデヒドロゲナーゼ（A D H I）もしくはエノラーゼ（E N O）プロモーターなどの構成的プロモーターまたは P H O、C U P 1、G A L 1、および G 1 0 などの誘導性プロモーターが挙げられる。*P i c h i a p a s t o r i s* に適したプロモーターの例としては、アルコールオキシダーゼ I（A O X I）プロモーター、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素（G A P）プロモーター、およびグルタチオン依存性ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ（F L D I）プロモーターが挙げられる。バキュロウイルス媒介性系に適したプロモーターの例は後期ウイルス強力ポリヘドリンプロモーターである。

### 【0228】

必要に応じて、核酸は、タンパク質の精製を容易にするために、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片とインフレームでタグをさらにコードする。タグの例は、本明細書の他の箇所で開示される。そのようなタグは、例えば、パートナーリガンド（例えば、樹脂上に固定化されたもの）に結合することができ、その結果、タグが付されたタンパク質を他の全てのタンパク質（例えば、宿主細胞タンパク質）から単離することができる。アフニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）、およびサイズ排除クロマトグラフィー（S E C）は、発現されるタンパク質の純度を改善するために使用することができる方法の例である。

### 【0229】

他の方法を使用して H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片を作製することもできる。例えば、2つまたはそれより多いペプチドまたはポリペプチドをタンパク質化学の技法によって連結することができる。例えば、ペプチドまたはポリペプチドを F m o c ( 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル) または B o c ( t e r t - ブチルオキシカルボノ

イル) 化学のいずれかを使用して化学的に合成することができる。そのようなペプチドまたはポリペプチドは標準の化学反応によって合成することができる。例えば、ペプチドまたはポリペプチドを合成し、その合成樹脂から切り離さなくてもよいし、一方、ペプチドまたはタンパク質の他方の断片を合成し、その後、樹脂から切り離すことにより、他方の断片上の機能的にプロッキングされた末端基を露出させてもよい。ペプチド縮合反応により、これらの2つの断片を、それらの、それぞれカルボキシリ端およびアミノ端においてペプチド結合を介して共有結合により接合することができる。(Grant GA (1992年) *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman and Co., N.Y. (1992年); ならびに Bodansky M および Trost B. 編 (1993年) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる)。あるいは、ペプチドまたはポリペプチドを本明細書に記載の通り *in vivo* で独立に合成することができる。単離されたら、これらの独立したペプチドまたはポリペプチドを同様のペプチド縮合反応によって連結してペプチドまたはその断片を形成することができる。

#### 【0230】

例えば、クローニングされたまたは合成ペプチドセグメントの酵素的ライゲーションにより、比較的短いペプチド断片を接合してより大きなペプチド断片、ポリペプチド、または総タンパク質ドメインを作製することが可能になる (Abrahmsen Lら (1991年) *Biochemistry* 30巻: 4151頁、あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる)。あるいは、合成ペプチドのネイティブな化学的ライゲーションを利用して、短いペプチド断片から大きなペプチドまたはポリペプチドを合成的に構築することができる。この方法は、二段階化学反応からなり得る (Dawsonら (1994年) *Science*、266巻: 776~779頁、あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる)。第1のステップは、最初の共有結合生成物としてチオエステル連結した中間体が生じる、保護されていない合成ペプチド - - チオエステルとアミノ末端 Cys 残基を含有する別の保護されていないペプチドセグメントの化学選択的反応であり得る。反応条件を変化させなければ、この中間体は自発的に迅速な分子内反応を受けて、ライゲーション部位にネイティブなペプチド結合が形成される (Baggioliniら (1992年) *FEBS Lett.* 307巻: 97~101頁; Clark-Lewisら (1994年) *J Biol Chem.* 269巻: 16075頁; Clark-Lewisら (1991年) *Biochemistry*、30巻: 3128頁; および Rajarathnamら (1994年) *Biochemistry*、33巻: 6623~6630頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる)。

#### 【0231】

あるいは、保護されていないペプチドセグメントを化学的に連結することができ、その場合、化学的ライゲーションの結果としてペプチドセグメント間に形成される結合は天然でない(非ペプチド)結合である (Schnolzerら (1992年) *Science*、256巻: 221頁、あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる)。この技法は、タンパク質ドメインの類似体ならびに大量の比較的純粋な、完全な生物活性を有するタンパク質を合成するために使用されている (deLisle Milton RCら、*Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, New York, 257~267頁 (1992年)、あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる)。

#### 【0232】

##### C. 細胞

本明細書に開示される核酸およびタンパク質のいずれかを含む細胞(例えば、組換え宿主細胞)も本明細書において提示される。細胞は、*in vitro*、*ex vivo*、または *in vivo* にあってよい。核酸をプロモーターおよび他の制御配列に連結し、したがって、それらを発現させて、コードされるタンパク質を作製することができる。任意の細胞型が提供される。

#### 【0233】

10

20

30

40

50

細胞は、例えば、全能性細胞または多能性細胞（例えば、齧歯類 E S 細胞、マウス E S 細胞、またはラット E S 細胞などの胚性幹（E S）細胞）であってよい。全能性細胞は、任意の細胞型を生じさせ得る未分化細胞を含み、多能性細胞は、1種よりも多くの分化細胞型に発達する能力を有する未分化細胞を含む。そのような多能性および/または全能性細胞は、例えば、人工多能性幹（i P S）細胞などのE S 細胞またはE S 様細胞であってよい。E S 細胞は、胚に導入されると発生中の胚の任意の組織に寄与することが可能な胚由来全能性または多能性細胞を含む。E S 細胞は、胚盤胞の内部細胞塊から引き出すことができ、3つの脊椎動物胚葉（内胚葉、外胚葉、および中胚葉）のいずれの細胞にも分化させることができる。

## 【0234】

10

細胞はまた、初代体細胞であってもよく、初代体細胞ではない細胞であってもよい。体細胞は、配偶子、生殖細胞、生殖母細胞、または未分化幹細胞ではない任意の細胞を含み得る。細胞はまた、初代細胞であってもよい。初代細胞は、生物体、器官、または組織から直接単離された細胞または細胞培養物を含む。初代細胞は、形質転換されておらず不死でもない細胞を含む。初代細胞は、以前に組織培養物中で継代されていないかまたは以前に組織培養物中で継代されているが、組織培養物中で無制限に継代することはできない、生物体、器官、または組織から得られる任意の細胞を含む。そのような細胞は、従来の技法によって単離することができ、例えば、体細胞、造血細胞、内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞、間葉細胞、ケラチノサイト、メラニン細胞、単球、単核細胞、脂肪細胞、前脂肪細胞、ニューロン、グリア細胞、肝細胞、骨格筋芽細胞、および平滑筋細胞を含む。例えば、初代細胞は、結合組織、筋組織、神経系組織、または上皮組織に由来してよい。

## 【0235】

20

そのような細胞は、通常無制限には増殖しないが、突然変異または変更に起因して、正常な細胞の老化を逃れ、その代わりに分裂し続け得る細胞も含む。そのような突然変異または変更は、天然に起こり得るか、または意図的に誘導され得る。不死化細胞の例としては、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞、ヒト胎児由来腎臓細胞（例えば、H E K 293 細胞）、およびマウス胚線維芽細胞（例えば、3 T 3 細胞）が挙げられる。多数の型の不死化細胞が周知である。不死化細胞または初代細胞は、組換え遺伝子またはタンパク質の培養または発現のために一般に使用される細胞を含む。

## 【0236】

30

細胞はまた、肝細胞（例えば、ヒト肝細胞）などの分化細胞であってもよい。

## 【0237】

細胞は、任意の供給源に由来してよい。例えば、細胞は、真核細胞、動物細胞、植物細胞、または真菌（例えば、酵母）細胞であってよい。そのような細胞は、魚類細胞または鳥類細胞であってもよく、そのような細胞は、ヒト細胞、非ヒト哺乳動物細胞、齧歯類細胞、マウス細胞またはラット細胞などの哺乳動物細胞であってもよい。哺乳動物としては、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、サル、類人猿、ネコ、イヌ、ウマ、雄ウシ、シカ、バイソン、ヒツジ、齧歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット）、畜産動物（例えば、雌ウシ、雄の仔牛などのウシ種；ヒツジ、ヤギなどのヒツジ種；ならびにブタおよびイノシシなどのブタ種）が挙げられる。鳥類としては、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、ダチョウ、ガチョウ、アヒルなどが挙げられる。家畜動物および農業動物も含まれる。「非ヒト動物」という用語はヒトを排除する。

40

## 【0238】

マウス細胞に関しては、マウスは、例えば、129系統、C 57 B L / 6 系統、B A L B / c 系統、Swiss Webster 系統、129 系統およびC 57 B L / 6 系統のミックス、B A L B / c 系統およびC 57 B L / 6 系統のミックス、129 系統およびB A L B / c 系統のミックス、ならびにB A L B / c 系統、C 57 B L / 6 系統、および129 系統のミックスを含めた任意の系統であってよい。例えば、マウスは、少なくとも部分的にB A L B / c 系統に由来してよい（例えば、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75% B A L B / c 系統に由来するか、または約25%、約50%、約

50

75%、もしく約100% BALB/c系統に由来する)。一例では、マウスは、50% BALB/c、25% C57BL/6、および25% 129を含む系統である。あるいは、マウスは、BALB/cを除外した系統または系統の組合せを含む。

【0239】

129系統の例としては、129P1、129P2、129P3、129X1、129S1(例えば、129S1/SV、129S1/Sv1m)、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6(129/SvEvTac)、129S7、129S8、129T1、および129T2が挙げられる。例えば、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Festingら(1999年) Mammalian Genome、10巻(8号):836頁を参照されたい。C57BL系統の例としては、C57BL/A、C57BL/An、C57BL/GrFa、C57BL/Kal-wn、C57BL/6, C57BL/6J、C57BL/6ByJ, C57BL/6Nj、C57BL/10、C57BL/10ScSn、C57BL/10Cr、およびC57BL/Olaが挙げられる。マウス細胞はまた、上述の129系統および上述のC57BL/6系統のミックス(例えば、50% 129および50% C57BL/6)に由来してよい。同様に、マウス細胞は、上述の129系統のミックスまたは上述のBL/6系統のミックス(例えば、129S6(129/SvEvTac)系統)に由来してよい。

10

【0240】

ラット細胞に関しては、ラットは、例えば、ACIラット系統、Dark Agouti(DA)ラット系統、Wistarラット系統、LEAラット系統、Sprague Dawley(SD)ラット系統、またはFisher F344もしくはFisher F6などのFischerラット系統を含めた任意のラット系統であってよい。ラットはまた、上記の2種またはそれよりも多くの系統のミックスに由来する系統に由来してもよい。例えば、ラットは、DA系統またはACI系統に由来してよい。ACIラット系統は、黒色アグーチを有し、腹部および足が白色であり、RT1av1ハプロタイプを有すると特徴付けられる。そのような系統は、Harlan Laboratoriesを含めた種々の供給源から入手可能である。Dark Agouti(DA)ラット系統は、アグーチコートおよびRT1av1ハプロタイプを有すると特徴付けられる。そのようなラットは、Charles RiverおよびHarlan Laboratoriesを含めた種々の供給源から入手可能である。一部の場合では、ラットは、近交系ラット系統に由来する。例えば、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれるUS2014/0235933A1を参照されたい。

20

【0241】

III. HSD17B13の発現を改変または変更する方法

ヌクレアーゼ作用剤、外因性ドナー配列、転写活性化因子、転写リプレッサー、アンチセンスRNA、siRNA、およびshRNAなどのアンチセンス分子、HSD17B13タンパク質またはその断片、およびHSD17B13タンパク質をコードする組換えHSD17B13遺伝子または核酸を発現するための発現ベクターの任意の組合せを使用することによって細胞を改変するための種々の方法が提供される。当該方法は、in vitro、ex vivo、またはin vivoにおいて行うことができる。ヌクレアーゼ作用剤、外因性ドナー配列、転写活性化因子、転写リプレッサー、アンチセンスRNA、siRNA、およびshRNAなどのアンチセンス分子、HSD17B13タンパク質またはその断片、ならびに発現ベクターを細胞に任意の形態で本明細書の他の箇所に記載の任意の手段によって導入することができ、また、全部または一部を任意の組合せで同時にまたは逐次的に導入することができる。一部の方法は、細胞内の内因性HSD17B13遺伝子を変更するステップのみを伴う。一部の方法は、転写活性化因子またはリプレッサーを使用することによってか、またはアンチセンスRNA、siRNA、およびshRNAなどのアンチセンス分子を使用することによって内因性HSD17B13遺伝子の発現を変更するステップのみを伴う。一部の方法は、HSD17B13タンパク質をコードする組換えHSD17B13遺伝子もしくは核酸またはその断片を細胞に導入するステップの

30

40

50

みを伴う。一部の方法は、細胞に H S D 1 7 B 1 3 タンパク質またはその断片を導入するステップのみを伴う（例えば、本明細書に開示される H S D 1 7 B 1 3 タンパク質もしくはその断片のいずれか 1 つもしくはそれらの任意の組合せ、または本明細書に開示される H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム A ~ H もしくはその断片のいずれか 1 つもしくはそれらの任意の組合せ）。例えば、そのような方法は、 H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C、D、F、G、および H（もしくはその断片）の 1 つもしくは複数を細胞に導入するステップ、または H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D（もしくはその断片）を細胞に導入するステップを伴い得る。あるいは、そのような方法は、 H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム A、B、および E もしくはアイソフォーム A、B、E、および F'（もしくはその断片）の 1 つもしくは複数を細胞に導入するステップ、または H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム A（もしくはその断片）を細胞に導入するステップを伴い得る。他の方法は、細胞内の内因性 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を変更するステップと、 H S D 1 7 B 1 3 タンパク質もしくはその断片または H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子もしくは核酸またはその断片を細胞に導入するステップの両方を伴い得る。さらに他の方法は、細胞内の内因性 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の発現を変更するステップと、 H S D 1 7 B 1 3 タンパク質もしくはその断片または H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子もしくは核酸またはその断片を細胞に導入するステップの両方を伴い得る。

#### 【 0 2 4 2 】

##### A . H S D 1 7 B 1 3 核酸を改変する方法

スクレアーゼ作用剤および / または外因性ドナー配列を使用することによって細胞（例えば、多能性細胞または肝細胞などの分化細胞）内のゲノム内の H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を改変するための種々の方法が提供される。当該方法は、 *i n v i t r o*、 *e x v i v o*、または *i n v i v o* において行うことができる。スクレアーゼ作用剤を、単独で使用することもでき、外因性ドナー配列と組み合わせて使用することもできる。あるいは、外因性ドナー配列を単独で使用することもでき、スクレアーゼ作用剤と組み合わせて使用することもできる。

#### 【 0 2 4 3 】

二本鎖切断 ( D S B ) に応答した修復は、主に 2 つの保存的 D N A 修復経路：非相同末端結合 ( N H E J ) および相同組換え ( H R ) によって起こる。あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる Kasparek および Humphrey ( 2 0 1 1 年 ) Seminars in Cell & Dev. Biol.、2 2 卷： 8 8 6 ~ 8 9 7 頁を参照されたい。 N H E J は、切断末端を互いとまたは外因性配列と、相同的な鑄型を必要とせずに直接ライゲーションすることによる核酸の二本鎖切断の修復を含む。連続していない配列の N H E J によるライゲーションは、多くの場合、二本鎖切断の部位付近に欠失、挿入、または転座をもたらし得る。

#### 【 0 2 4 4 】

外因性ドナー配列によって媒介される標的核酸（例えば、 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子）の修復は、 2 つのポリヌクレオチド間の遺伝情報の交換の任意のプロセスを含み得る。例えば、 N H E J は、切断末端と外因性ドナー配列の末端の直接ライゲーションによる外因性ドナー配列の標的化組込みもたらし得る（すなわち、 N H E J に基づく捕捉）。そのような N H E J 媒介性標的化組込みは、相同組換え修復 ( H D R ) 経路が容易に使用可能でない場合（例えば、非分裂細胞、初代細胞、および相同性に基づく D N A 修復が不十分に行われる細胞において）に外因性ドナー配列を挿入するために好ましい可能性がある。さらに、相同組換え修復とは対照的に、切断部位に隣接する配列同一性の大きな領域 ( C a s 媒介性切断によって創出される突出部を越える ) に関する知見は必要なく、これは、ゲノム配列に関する知見が限られているゲノムを有する生物体への標的化挿入を試みる場合に有益であり得る。組込みは、外因性ドナー配列と切断されたゲノム配列との間の平滑末端のライゲーションによって、または、切断されるゲノム配列において C a s タンパク質によって生成されるものと適合する突出部に挟まれた外因性ドナー配列を使用した粘着末端

10

20

30

40

50

(すなわち、5'または3'突出部を有する)のライゲーションによって進行し得る。例えば、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、U S 2 0 1 1 / 0 2 0 7 2 2、W O 2 0 1 4 / 0 3 3 6 4 4、W O 2 0 1 4 / 0 8 9 2 9 0、およびMarescaら(2013年)Genome Res.、23巻(3号):539~546頁を参照されたい。平滑末端をライゲーションする場合、断片接合に必要なマイクロホモロジーの生成領域に標的および/またはドナー切除が必要な場合があり、これにより、標的配列に望ましくない変更が生じる可能性がある。

#### 【0245】

修復は、相同組換え修復(HDR)または相同組換え(HR)によっても起こり得る。HDRまたはHRは、ヌクレオチド配列の相同性を必要とし得、「標的」分子(すなわち、二本鎖切断が生じた分子)を修復するための鑄型として「ドナー」分子を使用し、ドナーから標的への遺伝情報の移行を導く核酸修復の形態を含む。いかなる特定の理論にも制約されることなく、そのような移行には、切断された標的とドナーとの間で形成されるヘテロ二本鎖DNAのミスマッチ補正、および/または、標的の一部になる遺伝情報を再合成するためにドナーが使用される、合成に依存する鎖アニーリング、および/または関連するプロセスが伴い得る。一部の場合では、ドナーポリヌクレオチド、ドナーポリヌクレオチドの一部、ドナーポリヌクレオチドのコピー、またはドナーポリヌクレオチドのコピーの一部が標的DNAに組み込まれる。それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Wangら(2013年)Cell、153巻:910~918頁; Mandalosら(2012年)PLOS ONE、7巻:e45768:1~9頁; およびWangら(2013年)Nat Biotechnol.、31巻:530~532頁を参照されたい。

10

#### 【0246】

ゲノム内のHSD17B13遺伝子に対する標的化遺伝子改変は、細胞を、HSD17B13遺伝子内の標的ゲノム遺伝子座の5'標的配列とハイブリダイズする5'相同アームおよびHSD17B13遺伝子内の標的ゲノム遺伝子座の3'標的配列とハイブリダイズする3'相同アームを含む外因性ドナー配列と接触させることによって生じさせることができる。外因性ドナー配列を標的ゲノム遺伝子座と組換えて、HSD17B13遺伝子に対する標的化遺伝子改変を生じさせることができる。一例として、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、5'相同アームを、配列番号2の12666位に対応する位置の5'側の標的配列とハイブリダイズさせることができ、3'相同アームを、配列番号2の12666位に対応する位置の3'側の標的配列とハイブリダイズさせることができる。そのような方法により、例えば、HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む(または逆の鎖の対応する位置にアデニンが挿入された)HSD17B13遺伝子をもたらすことができる。別の例として、5'および3'相同アームを、それぞれ、HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1のエクソン6を挟む位置に対応する位置にある5'および3'標的配列とハイブリダイズさせることができる。そのような方法により、例えば、HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1のエクソン6に対応する配列が欠失しているHSD17B13遺伝子をもたらすことができる。別の例として、5'および3'相同アームを、それぞれ、HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1のエクソン2を挟む位置に対応する位置にある5'および3'標的配列とハイブリダイズさせることができる。そのような方法により、例えば、HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1のエクソン2に対応する配列が欠失しているHSD17B13遺伝子をもたらすことができる。別の例として、5'および3'相同アームを、それぞれ、HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1のエクソン6/イントロン6の境界に対応する位置にある5'および3'標的配列とハイブリダイズさせることができる。別の例として、5'および3'相同アームを、それぞれ、HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1のエクソン

20

30

40

50

6 およびエクソン 7 に対応する位置にある 5' および 3' 標的配列とハイブリダイズさせることができる。そのような方法により、例えば、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位に対応するヌクレオチドと 1 2 6 6 6 位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む（または逆の鎖の対応する位置にアデニンが挿入された）H S D 1 7 B 1 3 遺伝子をもたらすことができる。別の例として、5' および 3' 相同アームを、それぞれ、配列番号 1 のイントロン 6 のドナースプライス部位に対応する領域（すなわち、配列番号 1 のイントロン 6 の 5' 末端にある領域）を挟むかまたはその領域内にある位置に対応する位置にある 5' および 3' 標的配列とハイブリダイズさせることができる。そのような方法により、例えば、イントロン 6 内のドナースプライス部位が破壊された H S D 1 7 B 1 3 遺伝子をもたらすことができる。外因性ドナー配列の例は、本明細書の他の箇所で開示される。

#### 【 0 2 4 7 】

ゲノム内の H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に対する標的化遺伝子変化は、細胞を、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の標的ゲノム遺伝子座にある標的配列における 1 つまたは複数のニックまたは二本鎖切断を誘導するヌクレアーゼ作用剤と接触させることによって生じさせることもできる。そのような方法により、例えば、配列番号 1 のイントロン 6 内のドナースプライス部位に対応する領域（すなわち、配列番号 1 のイントロン 6 の 5' 末端にある領域）が破壊された H S D 1 7 B 1 3 遺伝子をもたらすことができる。当該方法において使用することができるヌクレアーゼ作用剤の例および変化は、本明細書の他の箇所に記載されている。

#### 【 0 2 4 8 】

例えば、ゲノム内の H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に対する標的化遺伝子変化は、細胞または細胞のゲノムを、C a s タンパク質および H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の標的ゲノム遺伝子座内の 1 つまたは複数のガイド R N A 認識配列とハイブリダイズする 1 つまたは複数のガイド R N A と接触させることによって生じさせることができる。すなわち、ゲノム内の H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に対する標的化遺伝子変化は、細胞または細胞のゲノムを、C a s タンパク質および H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の標的ゲノム遺伝子座内の 1 つまたは複数のガイド R N A 標的配列を標的とする 1 つまたは複数のガイド R N A と接触させることによって生じさせることができる。例えば、そのような方法は、細胞を、C a s タンパク質および H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内のガイド R N A 標的配列を標的とするガイド R N A と接触させるステップを含み得る。一例として、ガイド R N A 標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 のエクソン 6 および / またはイントロン 6 に対応する領域内である。一例として、ガイド R N A 標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 のエクソン 6 および / またはイントロン 6 および / またはエクソン 7（例えば、エクソン 6 および / もしくはイントロン 6 、またはエクソン 6 および / もしくはエクソン 7 ）に対応する領域内である。別の例として、ガイド R N A 標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位に対応する位置を含むかまたはその位置に近接している場合がある。例えば、ガイド R N A 標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位に対応する位置から約 1 0 0 0 、 5 0 0 、 4 0 0 、 3 0 0 、 2 0 0 、 1 0 0 、 5 0 、 4 5 、

4 0 、 3 5 、 3 0 、 2 5 、 2 0 、 1 5 、 1 0 、または 5 ヌクレオチドの範囲内の場合がある。さらに別の例として、ガイド R N A 標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンまたは H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の終止コドンを含むかまたはそれに近接している場合がある。例えば、ガイド R N A 標的配列は、開始コドンまたは終止コドンから約 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 1 0 0 、 2 0 0 、 3 0 0 、 4 0 0 、 5 0 0 、または 1 , 0 0 0 ヌクレオチドの範囲内の場合がある。C a s タンパク質とガイド R N A が複合体を形成し、C a s タンパク質がガイド R N A 標的配列を切断する。C a s タンパク質による切断は、二本鎖切断または一本鎖切断を創出することができる（例えば、C a s タンパク質がニックアーゼである場合）。そのような方法により、例えば、配列番号 1 のイントロン 6 内のドナースプライス部位に対応する領域（すなわち、配列番号 1 のイントロン 6 の 5' 末端にある

10

20

30

40

50

領域)が破壊されているか、開始コドンが破壊されているか、終止コドンが破壊されているか、またはコード配列が欠失しているHSD17B13遺伝子をもたらすことができる。当該方法において使用することができるCas(例えば、Cas9)タンパク質およびガイドRNAの例および変化は、本明細書の他の箇所に記載されている。

#### 【0249】

一部の方法では、2種またはそれよりも多くのヌクレアーゼ作用剤を使用することができる。例えば、それぞれが、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および/もしくはイントロン6、またはエクソン6および/もしくはエクソン7に対応する、または、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含むかもしくはそれに近接している(例えば、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置から約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内である)領域内のヌクレアーゼ標的配列を標的とする2種のヌクレアーゼ作用剤を使用することができる。例えば、それぞれが、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および/またはイントロン6および/またはエクソン7に対応する領域内のヌクレアーゼ標的配列を標的とする2種のヌクレアーゼ作用剤を使用することができる。別の例として、それぞれが、開始コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列を標的とする2種またはそれよりも多くのヌクレアーゼ作用剤を使用することができる。別の例として、1種が、開始コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列を標的とし、1種が、終止コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列を標的とする2種のヌクレアーゼ作用剤を使用することができ、ヌクレアーゼ作用剤による切断は、2つのヌクレアーゼ標的配列間のコード領域の欠失をもたらすことができる。さらに別の例として、1種または複数種(例えば、2種)が、開始コドンを含むかまたはそれに近接している配列を標的とし、1種または複数種(例えば、2種)が、終止コドンを含むかまたはそれに近接している配列を標的とする、3種またはそれよりも多くのヌクレアーゼ作用剤を使用することができ、ヌクレアーゼ作用剤による切断は、開始コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列と終止コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列との間のコード領域の欠失をもたらすことができる。

#### 【0250】

必要に応じて、細胞を、HSD17B13遺伝子の標的ゲノム遺伝子座内の追加的なガイドRNA標的配列を標的とする1つまたは複数の追加的なガイドRNAとさらに接触させることができる。細胞を1つまたは複数の追加的なガイドRNA(例えば、第2のガイドRNA標的配列を標的とする第2のガイドRNA)と接触させることにより、Casタンパク質による切断は2カ所またはそれよりも多くの二本鎖切断または2カ所またはそれよりも多くの一本鎖切断を創出することができる(例えば、Casタンパク質がニッカーゼである場合)。

#### 【0251】

必要に応じて、細胞を、HSD17B13遺伝子の標的ゲノム遺伝子座と組換えられて標的化遺伝子変換を生じさせる1つまたは複数の外因性ドナー配列とさらに接触させることができる。当該方法において使用することができる外因性ドナー配列の例および変化は、本明細書の他の箇所で開示される。

#### 【0252】

Casタンパク質、ガイドRNA(複数可)、および外因性ドナー配列(複数可)を細胞に任意の形態で本明細書の他の箇所に記載の任意の手段によって導入することができ、Casタンパク質、ガイドRNA(複数可)、および外因性ドナー配列(複数可)の全部または一部を任意の組合せで同時にまたは逐次的に導入することができる。

#### 【0253】

一部のそのような方法では、外因性ドナー配列による標的核酸(例えば、HSD17B1

10

20

30

40

50

3遺伝子)の修復は、相同組換え修復(HDR)によって起こる。相同組換え修復は、Casタンパク質がHSD17B13遺伝子のDNAの両方の鎖を切断して二本鎖切断を創出する場合か、Casタンパク質が、標的核酸のDNAの1つの鎖を切断して一本鎖切断を創出するニッカーゼである場合か、またはCasニッカーゼを使用して、2つのオフセットニックによって形成される二本鎖切断を創出する場合に起こり得る。そのような方法では、外因性ドナー配列は、5'および3'標的配列に対応する5'および3'相同アームを含む。ガイドRNA標的配列(複数可)または切断部位(複数可)は、5'標的配列に隣接していてもよく、3'標的配列に隣接していてもよく、5'標的配列および3'標的配列の両方に隣接していてもよく、5'標的配列にも3'標的配列にも隣接していないなくてもよい。必要に応じて、外因性ドナー配列は、5'および3'相同アームに挟まれた核酸挿入物をさらに含んでよく、核酸挿入物は、5'標的配列と3'標的配列との間に挿入される。核酸挿入物が存在しない場合、外因性ドナー配列は、5'標的配列と3'標的配列との間のゲノム配列を欠失させるように機能する。外因性ドナー配列の例は、本明細書の他の箇所で開示される。

#### 【0254】

あるいは、外因性ドナー配列によって媒介されるHSD17B13遺伝子の修復は、非相同末端結合(NHEJ)媒介性ライゲーションによって行うことができる。そのような方法では、外因性ドナー配列の少なくとも1つの末端は、HSD17B13遺伝子内のCas媒介性切断によって創出される少なくとも1つの突出部と相補的な短い一本鎖領域を含む。外因性ドナー配列内の相補末端は、核酸挿入物を挟んでいてよい。例えば、外因性ドナー配列の各末端は、HSD17B13遺伝子内のCas媒介性切断によって創出される突出部と相補的な短い一本鎖領域を含んでよく、外因性ドナー配列内のこれらの相補的な領域は、核酸挿入物を挟んでいてよい。

#### 【0255】

Cas媒介性切断によって創出された二本鎖切断の平滑末端を切除することによって突出部(すなわち、付着末端)を創出することができる。そのような切除により、断片接合に必要なマイクロホモロジー領域が生じ得るが、これはHSD17B13遺伝子に望ましくないまたは調節できない変更を創出する可能性がある。あるいは、そのような突出部は、対のCasニッカーゼを使用することによって創出させることができる。例えば、細胞をDNAの逆の鎖を切断する第1および第2のニッカーゼと接触させることができ、それによって、2重ニッキングを通じてゲノムを改変する。これは、細胞を、第1のCasタンパク質ニッカーゼ、HSD17B13遺伝子の標的ゲノム遺伝子座内の第1のガイドRNA標的配列を標的とする第1のガイドRNA、第2のCasタンパク質ニッカーゼ、およびHSD17B13遺伝子の標的ゲノム遺伝子座内の第2のガイドRNA標的配列を標的とする第2のガイドRNAと接触させることによって実現することができる。第1のCasタンパク質と第1のガイドRNAが第1の複合体を形成し、第2のCasタンパク質と第2のガイドRNAが第2の複合体を形成する。第1のCasタンパク質ニッカーゼが第1のガイドRNA標的配列内のゲノムDNAの第1の鎖を切断し、第2のCasタンパク質ニッカーゼが第2のガイドRNA標的配列内のゲノムDNAの第2の鎖を切断し、必要に応じて、外因性ドナー配列がHSD17B13遺伝子の標的ゲノム遺伝子座と組換えられて、標的化遺伝子改変が生じる。

#### 【0256】

第1のニッカーゼは、ゲノムDNAの第1の鎖(すなわち、相補鎖)を切断することができ、第2のニッカーゼは、ゲノムDNAの第2の鎖(すなわち、非相補的な鎖)を切断することができる。第1および第2のニッカーゼは、例えば、Cas9のRuvCドメイン(例えば、本明細書の他の箇所に記載のD10A突然変異)内の触媒残基を突然変異させること、またはCas9のHNHドメイン内の触媒残基を突然変異させることによって(例えば、本明細書の他の箇所に記載のH840A突然変異)創出することができる。そのような方法では、2重ニッキングを使用して、付着末端(すなわち、突出部)を有する二本鎖切断を創出することができる。第1および第2のガイドRNA標的配列を、切断部位

10

20

30

40

50

が創出され、その結果、D N A の第 1 および第 2 の鎖上の第 1 および第 2 のニッカーゼによって創出されるニックにより二本鎖切断が創出されるように配置することができる。第 1 および第 2 の C R I S P R R N A 標的配列内のニックがオフセットされると、突出部が創出される。オフセットウインドウは、例えば、少なくとも約 5 b p 、 10 b p 、 20 b p 、 30 b p 、 40 b p 、 50 b p 、 60 b p 、 70 b p 、 80 b p 、 90 b p 、 100 b p であるかまたはそれよりも大きい場合がある。例えば、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ranら (2013年) Cell 、 154巻 : 1380 ~ 1389 頁 ; Maliら (2013年) Nat. Biotech. 、 31巻 : 833 ~ 838 頁 ; およびShenら (2014年) Nat. Methods 、 11巻 : 399 ~ 404 頁を参照されたい。

10

### 【 0 2 5 7 】

#### ( 1 ) 標的化遺伝子改变の型

本明細書に記載の方法を使用して標的化遺伝子改变の種々の型を導入することができる。そのような標的化改变としては、例えば、1つまたは複数のヌクレオチドの付加、1つまたは複数のヌクレオチドの欠失、1つまたは複数のヌクレオチドの置換、点突然変異、またはこれらの組合せを挙げることができる。例えば、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、7個、8個、9個、10個またはそれよりも多くのヌクレオチドを変化させて(例えば、欠失させるか、挿入するか、または置換する)、標的化ゲノム改变を形成することができる。欠失、挿入、または置換は、本明細書の他の箇所で開示される通り、任意のサイズのものであってよい。例えば、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Wangら (2013年) Cell 、 153巻 : 910 ~ 918 頁 ; Mandalosら (2012年) PLOS ONE 7巻 : e45768 : 1 ~ 9 頁 ; およびWangら (2013年) Nat. Biotechnol. 、 31巻 : 530 ~ 532 頁を参照されたい。

20

### 【 0 2 5 8 】

そのような標的化遺伝子改变は、標的ゲノム遺伝子座の破壊をもたらすことができる。破壊は、制御エレメント(例えば、プロモーターまたはエンハンサー)の変更、ミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、フレームシフト突然変異、短縮突然変異、ヌル突然変異、または少数のヌクレオチドの挿入もしくは欠失(例えば、フレームシフト突然変異を引き起こす)を含み得、対立遺伝子の不活性化(すなわち、機能喪失)または喪失をもたらし得る。例えば、標的化改变は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンの破壊を含み得、したがって、開始コドンはもはや機能的でない。

30

### 【 0 2 5 9 】

特定の例では、標的化改变は、第 1 のガイド R N A 標的配列と第 2 のガイド R N A 標的配列または C a s 切断部位との間の欠失を含み得る。外因性ドナー配列(例えば、修復鑄型または標的化ベクター)を使用する場合、改变は、第 1 のガイド R N A 標的配列と第 2 のガイド R N A 標的配列または C a s 切断部位との間の欠失ならびに 5 ' 標的配列と 3 ' 標的配列との間への核酸挿入物の挿入を含み得る。

### 【 0 2 6 0 】

あるいは、外因性ドナー配列を単独でまたはヌクレアーゼ作用剤と組み合わせて使用する場合、改变は、第 1 の相同染色体と第 2 の相同染色体の対における 5 ' 標的配列と 3 ' 標的配列との間の欠失ならびに 5 ' 標的配列と 3 ' 標的配列との間への核酸挿入物の挿入を含み得、それにより、ホモ接合体が改变されたゲノムがもたらされる。あるいは、外因性ドナーパ配列が核酸挿入物を伴わずに 5 ' および 3 ' 相同アームを含む場合、改变は、5 ' 標的配列と 3 ' 標的配列との間の欠失を含み得る。

40

### 【 0 2 6 1 】

第 1 のガイド R N A 標的配列と第 2 のガイド R N A 標的配列との間の欠失または 5 ' 標的配列と 3 ' 標的配列との間の欠失は、欠失した核酸が第 1 のヌクレアーゼ切断部位と第 2 のヌクレアーゼ切断部位との間の核酸配列のみからなるか、または 5 ' 標的配列と 3 ' 標的配列との間の核酸配列のみからなり、したがって改变されたゲノム標的遺伝子座には追加的な欠失または挿入が存在しない、厳密な欠失であり得る。第 1 のガイド R N A 標的配列と第

50

2のガイドRNA標的配列との間の欠失はまた、非相同末端結合（NHEJ）による厳密でない修復と一致して、第1および第2のスクレアーゼ切断部位を越えて広がる、厳密でない欠失の場合もあり、その結果、改変されたゲノム遺伝子座に追加的な欠失および/または挿入がもたらされる。例えば、欠失は、第1および第2のCasタンパク質切断部位を約1bp、約2bp、約3bp、約4bp、約5bp、約10bp、約20bp、約30bp、約40bp、約50bp、約500bp、またはそれよりも大きく越えて広がり得る。同様に、改変されたゲノム遺伝子座は、NHEJによる厳密でない修復と一致して、約1bp、約2bp、約3bp、約4bp、約5bp、約10bp、約20bp、約30bp、約40bp、約50bp、約100bp、約200bp、約300bp、約400bp、約500bp、またはそれよりも大きな挿入などの追加的な挿入を含む場合がある。10

#### 【0262】

標的化遺伝子改変は、例えば、二対立遺伝子改変または単一対立遺伝子改変であり得る。二対立遺伝子改変は、対応する相同染色体上（例えば、二倍体細胞において）の同じ遺伝子座に対して同じ改変がなされる事象、または対応する相同染色体上の同じ遺伝子座に対して異なる改変がなされる事象を含む。一部の方法では、標的化遺伝子改変は、単一対立遺伝子改変である。単一対立遺伝子改変は、一方の対立遺伝子のみに改変がなされる（すなわち、HSD17B13遺伝子の2つの相同染色体うちの一方のみに対する改変）事象を含む。相同染色体は、同じ遺伝子座に同じ遺伝子を有するが、場合により異なる対立遺伝子を有する染色体（例えば、減数分裂の間に対合する染色体）を含む。対立遺伝子という用語は、遺伝子配列の1つまたは複数の代替形態のいずれかを含む。二倍体細胞または生物体では、所与の配列の2つの対立遺伝子は、一般には、相同染色体の対の対応する遺伝子座を占有する。20

#### 【0263】

単一対立遺伝子突然変異により、標的化HSD17B13改変についてヘテロ接合体である細胞をもたらすことができる。ヘテロ接合体は、HSD17B13遺伝子の対立遺伝子（すなわち、両方の相同染色体上の対応する対立遺伝子）の一方のみが標的化改変を有する状況を含む。

#### 【0264】

二対立遺伝子改変により、標的化改変についてホモ接合体をもたらすことができる。ホモ接合体は、HSD17B13遺伝子の対立遺伝子（すなわち、両方の相同染色体上の対応する対立遺伝子）の両方が標的化改変を有する状況を含む。あるいは、二対立遺伝子改変により、標的化改変についてヘテロ接合体（例えば、ヘミ接合体）の化合物をもたらすことができる。化合物ヘテロ接合体は、標的遺伝子座の対立遺伝子（すなわち、両方の相同染色体上の対立遺伝子）の両方が改変されているが、異なるように改変されている（例えば、一方の対立遺伝子における標的化改変および他方の対立遺伝子の不活性化または破壊）状況を含む。例えば、標的化改変を伴わない対立遺伝子では、Casタンパク質によって創出された二本鎖切断が非相同末端結合（NHEJ）媒介性DNA修復によって修復されている可能性があり、それにより、核酸配列の挿入または欠失を含む突然変異体対立遺伝子が生成し、それにより、そのゲノム遺伝子座の破壊が引き起こされる。例えば、二対立遺伝子改変により、細胞が標的化改変を有する一方の対立遺伝子と、発現することができない別の対立遺伝子とを有する場合、化合物ヘテロ接合体がもたらされ得る。化合物ヘテロ接合体はヘミ接合体を含む。ヘミ接合体は、標的遺伝子座の一方の対立遺伝子のみ（すなわち、2つの相同染色体のうちの一方の対立遺伝子）が存在する状況を含む。例えば、二対立遺伝子改変により、標的化改変が一方の対立遺伝子において生じ、対応する他方の対立遺伝子の喪失または欠失が伴う場合、標的化改変についてヘミ接合体がもたらされ得る。30

#### 【0265】

##### （2）標的化遺伝子改変を有する細胞の同定

本明細書に開示される方法は、改変されたHSD17B13遺伝子を有する細胞を同定す40

10

20

30

40

50

るステップをさらに含み得る。種々の方法を使用して、欠失または挿入などの標的化遺伝子改変を有する細胞を同定することができる。そのような方法は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に標的化遺伝子改変を有する1つの細胞を同定するステップを含み得る。スクリーニングを行って、改変されたゲノム遺伝子座を有するそのような細胞を同定することができる。

【0266】

スクリーニングステップは、親染色体の対立遺伝子の改変 (M O A) を評価するための定量的アッセイを含み得る (例えば、対立遺伝子の喪失 (L O A) および / または対立遺伝子の獲得 (G O A) アッセイ)。例えば、定量的アッセイは、リアルタイム P C R (q P C R) などの定量的 P C R によって行うことができる。リアルタイム P C R では、標的ゲノム遺伝子座を認識する第1のプライマーセットおよび非標的化参照遺伝子座を認識する第2のプライマーセットを利用することができる。プライマーセットは、増幅した配列を認識する蛍光プローブを含み得る。対立遺伝子の喪失 (L O A) アッセイは、従来のスクリーニング論理をひっくり返し、突然変異が方向付けられたネイティブな遺伝子座のコピーの数を数量化する。正確に標的された細胞クローンでは、L O A アッセイにより2つのネイティブな対立遺伝子 (X または Y 染色体上にない遺伝子) のうちの一方が検出され、他方の対立遺伝子は標的化改変によって破壊されている。同じ原理を対立遺伝子の獲得 (G O A) アッセイとして逆に適用して、挿入された標的化ベクターのコピー数を数量化することができる。例えば、G O A および L O A アッセイを組み合わせて使用することにより、正確に標的されたヘテロ接合体クローンが、1コピーのネイティブな標的遺伝子を喪失し、1コピーの薬物耐性遺伝子または他の挿入されたマーカーを獲得していることを明らかにする。

【0267】

例として、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (q P C R) を対立遺伝子数量化の方法として使用することができるが、ゼロコピー、1コピー、および2コピーの標的遺伝子の間の差異またはゼロコピー、1コピー、および2コピーの核酸挿入物の間の差異を確実に区別することができる任意の方法を使用して M O A アッセイを展開することができる。例えば、ゲノム D N A 試料中の D N A 鑄型のコピーの数を、特に、参照遺伝子と比較することによって数量化するために、T A Q M A N (登録商標) を使用することができる (例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる U S 6 , 5 9 6 , 5 4 1 を参照されたい)。参照遺伝子を同じゲノム D N A 内で標的遺伝子 (複数可) または遺伝子座 (複数可) として定量化する。したがって、2回の T A Q M A N (登録商標) 増幅 (それぞれ、そのそれぞれのプローブを用いる) を実施する。一方の T A Q M A N (登録商標) プローブにより参照遺伝子の「C t」 (閾値サイクル数) を決定し、他方のプローブにより上首尾の標的化によって置き換えられる、標的化される遺伝子 (複数可) または遺伝子座 (複数可) の領域の C t を決定する (すなわち、L O A アッセイ)。C t は、T A Q M A N (登録商標) プローブのそれぞれに対する出発 D N A の量を反映する数量であり、すなわち、あまり豊富でない配列には、閾値サイクル数に達するまでにより多くの P C R のサイクルが必要になる。T A Q M A N (登録商標) 反応のための鑄型配列のコピーの数が半分に減少すると、約 1 C t 単位の増大が生じる。標的遺伝子 (複数可) または遺伝子座 (複数可) の一方の対立遺伝子が相同組換えによって置き換えられている細胞における T A Q M A N (登録商標) 反応では、標的 T A Q M A N (登録商標) 反応に関しては 1 C t の増大が生じ、参照遺伝子に関しては非標的化細胞由来の D N A と比較して C t の増大は伴わない。G O A アッセイに関しては、別の T A Q M A N (登録商標) プローブを使用して、上首尾の標的化によって標的化される遺伝子 (複数可) または遺伝子座 (複数可) と置き換えられた核酸挿入物の C t を決定することができる。

【0268】

適切な定量的アッセイの他の例としては、蛍光媒介性 i n s i t u ハイブリダイゼーション (F I S H) 、比較ゲノムハイブリダイゼーション、等温 D N A 増幅、固定化されたプローブ (複数可) への定量的ハイブリダイゼーション、I N V A D E R (登録商標) プローブ、T A Q M A N (登録商標) 分子ビーコンプローブ、または E C L I P S E (商標

10

20

30

40

50

) プローブ技術が挙げられる(例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるU S 2 0 0 5 / 0 1 4 4 6 5 5 を参照されたい)。長距離P C R、サンプロット法、またはサンガー配列決定などの、標的化改変についてスクリーニングするための従来のアッセイを使用することもできる。そのようなアッセイは、一般には、挿入された標的化ベクターと標的とされるゲノム遺伝子座との間の連関に関する証拠を得るために使用される。例えば、長距離P C Rアッセイに関しては、一方のプライマーが、挿入されたD N A内の配列を認識することができ、他方が、標的化ベクターの相同アームの末端を越える標的ゲノム遺伝子座配列を認識する。

#### 【0269】

次世代シーケンシング( N G S )をスクリーニングに使用することもできる。次世代シーケンシングは、「 N G S 」または「大規模並列処理配列決定」または「ハイスループットな配列決定」とも称され得る。本明細書に開示される方法では、標的化された細胞を選択マーカーを使用してスクリーニングする必要はない。例えば、選択カセットを使用せずに、本明細書に記載のM O AおよびN G Sアッセイに依拠することができる。

#### B . H S D 1 7 B 1 3 核酸の発現を変更する方法

##### 【0270】

H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の発現を変更するための種々の方法が提供される。一部の方法では、本明細書の他の箇所でさらに詳細に記載されている通り、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の破壊を引き起こすためのヌクレアーゼ作用剤を用いた切断によって発現を変更する。一部の方法では、転写活性化ドメインまたは転写抑制ドメインと融合または連結したD N A結合タンパク質を使用することによって発現を変更する。一部の方法では、アンチセンスR N A、s h R N A、またはs i R N AなどのR N A干渉組成物を使用することによって発現を変更する。

##### 【0271】

一例では、細胞または細胞内のゲノムを、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の標的ゲノム遺伝子座にある標的配列における1つまたは複数のニックまたは二本鎖切断を誘導するヌクレアーゼ作用剤またはH S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸と接触させることにより、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の発現またはH S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸を改変することができる。そのような切断は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子またはH S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の発現の破壊をもたらすことができる。例えば、ヌクレアーゼ標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンを含むかまたはそれに近接している場合がある。例えば、標的配列は、開始コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内の場合があり、ヌクレアーゼ作用剤による切断は、開始コドンを破壊することができる。別の例として、それぞれが、開始コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列を標的とする2種またはそれよりも多くのヌクレアーゼ作用剤を使用することができる。別の例として、1種が、開始コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列を標的とし、1種が、終止コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列を標的とする2種のヌクレアーゼ作用剤を使用することができ、ヌクレアーゼ作用剤による切断は、2つのヌクレアーゼ標的配列間のコード領域の欠失をもたらすことができる。さらに別の例として、1種または複数種(例えば、2種)が、開始コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列を標的とし、1種または複数種(例えば、2種)が、終止コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列を標的とする、3種またはそれよりも多くのヌクレアーゼ作用剤を使用することができ、ヌクレアーゼ作用剤による切断は、開始コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列と終止コドンを含むかまたはそれに近接しているヌクレアーゼ標的配列との間のコード領域の欠失をもたらすことができる。H S D 1 7 B 1 3 遺伝子またはH S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸の改変の他の例は、本明細書の他の箇所で開示される。

##### 【0272】

10

20

30

40

50

別の例では、細胞または細胞内のゲノムを、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の標的ゲノム遺伝子座に結合するD N A 結合タンパク質と接触させることにより、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の発現またはH S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸を改変することができる。D N A 結合タンパク質は、例えば、転写活性化ドメインまたは転写リプレッサードメインと融合したヌクレアーゼ不活性C a s タンパク質であってよい。D N A 結合タンパク質の他の例としては、転写活性化ドメインもしくは転写リプレッサードメインと融合したジンクフィンガータンパク質、または転写活性化ドメインもしくは転写リプレッサードメインと融合した転写活性化因子様エフェクター（T A L E ）タンパク質が挙げられる。そのようなタンパク質の例は、本明細書の他の箇所で開示される。例えば、一部の方法では、野生型H S D 1 7 B 1 3 遺伝子またはr s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントではないH S D 1 7 B 1 3 遺伝子の発現を低減するため（例えば、H S D 1 7 B 1 3 転写産物またはアイソフォームAの発現を低減するため）に転写リプレッサーを使用することができる。同様に、一部の方法では、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアント遺伝子の発現を増大させるため（例えば、H S D 1 7 B 1 3 転写産物またはアイソフォームDの発現を増大させるため）に転写活性化因子を使用することができる。

#### 【0273】

D N A 結合タンパク質の標的配列（例えば、ガイドR N A 標的配列）は、発現を変更するのに適したH S D 1 7 B 1 3 遺伝子またはH S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸内の任意の場所にあってよい。一例として、標的配列は、エンハンサーまたはプロモーターなどの制御エレメント内にある場合もあり、制御エレメントの近傍にある場合もある。例えば、標的配列は、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の開始コドンを含むかまたはそれに近接している場合がある。例えば、標的配列は、開始コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内の場合がある。

#### 【0274】

別の例では、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の発現またはH S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸を変更するために、アンチセンス分子を使用することができる。アンチセンス分子の例としては、アンチセンスR N A 、低分子干渉R N A （s i R N A ）、および低分子ヘアピン型R N A （s h R N A ）が挙げられる。そのようなアンチセンスR N A 、s i R N A 、またはs h R N A は、m R N A の任意の領域を標的とするように設計することができる。例えば、アンチセンスR N A 、s i R N A 、またはs h R N A は、本明細書に開示されるH S D 1 7 B 1 3 転写産物の1つもしくは複数に独特的の領域、または本明細書に開示されるH S D 1 7 B 1 3 転写産物の1つもしくは複数に共通する領域を標的とするように設計することができる。c D N A およびバリアントH S D 1 7 B 1 3 転写産物とハイブリダイズする核酸の例は、本明細書の他の箇所でより詳細に開示される。例えば、アンチセンスR N A 、s i R N A 、またはs h R N A は、配列番号4（H S D 1 7 B 1 3 転写産物A）内の配列とハイブリダイズし得る。必要に応じて、アンチセンスR N A 、s i R N A 、またはs h R N A は、細胞内のH S D 1 7 B 1 3 転写産物Aの発現を低減し得る。必要に応じて、アンチセンスR N A 、s i R N A 、またはs h R N A は、配列番号7（H S D 1 7 B 1 3 転写産物D）には存在しない、配列番号4（H S D 1 7 B 1 3 転写産物A）に存在する配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンスR N A 、s i R N A 、またはs h R N A は、配列番号4（H S D 1 7 B 1 3 転写産物A）のエクソン7内の配列またはエクソン6とエクソン7との境界にまたがる配列とハイブリダイズする。

#### 【0275】

別の例として、アンチセンスR N A 、s i R N A 、またはs h R N A は、配列番号7（H S D 1 7 B 1 3 転写産物D）内の配列とハイブリダイズし得る。必要に応じて、アンチセンスR N A 、s i R N A 、またはs h R N A は、細胞内のH S D 1 7 B 1 3 転写産物Dの発現を低減し得る。必要に応じて、アンチセンスR N A 、s i R N A 、またはs h R N A は、配列番号4（H S D 1 7 B 1 3 転写産物A）には存在しない、配列番号7（H S D 1 7 B 1 3 転写産物D）に存在する配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセン

10

20

30

40

50

S R N A 、 s i R N A 、 または s h R N A は、配列番号 7 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ) のエクソン 7 内の配列またはエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる配列とハイブリダイズする。

【 0 2 7 6 】

C . 核酸およびタンパク質の細胞への導入

本明細書に開示される核酸およびタンパク質は、任意の手段によって細胞に導入することができる。「導入すること」は、核酸またはタンパク質を、当該配列が細胞の内部に進入するように細胞にもたらすことを含む。導入は、任意の手段によって実現することができ、構成成分の 1 つまたは複数（例えば、構成成分のうちの 2 つ、または構成成分の全て）を任意の組合せで同時にまたは逐次的に細胞に導入することができる。例えば、外因性ドナー配列をヌクレアーゼ作用剤の導入前に導入することもでき、ヌクレアーゼ作用剤の導入後に導入することもできる（例えば、外因性ドナー配列をヌクレアーゼ作用剤の導入の約 1 、 2 、 3 、 4 、 8 、 12 、 24 、 36 、 48 、もしくは 72 時間前、または約 1 、 2 、 3 、 4 、 8 、 12 、 24 、 36 、 48 、もしくは 72 時間後に投与することができる）。例えば、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる U S 2 0 1 5 / 0 2 4 0 2 6 3 および U S 2 0 1 5 / 0 1 1 0 7 6 2 を参照されたい。細胞のゲノムをヌクレアーゼ作用剤または外因性ドナー配列と接触させることは、 1 つもしくは複数のヌクレアーゼ作用剤もしくはヌクレアーゼ作用剤をコードする核酸（例えば、 1 つもしくは複数の C a s タンパク質もしくは 1 つもしくは複数の C a s タンパク質をコードする核酸、および 1 つもしくは複数のガイド R N A もしくは 1 つもしくは複数のガイド R N A をコードする核酸（すなわち、 1 つもしくは複数の C R I S P R R N A および 1 つもしくは複数の t r a c r R N A ））ならびに / または 1 つもしくは複数の外因性ドナー配列を細胞に導入することを含み得る。細胞のゲノムを接触させること（すなわち、細胞を接触させること）は、上記の構成成分のうちの 1 つのみ、構成成分のうちの 1 つもしくは複数、または全ての構成成分を細胞に導入することを含み得る。

10

【 0 2 7 7 】

ヌクレアーゼ作用剤は、タンパク質の形態で、または、 R N A （例えば、メッセンジャー R N A ( m R N A ) ）もしくは D N A などの、ヌクレアーゼ作用剤をコードする核酸の形態で細胞に導入することができる。 D N A の形態で導入する場合、 D N A を、細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結することができる。そのような D N A は、 1 つまたは複数の発現構築物中にあってよい。

20

【 0 2 7 8 】

例えば、 C a s タンパク質は、 g R N A と複合体を形成した C a s タンパク質などのタンパク質の形態で、または R N A （例えば、メッセンジャー R N A ( m R N A ) ）もしくは D N A などの、 C a s タンパク質をコードする核酸の形態で細胞に導入することができる。ガイド R N A は、 R N A の形態でまたはガイド R N A をコードする D N A の形態で細胞に導入することができる。 D N A の形態で導入する場合、 C a s タンパク質および / またはガイド R N A をコードする D N A を細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結することができる。そのような D N A は、 1 つまたは複数の発現構築物中にあってよい。例えば、そのような発現構築物は、単一の核酸分子の構成成分であってよい。あるいは、それらは 2 つまたはそれよりも多くの核酸分子中の任意の組合せで分けることができる（すなわち、 1 つまたは複数の C R I S P R R N A をコードする D N A 、 1 つまたは複数の t r a c r R N A をコードする D N A 、および C a s タンパク質をコードする D N A が別々の核酸分子の構成成分であってよい）。

30

【 0 2 7 9 】

一部の方法では、ヌクレアーゼ作用剤（例えば、 C a s タンパク質およびガイド R N A ）をコードする D N A ならびに / または外因性ドナー配列をコードする D N A を D N A ミニサークルによって細胞に導入することができる。例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 1 4 / 1 8 2 7 0 0 を参照されたい。 D N A ミニサークルは、ウイルスによらない遺伝子移入のために使用することができる高次コ

40

50

イルDNA分子であり、複製開始点も抗生物質選択マーカーも有さない。したがって、DNAミニサークルは、一般には、プラスミドベクターよりもサイズが小さい。これらのDNAは細菌DNAを欠き、したがって、細菌DNAにおいて見られる非メチル化CpGモチーフを欠く。

【0280】

本明細書において提示される方法は、核酸またはタンパク質が少なくとも1つの細胞の内部に進入しさえすれば、核酸またはタンパク質を細胞に導入するための特定の方法に依存しない。核酸およびタンパク質を種々の細胞型に導入するための方法は公知であり、それらとして、例えば、安定トランスフェクション方法、一過性トランスフェクション方法、およびウイルス媒介性方法が挙げられる。

10

【0281】

トランスフェクションプロトコールならびに核酸またはタンパク質を細胞に導入するためのプロトコールは変動し得る。非限定的なトランスフェクション方法として、リポソーム；ナノ粒子；リン酸カルシウム (Grahamら (1973年) *Virology*、52巻 (2号) : 456 ~ 67頁、Bacchettiら (1977年) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、74巻 (4号) : 1590 ~ 4頁、およびKriegler, M (1991年)、*Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York : W. H. Freeman and Company、96 ~ 97頁)；デンドリマー；またはDEAE-デキストランもしくはポリエチレンイミンなどのカチオン性ポリマーを使用する、化学に基づくトランスフェクション方法が挙げられる。非化学的方法として、エレクトロポレーション、ソノポレーション、および光学的トランスフェクションが挙げられる。粒子に基づくトランスフェクションとして、遺伝子銃の使用、または磁石補助トランスフェクションが挙げられる (Bertram (2006年) *Current Pharmaceutical Biotechnology*、7巻、277 ~ 28頁)。ウイルスによる方法をトランスフェクションのために使用することもできる。

20

【0282】

核酸またはタンパク質の細胞への導入は、エレクトロポレーションによって、細胞質内注射によって、ウイルス感染によって、アデノウイルスによって、アデノ隨伴ウイルスによって、レンチウイルスによって、レトロウイルスによって、トランスフェクションによって、脂質媒介性トランスフェクションによって、またはヌクレオフェクションによって媒介することもできる。ヌクレオフェクションは、核酸基体を細胞質だけでなく核膜を通って、および核内にも送達することを可能にする、改善されたエレクトロポレーション技術である。さらに、本明細書に開示される方法におけるヌクレオフェクションの使用は、一般には、通常のエレクトロポレーションよりもはるかに少ない細胞を必要とする (例えば、通常のエレクトロポレーションでは7百万個であるのと比較してたった約2百万個)。一例では、LONZA (登録商標) NUCLEOFECTOR (商標) システムを使用してヌクレオフェクションを実施する。

30

【0283】

核酸またはタンパク質の細胞への導入は、微量注射によって実現することもできる。mRNAの微量注射は、細胞質内へのものであることが好ましいが (例えば、mRNAを翻訳機構に直接送達するため)、タンパク質またはCasタンパク質をコードするDNAをコードするDNAの微量注射は核内へのものであることが好ましい。あるいは、微量注射は、核内および細胞質内の両方への注射によって行うことができる: まず針を核内に導入し、第1の量を注射し、針を細胞から取り出しながら第2の量を細胞質に注射することができる。ヌクレアーゼ作用剤タンパク質を細胞質内に注射する場合、タンパク質は、核 / 前核への送達を確実にするために、核局在化シグナルを含むことが好ましい。微量注射を実行するための方法は周知である。例えば、Nagyら (Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R.、2003年、*Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press) ; Meyerら (2010年) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、107巻: 15022 ~ 15026頁およびMeyerら (2012年) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、109巻: 935

40

50

4 ~ 9 3 5 9 頁を参照されたい。

【 0 2 8 4 】

核酸またはタンパク質を細胞に導入するための他の方法としては、例えば、ベクター送達、粒子媒介性送達、エキソソーム媒介性送達、脂質ナノ粒子媒介性送達、細胞透過性ペプチド媒介性送達、または埋め込み型デバイス媒介性送達を挙げることができる。 *i n v i v o*において細胞を改変するために核酸またはタンパク質を対象に投与する方法は、本明細書の他の箇所で開示される。

【 0 2 8 5 】

核酸およびタンパク質の細胞への導入は、流体力学的送達 ( H D D ) によって実現することもできる。流体力学的送達は、*i n v i v o*における細胞内 D N A 送達のためのほぼ完全な方法として出現した。実質細胞への遺伝子送達のためには、必須の D N A 配列のみを、選択された血管を介して注射し、現行のウイルスおよび合成ベクターに付随する安全性の懸念を排除する必要がある。血流中に注射されると、D N A は血液が到達可能な種々の組織中の細胞に到達することが可能である。流体力学的送達では、大きく膜不浸透性の化合物が実質細胞に進入することを妨げる内皮および細胞膜の物理的閑門を克服するために大きな体積の溶液を循環中の非圧縮性血液中に急速注射することによって生じる力を使用する。この方法は、D N A 送達に加えて、*i n v i v o*における R N A 、タンパク質、および他の小さな化合物の効率的な細胞内送達に有用である。例えば、あらゆる目的に關してその全体が参考により本明細書に組み込まれる、Bonamassaら ( 2 0 1 1 年 ) P h a r m. Res. 、 2 8 卷 ( 4 号 ) : 6 9 4 ~ 7 0 1 頁を参考されたい。

10

20

【 0 2 8 6 】

核酸またはタンパク質を細胞に導入するための他の方法としては、例えば、ベクター送達、粒子媒介性送達、エキソソーム媒介性送達、脂質ナノ粒子媒介性送達、細胞透過性ペプチド媒介性送達、または埋め込み型デバイス媒介性送達を挙げることができる。特定の例として、核酸またはタンパク質をポリ ( 乳酸 ) ( P L A ) マイクロスフェア、ポリ ( D , L - 乳酸 · ポリグリコール酸共重合体 ) ( P L G A ) マイクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コクリエート、または脂質微小管などの担体に入れて細胞に導入することができる。

【 0 2 8 7 】

核酸またはタンパク質の細胞への導入は、1回またはある期間にわたって多数回実施することができる。例えば、ある期間にわたって少なくとも 2 回、ある期間にわたって少なくとも 3 回、ある期間にわたって少なくとも 4 回、ある期間にわたって少なくとも 5 回、ある期間にわたって少なくとも 6 回、ある期間にわたって少なくとも 7 回、ある期間にわたって少なくとも 8 回、ある期間にわたって少なくとも 9 回、ある期間にわたって少なくとも 10 回、少なくとも 11 回、ある期間にわたって少なくとも 12 回、ある期間にわたって少なくとも 13 回、ある期間にわたって少なくとも 14 回、ある期間にわたって少なくとも 15 回、ある期間にわたって少なくとも 16 回、ある期間にわたって少なくとも 17 回、ある期間にわたって少なくとも 18 回、ある期間にわたって少なくとも 19 回、またはある期間にわたって少なくとも 20 回、導入を実施することができる。

30

40

【 0 2 8 8 】

一部の場合では、方法および組成物に使用される細胞は、それらのゲノムに D N A 構築物が安定に組み入れられている。そのような場合では、接触させることは、細胞に、そのゲノムにすでに安定に組み入れられている構築物をもたらすことを含み得る。例えば、本明細書に開示される方法において使用される細胞は、そのゲノムに安定に組み入れられた既存の C a s をコードする遺伝子を有し得る ( すなわち、C a s の用意ができた細胞 ) 。「安定に組み入れられた」または「安定に導入された」または「安定に組み込まれた」とは、ポリヌクレオチドを細胞に、ヌクレオチド配列が細胞のゲノム内に組み込まれ、その後代に遺伝することができるよう導入することを含む。D N A 構築物または標的ゲノム組込み系の種々の構成成分を安定に組み入れるために任意のプロトコールを使用することができる。

50

## 【0289】

## D. ヌクレアーゼ作用剤およびDNA結合タンパク質

所望の標的配列内にニックもしくは二本鎖切断を誘導する任意のヌクレアーゼ作用剤または所望の標的配列に結合する任意のDNA結合タンパク質を本明細書に開示される方法および組成物に使用することができる。ヌクレアーゼ作用剤が所望の標的配列内にニックまたは二本鎖切断を誘導する限りは、天然に存在するまたはネイティブなヌクレアーゼ作用剤を使用することができる。同様に、DNA結合タンパク質が所望の標的配列に結合する限りは、天然に存在するまたはネイティブなDNA結合タンパク質を使用することができる。あるいは、改変されたまたは工学的に操作されたヌクレアーゼ作用剤またはDNA結合タンパク質を使用することができる。「工学的に操作されたヌクレアーゼ作用剤またはDNA結合タンパク質」は、ネイティブな形態から、所望の標的配列を特異的に認識するように工学的に操作された（改変または誘導された）ヌクレアーゼ作用剤またはDNA結合タンパク質を含む。したがって、工学的に操作されたヌクレアーゼ作用剤またはDNA結合タンパク質は、ネイティブな、天然に存在するヌクレアーゼ作用剤またはDNA結合タンパク質に由来してもよく、人工的に創出または合成することもできる。工学的に操作されたヌクレアーゼ作用剤またはDNA結合タンパク質は標的配列を認識することができ、例えは、標的配列は、ネイティブな（工学的に操作されていないまたは改変されていない）ヌクレアーゼ作用剤またはDNA結合タンパク質によって認識されていた配列ではない。ヌクレアーゼ作用剤またはDNA結合タンパク質の改変は、タンパク質切断作用剤の1アミノ酸または核酸切断作用剤の1ヌクレオチドの小ささであり得る。標的配列または他のDNAにニックまたは二本鎖切断を生じさせることは、本明細書では、標的配列または他のDNAを「カットすること」または「切断すること」と称され得る。

10

20

30

## 【0290】

ヌクレアーゼ作用剤またはDNA結合タンパク質（すなわち、工学的に操作されたヌクレアーゼ作用剤またはDNA結合タンパク質）の活性なバリエントおよび断片も提供される。そのような活性なバリエントは、ネイティブなヌクレアーゼ作用剤またはDNA結合タンパク質に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれよりも大きな配列同一性を含み得、活性なバリエントは、所望の標的配列でカットする能力を保持し、したがって、ニックもしくは二本鎖切断誘導活性を保持するかまたは所望の標的配列に結合する能力を保持する。例えは、本明細書に記載のヌクレアーゼ作用剤のいずれかを、ネイティブなエンドヌクレアーゼ配列から改変することができ、ネイティブなヌクレアーゼ作用剤によっては認識されない標的配列を認識し、そこでニックまたは二本鎖切断を誘導するように設計することができる。したがって、一部の工学的に操作されたヌクレアーゼは、対応するネイティブなヌクレアーゼ作用剤標的配列とは異なる標的配列においてニックまたは二本鎖切断を誘導するための特異性を有する。ニックまたは二本鎖切断誘導活性についてのアッセイは公知であり、一般に、標的配列を含有するDNA基質に対するエンドヌクレアーゼの全体的な活性および特異性を測定する。

## 【0291】

「ヌクレアーゼ作用剤の標的配列」という用語は、ヌクレアーゼ作用剤によってニックまたは二本鎖切断が誘導されるDNA配列を包含する。同様に、「DNA結合タンパク質の標的配列」という用語は、DNA結合タンパク質が結合するDNA配列を包含する。標的配列は、細胞に対して内因性（またはネイティブ）の場合もあり、標的配列は細胞に対して外因性の場合もある。細胞に対して外因性である標的配列は、細胞のゲノムに天然には存在しない。標的配列はまた、標的遺伝子座に位置付けられることが望ましい目的のポリヌクレオチドに対して外因性の場合もある。一部の場合では、標的配列は宿主細胞のゲノムに1回しか存在しない。

40

## 【0292】

例示される標的配列の活性なバリエントおよび断片も提供される。そのような活性なバリエントは、所与の標的配列に対して少なくとも65%、70%、75%、80%、85%

50

、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれよりも大きな配列同一性を含み得、活性なバリアントは、生物活性を保持し、したがって、ヌクレアーゼ作用剤によって配列特異的に認識され、切断されることが可能である。ヌクレアーゼ作用剤による標的配列の二本鎖切断を測定するためのアッセイは公知である（例えば、T A Q M A N（登録商標）q P C R アッセイ、Frendeweyら（2010年）Methods in Enzymology、476巻：295～307頁、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

#### 【0293】

標的配列の長さは、変動し得、例えば、ジンクフィンガータンパク質もしくはジンクフィンガーヌクレアーゼ（Z F N）対に対しては約30～36bp（すなわち、各Z F Nに対して約15～18bp）、転写活性化因子様エフェクター（T A L E）タンパク質もしくは転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）に対しては約36bp、またはC R I S P R / C a s 9 ガイドRNAに対しては約20bpである標的配列を含む。

10

#### 【0294】

D N A 結合タンパク質またはヌクレアーゼ作用剤の標的配列は、標的ゲノム遺伝子座またはその付近の任意の場所に位置付けることができる。標的配列は、遺伝子（例えば、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子）のコード領域内、または遺伝子の発現に影響を及ぼす制御領域内に位置し得る。D N A 結合タンパク質またはヌクレアーゼ作用剤の標的配列は、イントロン、エクソン、プロモーター、エンハンサー、制御領域、またはタンパク質をコードしていない任意の領域内に位置し得る。

20

#### 【0295】

本明細書に開示される種々の方法および組成物において使用することができるD N A 結合タンパク質の1つの型は、転写活性化因子様エフェクター（T A L E）である。T A L E は、例えば、エピジェネティック改変ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写リプレッサードメインと融合または連結することができる。そのようなドメインの例は、下でC a s タンパク質に関して記載されており、例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるW O 2 0 1 1 / 1 4 5 1 2 1においても見出すことができる。対応して、本明細書に開示される種々の方法および組成物において使用することができるヌクレアーゼ作用剤の1つの型は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）である。T A L エフェクターヌクレアーゼは、原核生物または真核生物のゲノム内の特定の標的配列において二本鎖切断を生じさせるために使用することができる配列特異的ヌクレアーゼのクラスである。T A L エフェクターヌクレアーゼは、ネイティブなまたは工学的に操作された転写活性化因子様（T A L ）エフェクター、またはその機能的部分を、F o k Iなどのエンドヌクレアーゼの触媒ドメインと融合することによって創出される。独特のモジュラーT A L エフェクターD N A 結合ドメインにより、潜在的にあらゆる所与のD N A 認識特異性を有するタンパク質の設計が可能になる。したがって、T A L エフェクターヌクレアーゼのD N A 結合ドメインを、特定のD N A 標的部位を認識するように工学的に操作し、したがって、所望の標的配列において二本鎖切断を生じさせるために使用することができる。それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるW O 2 0 1 0 / 0 7 9 4 3 0 ; Morbitzerら（2010年）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、107巻（50号）：21617～21622頁；ScholzeおよびBoch（2010年）Virulence、1巻：428～432頁；Christianら（2010年）Genetics、186巻：757～761頁；Liら（2011年）Nucleic Acids Res.、39巻（1号）：359～372頁；およびMillerら（2011年）Nature Biotechnology、29巻：143～148頁を参照されたい。

30

#### 【0296】

適切なT A L ヌクレアーゼの例、および適切なT A L ヌクレアーゼを調製するための方法は、例えば、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、U S 2 0 1 1 / 0 2 3 9 3 1 5 A 1、U S 2 0 1 1 / 0 2 6 9 2 3 4 A 1、U S 2 0 1 1 / 0 1 4 5 9 4 0 A 1、U S 2 0 0 3 / 0 2 3 2 4 1 0 A 1、U S 2 0 0 5 / 0

40

50

2 0 8 4 8 9 A 1、U S 2 0 0 5 / 0 0 2 6 1 5 7 A 1、U S 2 0 0 5 / 0 0 6 4 4 7 4 A 1、U S 2 0 0 6 / 0 1 8 8 9 8 7 A 1、およびU S 2 0 0 6 / 0 0 6 3 2 3 1 A 1に開示されている。種々の実施形態では、例えば、目的のゲノム遺伝子座の標的核酸配列またはその付近をカットするT A Lエフェクタースクレアーゼを工学的に作製し、ここで、標的核酸配列は、外因性ドナー配列によって改変される配列またはその付近にある。本明細書において提示される種々の方法および組成物と共に使用するのに適したT A Lスクレアーゼとしては、本明細書の他の箇所に記載の外因性ドナー配列によって改変される標的核酸配列またはその付近に結合するように特異的に設計されたものが挙げられる。

【0 2 9 7】

一部のT A L E Nでは、T A L E Nの単量体それが、2つの超可変残基を介して一塩基対を認識する33～35個のT A Lリピートを含む。一部のT A L E Nでは、スクレアーゼ作用剤は、F o k Iエンドスクレアーゼなどの独立したスクレアーゼに作動可能に連結したT A Lリピートに基づくD N A結合ドメインを含むキメラタンパク質である。例えば、スクレアーゼ作用剤は、第1のT A Lリピートに基づくD N A結合ドメインおよび第2のT A Lリピートに基づくD N A結合ドメインを含み、ここで、第1および第2のT A Lリピートに基づくD N A結合ドメインのそれがF o k Iスクレアーゼに作動可能に連結しており、第1および第2のT A Lリピートに基づくD N A結合ドメインが、様々な長さの(12～20bp)スペーサー配列によって分離された標的D N A配列の各鎖内の2つの連続した標的D N A配列を認識し、F o k Iスクレアーゼサブユニットが二量体を形成して、標的配列において二本鎖切断を生じさせる活性スクレアーゼが創出される。

10

【0 2 9 8】

D N A結合タンパク質の別の例は、ジンクフィンガータンパク質である。そのようなジンクフィンガータンパク質は、例えば、エピジェネティック改変ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写リプレッサードメインと連結または融合することができる。そのようなドメインの例は、下でC a sタンパク質に関して記載されており、例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるW O 2 0 1 1 / 1 4 5 1 2 1においても見出すことができる。対応して、本明細書に開示される種々の方法および組成物において使用することができるスクレアーゼ作用剤の別の例は、ジンクフィンガースクレアーゼ(Z F N)である。一部のZ F Nでは、Z F Nの単量体それが3つまたはそれよりも多くのジンクフィンガーに基づくD N A結合ドメインを含み、ジンクフィンガーに基づくD N A結合ドメインそれが、3bpのサブサイトに結合する。他のZ F Nでは、Z F Nは、F o k Iエンドスクレアーゼなどの独立したスクレアーゼに作動可能に連結したジンクフィンガーに基づくD N A結合ドメインを含むキメラタンパク質である。例えば、スクレアーゼ作用剤は、第1のZ F Nおよび第2のZ F Nを含み得、ここで、第1のZ F Nおよび第2のZ F NのそれがF o k Iスクレアーゼサブユニットに作動可能に連結しており、第1および第2のZ F Nが、約5～7bpのスペーサーによって分離された標的D N A配列の各鎖内の2つの連続した標的D N A配列を認識し、F o k Iスクレアーゼサブユニットが二量体を形成して、二本鎖切断を生じさせる活性スクレアーゼが創出される。例えば、それが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、U S 2 0 0 6 / 0 2 4 6 5 6 7；U S 2 0 0 8 / 0 1 8 2 3 3 2；U S 2 0 0 2 / 0 0 8 1 6 1 4；U S 2 0 0 3 / 0 0 2 1 7 7 6；W O 2 0 0 2 / 0 5 7 3 0 8 A 2；U S 2 0 1 3 / 0 1 2 3 4 8 4；U S 2 0 1 0 / 0 2 9 1 0 4 8；W O 2 0 1 1 / 0 1 7 2 9 3 A 2；およびGajら(2013年)Trends in Biotechnology、31巻(7号)：397～405頁を参照されたい。

20

30

【0 2 9 9】

本明細書に記載の方法および組成物に使用するための他の適切なD N A結合タンパク質およびスクレアーゼ作用剤としては、本明細書の他の箇所に記載されているC R I S P R - C a s系が挙げられる。

【0 3 0 0】

D N A結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤は、任意の公知の手段によって細胞に導

40

50

入することができる。DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤をコードするポリペプチドを細胞に直接導入することができる。あるいは、DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤をコードするポリスクレオチドを細胞に導入することができる。DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤をコードするポリスクレオチドを細胞に導入する場合、DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤を細胞内で一過性に、条件付きで、または構成的に発現させることができる。例えば、DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤をコードするポリスクレオチドを発現カセットに含有させ、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターに作動可能に連結することができる。そのようなプロモーターは、本明細書の他の箇所でさらに詳細に論じられている。あるいは、DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤を、DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤をコードするmRNAとして細胞に導入することができる。

#### 【0301】

DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤をコードするポリスクレオチドを細胞のゲノム内に安定に組み込み、細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結することができる。あるいは、DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤をコードするポリスクレオチドを標的化ベクター内または挿入ポリスクレオチドを含む標的化ベクターとは別のベクターもしくはプラスミド内に入れることができる。

#### 【0302】

DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤を、DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤をコードするポリスクレオチドの導入によって細胞にもたらす場合、DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤をコードするそのようなポリスクレオチドを、DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤をコードする天然に存在するポリスクレオチド配列と比較して、目的の細胞において使用の頻度が高いコドンに置換されるように改変することができる。例えば、DNA結合タンパク質またはスクレアーゼ作用剤をコードするポリスクレオチドを、天然に存在するポリスクレオチド配列と比較して、細菌細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞または任意の他の目的の宿主細胞を含めた目的の所与の原核細胞または真核細胞において使用の頻度が高いコドンに置換されるように改変することができる。

#### 【0303】

##### E. CRISPR-Cas系

本明細書に開示される方法では、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(CRISPR)/CRISPR関連(Cas)系またはそのような系の構成成分を利用して細胞内のゲノムを改変することができる。CRISPR-Cas系は、転写産物およびCas遺伝子の発現に関与する、またはCas遺伝子の活性を方向付ける他のエレメントを含む。CRISPR-Cas系は、I型、II型、またはII型系であり得る。あるいは、CRISPR/Cas系は、例えば、V型系(例えば、V-A型またはV-B型)であり得る。本明細書に開示される方法および組成物では、核酸の部位特異的切断のためにCRISPR複合体(Casタンパク質と複合体を形成したガイドRNA(gRNA)を含む)を利用することによってCRISPR-Cas系を使用することができる。

#### 【0304】

本明細書に開示される方法において使用されるCRISPR-Cas系は、天然に存在しないものであり得る。「天然に存在しない」系は、それらの天然に存在する状態から変更もしくは突然変異させたか、自然には天然に付随する少なくとも1つの他の構成成分を少なくとも実質的に含まないか、または、天然には付随しない少なくとも1つの他の構成成分が付随する系の1つまたは複数の構成成分などの、人間の手の関与を示す任意のものを含む。例えば、天然に存在しないCRISPR/Cas系では、天然には一緒に存在しないgRNAおよびCasタンパク質、天然には存在しないCasタンパク質、または天然には存在しないgRNAを含むCRISPR複合体を使用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 3 0 5 】

(1) *Cas*タンパク質および*Cas*タンパク質をコードするポリヌクレオチド

Casタンパク質は、一般に、ガイドRNA(gRNA、下でより詳細に記載されている)と相互作用し得る少なくとも1つのRNA認識または結合ドメインを含む。Casタンパク質はまた、ヌクレアーゼドメイン(例えば、DNaseまたはRNaseドメイン)、DNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、タンパク質間相互作用ドメイン、二量体形成ドメイン、および他のドメインも含み得る。ヌクレアーゼドメインは、核酸分子の共有結合の切断を含む核酸切断に対する触媒活性を有する。切断により、平滑末端または付着末端が生じ得、これは一本鎖または二本鎖であり得る。例えば、野生型Cas9タンパク質は、一般には平滑切断生成物を創出させる。あるいは、野生型Cpf1タンパク質(例えば、FnCpf1)は5ヌクレオチド5'突出部を有する切断生成物を生じさせることができ、切断は非標的化鎖のPAM配列から18番目の塩基対の後ろおよび標的化鎖の23番目の塩基の後ろで起こる。Casタンパク質は、HSD17B13遺伝子に二本鎖切断(例えば、平滑末端を伴う二本鎖切断)を創出させるのに十分な切断活性を有してもよく、HSD17B13遺伝子において一本鎖切断を創出するニッカーゼであってもよい。

10

【 0 3 0 6 】

Casタンパク質の例としては、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e (CasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9 (Csn1またはCsn12)、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1 (CasA)、Cse2 (CasB)、Cse3 (CasE)、Cse4 (CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、Csax、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、およびCui966、ならびにそのホログまたは改変バージョンが挙げられる。

20

〔 0 3 0 7 〕

30

40

50

*Natranaerobius thermophilus*、*Pelotomaculum thermopropionicum*、*Acidithiobacillus caldus*、*Acidithiobacillus ferrooxidans*、*Allochromatium vinosum*、*Marinobacter sp.*、*Nitrosooccus halophilus*、*Nitrosococcus watsoni*、*Pseudoalteromonas haloplanktis*、*Ktedonobacter racemifer*、*Methanohalobium evestigatum*、*Anabaena variabilis*、*Nodularia spumigena*、*Nostoc sp.*、*Arthrospira maxima*、*Arthrospira platensis*、*Arthrospira sp.*、*Lyngbya sp.*、*Microcoleus chthonoplastes*、*Oscillatoria sp.*、*Petrotoga mobilis*、*Thermosiphon africanus*、または*Acaryochloris marina*に由来する。Cas9ファミリーメンバーのさらなる例は、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2014/131833に記載されている。S. pyogenes由来のCas9(SpCas9)(SwissProt受託番号Q99ZW2が割り当てられる)は例示的なCas9タンパク質である。S. aureus由来のCas9(SaCas9)(UniProt受託番号J7RUA5が割り当てられる)は別の例示的なCas9タンパク質である。

## 【0308】

Casタンパク質の別の例は、Cpf1(PrevotellaおよびFrancisella11a1由来のCRISPR)タンパク質である。Cpf1は、Cas9の特有のアルギニンリッチクラスターに対する対応物と一緒に、Cas9の対応するドメインと相同なRuvC様ヌクレアーゼドメインを含有する大きなタンパク質(約1300アミノ酸)である。しかし、Cpf1は、Cas9タンパク質に存在するHNHヌクレアーゼドメインを欠き、RuvC様ドメインは、Cpf1配列では連続しており、それとは対照的に、Cas9ではHNHドメインを含む長い挿入物を含有する。例えば、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれるZetscheら(2015年)Cell、163巻(3号):759~771頁を参照されたい。例示的なCpf1タンパク質は、Francisella tularensis 1、Francisella tularensis subsp. novicida、Prevotella albensis、Lachnospiraceae bacterium MC2017 1、Butyribrio proteoclasticus、Peregrinibacteria bacterium GW2011\_GWA2\_33\_10、Parcubacteria bacterium GW2011\_GWC2\_44\_17、Smithella sp. SCADC、Acidaminococcus sp. BV3L6、Lachnospiraceae bacterium MA2020、Candidatus Methanoplasma termitum、Eubacterium eligens、Moraxella bovoculi 237、Leptospira inadai、Lachnospiraceae bacterium ND2006、Porphyromonas crevioricanis 3、Prevotella disiens、およびPorphyromonas macacaeに由来する。Francisella novicida U1112由来のCpf1(FnCpf1; UniProt受託番号A0Q7Q2に割り当てられる)は例示的なCpf1タンパク質である。

## 【0309】

Casタンパク質は、野生型タンパク質(すなわち、天然に存在するもの)、改変Casタンパク質(すなわち、Casタンパク質バリエント)、または野生型もしくは改変Casタンパク質の断片であってよい。Casタンパク質はまた、野生型または改変Casタンパク質の触媒活性に關して活性なバリエントまたは断片であってもよい。触媒活性に關して活性なバリエントまたは断片は、野生型または改変Casタンパク質またはその一部

10

20

30

40

50

に対して少なくとも 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %またはそれよりも大きな配列同一性を含み得、 活性な バリアントは、 所望の切断部位をカットする能力を保持し、 したがって、 ニック誘導活性または二本鎖切断誘導活性を保持する。 ニック誘導活性または二本鎖切断誘導活性についてのアッセイは公知であり、 一般に、 切断部位を含有する D N A 基質に対する C a s タンパク質の全体的な活性および特異性を測定する。

#### 【 0 3 1 0 】

C a s タンパク質を、 核酸結合親和性、 核酸結合特異性、 および酵素活性のうちの 1 つまたは複数が増大または低減するように改変することができる。 C a s タンパク質を、 安定性などの、 タンパク質の任意の他の活性または性質が変化するように改変することもできる。 例えば、 C a s タンパク質の 1 つまたは複数のヌクレアーゼドメインを改変するか、 欠失させるか、 または不活化することもでき、 C a s タンパク質を、 タンパク質の機能に必須ではないドメインを取り除くため、 または C a s タンパク質の活性を最適化する（ 例えれば、 増強するか、 または低下させる ）ために短縮することもできる。

10

#### 【 0 3 1 1 】

C a s タンパク質は、 D N a s e ドメインなどの少なくとも 1 つのヌクレアーゼドメインを含み得る。 例えば、 野生型 C p f 1 タンパク質は、 一般に、 おそらく二量体立体配置にある標的 D N A の両方の鎖を切断する R u v C 様ドメインを含む。 C a s タンパク質はまた、 D N a s e ドメインなどの少なくとも 2 つのヌクレアーゼドメインも含み得る。 例えれば、 野生型 C a s 9 タンパク質は、 一般に、 R u v C 様ヌクレアーゼドメインおよび H N H 様ヌクレアーゼドメインを含む。 R u v C および H N H ドメインは、 それぞれ二本鎖 D N A の異なる鎖をカットして、 D N A における二本鎖切断を生じさせることができる。 例えれば、 あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる Jinek ら（ 2 0 1 2 年） Science、 3 3 7 卷： 8 1 6 ~ 8 2 1 頁を参照されたい。

20

#### 【 0 3 1 2 】

ヌクレアーゼドメインの 1 つまたは複数を欠失させるかまたは突然変異させ、 その結果、 もはや機能的でなくなるかまたは低下したヌクレアーゼ活性を有するようにすることができる。 例えば、 C a s 9 タンパク質のヌクレアーゼドメインの 1 つを欠失させるかまたは突然変異させる場合、 得られる C a s 9 タンパク質は、 ニッカーゼと称することができ、 二本鎖 D N A 内のガイド R N A 標的配列に一本鎖切断を生じさせることができるが、 二本鎖切断を生じさせることはできない（ すなわち、 相補鎖または非相補鎖を切断できるが、 両方は切断できない ）。 ヌクレアーゼドメインの両方を欠失させるかまたは突然変異させる場合、 得られる C a s タンパク質（ 例えれば、 C a s 9 ）は、 二本鎖 D N A の両方の鎖を切断する能力が低下している（ 例えれば、 ヌクレアーゼヌルもしくはヌクレアーゼ不活性 C a s タンパク質、 または触媒として機能しない C a s タンパク質（ d C a s ） ）。 C a s 9 をニッカーゼに変換する突然変異の例は、 S . p y o g e n e s 由来の C a s 9 の R u v C ドメインにおける D 1 0 A ( C a s 9 の 1 0 位におけるアスパラギン酸からアラニンへの ) 突然変異である。 同様に、 S . p y o g e n e s 由来の C a s 9 の H N H ドメインにおける H 9 3 9 A ( アミノ酸 8 3 9 位においてヒスチジンからアラニンへ ) または H 8 4 0 A ( アミノ酸 8 4 0 位においてヒスチジンからアラニンへ ) により、 C a s 9 をニッカーゼに変換することができる。 C a s 9 をニッカーゼに変換する突然変異の他の例としては、 S . t h e r m o p h i l u s 由来の C a s 9 に対応する突然変異が挙げられる。 例えれば、 それそれが、 あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる Sapranauskas ら（ 2 0 1 1 年） Nucleic Acids Research、 3 9 卷： 9 2 7 5 ~ 9 2 8 2 頁および W O 2 0 1 3 / 1 4 1 6 8 0 を参照されたい。 そのような突然変異は、 部位特異的突然変異誘発、 P C R 媒介性突然変異誘発、 または全遺伝子合成などの方法を使用して生じさせることができる。 ニッカーゼを創出させる他の突然変異の例は、 例えれば、 それそれが、 あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 1 3 / 1 7 6 7 7 2 および W O 2 0 1 3 / 1 4 2 5 7 8 において見出すことができる。

30

#### 【 0 3 1 3 】

40

50

C<sub>a</sub>sタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ活性C<sub>a</sub>sタンパク質またはヌクレアーゼ不活性C<sub>a</sub>sタンパク質）を異種ポリペプチドに作動可能に連結して融合タンパク質とすることもできる。例えば、C<sub>a</sub>sタンパク質を切断ドメイン、エピジェネティック改変ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写リプレッサードメインと融合することができる。あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるWO 2014/089290を参照されたい。転写活性化ドメインの例としては、単純ヘルペスウイルスVP16活性化ドメイン、VP64（VP16の四量体誘導体）、NF-B p65活性化ドメイン、p53活性化ドメイン1および2、CREB（cAMP反応エレメント結合タンパク質）活性化ドメイン、E2A活性化ドメイン、ならびにNFKB（活性化されたT細胞の核因子）活性化ドメインが挙げられる。他の例として、Oct1、Oct-2A、SP1、AP-2、CTF1、P300、CBP、PCAF、SRC1、PVALF、ERF-2、OsgAI、HALF-1、C1、AP1、ARF-5、ARF-6、ARF-7、ARF-8、CPRF1、CPRF4、MYC-RP/GP、TRAB1PC4、およびHSF1の活性化ドメインが挙げられる。例えば、それぞれがあらゆる目的に関してその全体が参照により組み込まれるUS 2016/0237456、EP 3045537、およびWO 2011/145121を参照されたい。一部の場合では、MS2-p65-HSF1と対合したdC<sub>a</sub>s9-VP64融合タンパク質を含む転写活性化系を使用することができる。そのような系では、ガイドRNAを、二量体を形成したMS2バクテリオファージコートタンパク質と結合するように設計されたsgRNAテトラループおよびシステムループ2に付加されたアプタマー配列を用いて設計することができる。例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるKonermannら（2015年）Nature、517巻（7536号）：583～588頁を参照されたい。転写リプレッサードメインの例としては、誘導性cAMP初期リプレッサー（ICER）ドメイン、Kruppel関連ボックスA（KRAB-A）リプレッサードメイン、YY1グリシンリッチリプレッサードメイン、Sp1様リプレッサー、E(spl)リプレッサー、リプレッサー、およびMeCP2が挙げられる。他の例として、A/B、K0X、TG F-ベータ誘導性初期遺伝子（TIEG）、v-erbA、SID、SID4X、MBD2、MBD3、DNMT1、DNMG3A、DNMT3B、Rb、ROM2に由来する転写リプレッサードメインが挙げられる。例えば、それぞれがあらゆる目的に関してその全体が参照により組み込まれる、EP 3045537およびWO 2011/145121を参照されたい。C<sub>a</sub>sタンパク質を、安定性の増大または低減をもたらす異種ポリペプチドと融合することもできる。融合したドメインまたは異種ポリペプチドは、C<sub>a</sub>sタンパク質のN末端、C末端、または内部に位置し得る。

#### 【0314】

一例として、C<sub>a</sub>sタンパク質を、細胞内局在化をもたらす異種ポリペプチドと融合することができる。そのような異種ポリペプチドとしては、例えば、核へのターゲティングのためのSV40 NLSなどの1つまたは複数の核局在化シグナル（NLS）、ミトコンドリアへのターゲティングのためのミトコンドリア局在化シグナル、ER保持シグナルなどを挙げることができる。例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるLangeら（2007年）J. Biol. Chem.、282巻：5101～5105頁を参照されたい。そのような細胞内局在化シグナルは、C<sub>a</sub>sタンパク質のN末端、C末端、またはC<sub>a</sub>sタンパク質内の任意の場所に位置し得る。NLSは、塩基性アミノ酸のひと続きを含んでよく、また、一分配列であっても二分配列であってもよい。

#### 【0315】

C<sub>a</sub>sタンパク質を細胞透過性ドメインと作動可能に連結することもできる。例えば、細胞透過性ドメインは、HIV-1 TATタンパク質、ヒトB型肝炎ウイルス由来のTLR細胞透過性モチーフ、MPG、Pep-1、VP22、単純ヘルペスウイルス由来の細胞透過性ペプチド、またはポリアルギニンペプチド配列に由来してよい。例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるWO 2014/089290を参照されたい。細胞透過性ドメインは、C<sub>a</sub>sタンパク質のN末端、C末端、または

10

20

30

40

50

Casタンパク質内の任意の場所に位置し得る。

【0316】

Casタンパク質を蛍光タンパク質、精製タグ、またはエピトープタグなどの追跡または精製をしやすくするための異種ポリペプチドに作動可能に連結することもできる。蛍光タンパク質の例としては、緑色蛍光タンパク質(例えば、GFP、GFP-2、tag GFP、turboGFP、eGFP、Emerald、Azami Green、Monomeric Azami Green、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1)、黄色蛍光タンパク質(例えば、YFP、eYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1)、青色蛍光タンパク質(例えば、eBFP、eBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、T-sapphire)、シアン蛍光タンパク質(例えば、eCFP、Cerulean、Cypet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan)、赤色蛍光タンパク質(例えば、mKate、mKate2、mPlum、DsRed単量体、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRasperry、mStrawberry、Jred)、オレンジ蛍光タンパク質(例えば、mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato)、および任意の他の適切な蛍光タンパク質が挙げられる。タグの例としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、キチン結合タンパク質(CBP)、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン(TRX)、ポリ(NANP)、タンデムアフィニティー精製(TAP)タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、赤血球凝集素(HA)、nus、Softag1、Softag3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、ヒスチジン(His)、ビオチンカルボキシル担体タンパク質(BCCP)、およびカルモジュリンが挙げられる。

【0317】

Casタンパク質を外因性ドナー配列または標識された核酸に係留することもできる。そのような係留(すなわち、物理的連結)は、共有結合性相互作用または非共有結合性相互作用によって実現することができ、係留は直接的であってもよく(例えば、直接融合またはタンパク質上のシステインもしくはリシン残基の修飾またはインティン修飾によって実現することができる化学的なコンジュゲーションによる)、ストレプトアビジンまたはアプタマーなどの1つまたは複数の介在するリンカーまたはアダプター分子を通じて実現することもできる。例えば、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Pierceら(2005年) *Mini Rev. Med. Chem.*、5巻(1号):41~55頁; Duckworthら(2007年) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*、46巻(46号):8819~8822頁; SchaefferおよびDixon(2009年) *Australian J. Chem.*、62巻(10号):1328~1332頁; Goodmanら(2009年) *Chembiochem.*、10巻(9号):1551~1557頁; ならびにKhatwaniら(2012年) *Bioorg. Med. Chem.*、20巻(14号):4532~4539頁を参照されたい。タンパク質-核酸コンジュゲートを合成するための非共有結合性戦略としては、ビオチン-ストレプトアビジン法およびニッケル-ヒスチジン法が挙げられる。共有結合性タンパク質-核酸コンジュゲートを、適切に官能性をもたせた核酸およびタンパク質を多種多様な化学を使用して接続することによって合成することができる。これらの化学の一部は、オリゴヌクレオチドをタンパク質表面上のアミノ酸残基に直接付着させることを伴い(例えば、リシンアミンまたはシステインチオール)、他のより複雑なスキームは、タンパク質の翻訳後修飾または触媒もしくは反応性タンパク質ドメインの関与を必要とする。タンパク質を核酸に共有結合により付着させるための方法としては、例えば、オリゴヌクレオチドとタンパク質のリシンまたはシステイン残基の化学的架橋、発現タンパク質ライゲーション、化学酵素法、および光アプタマーの使用を挙げることができる。外因性ドナ

10

20

30

30

40

50

一配列または標識された核酸を C a s タンパク質の C 末端、 N 末端、または内部の領域に係留することができる。外因性ドナー配列または標識された核酸を C a s タンパク質の C 末端または N 末端に係留することができる。同様に、 C a s タンパク質を外因性ドナー配列または標識された核酸の 5' 末端、 3' 末端、または内部の領域に係留することができる。すなわち、外因性ドナー配列または標識された核酸を任意の配向および極性で係留することができる。 C a s タンパク質を外因性ドナー配列または標識された核酸の 5' 末端または 3' 末端に係留することができる。

#### 【 0 3 1 8 】

C a s タンパク質は、任意の形態でもたらすことができる。例えば、 C a s タンパク質を、 g R N A と複合体を形成した C a s タンパク質などのタンパク質の形態でもたらすことができる。あるいは、 C a s タンパク質を、 R N A ( 例えは、メッセンジャー R N A ( m R N A ) ) または D N A などの、 C a s タンパク質をコードする核酸の形態でもたらすことができる。必要に応じて、 C a s タンパク質をコードする核酸を、特定の細胞または生物体におけるタンパク質への効率的な翻訳のためにコドン最適化することができる。例えば、 C a s タンパク質をコードする核酸を、天然に存在するポリヌクレオチド配列と比較して、細菌細胞、酵母細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、または任意の他の目的の宿主細胞において使用の頻度が高いコドンに置換されるように改変することができる。 C a s タンパク質をコードする核酸を細胞に導入する場合、 C a s タンパク質は、細胞において一過性に、条件付きで、または構成的に発現させることができる。

10

#### 【 0 3 1 9 】

C a s タンパク質をコードする核酸を細胞のゲノムに安定に組み込み、細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結することができる。あるいは、 C a s タンパク質をコードする核酸を発現構築物中でプロモーターに作動可能に連結することができる。発現構築物は、目的の遺伝子または他の核酸配列 ( 例えは、 C a s 遺伝子 ) の発現を導くことができ、そのような目的の核酸配列を標的細胞に移行させることができる任意の核酸構築物を含む。例えば、 C a s タンパク質をコードする核酸は、核酸挿入物を含む標的化ベクターおよび / または g R N A をコードする D N A を含むベクター内に入れることができる。あるいは、 C a s タンパク質をコードする核酸は、核酸挿入物を含む標的化ベクターとは別の、かつ / または g R N A をコードする D N A を含むベクターとは別のベクターまたはプラスミド内に入れることができる。発現構築物に使用することができるプロモーターは、例えは、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、ウサギ細胞、多能性細胞、胚性幹 ( E S ) 細胞、または接合体の 1 つまたは複数において活性なプロモーターを含む。そのようなプロモーターは、例えは、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターであってよい。必要に応じて、プロモーターは、 C a s タンパク質の一方向の発現およびガイド R N A の他方向の発現の両方を駆動する双方向プロモーターであってよい。そのような双方向プロモーターは、 ( 1 ) 3 つの外部制御エレメント : 遠位配列エレメント ( D S E ) 、近位配列エレメント ( P S E ) 、および T A T A ボックスを含有する完全な従来の一方向 P o l I I I プロモーター；ならびに ( 2 ) P S E および D S E の 5' 末端と逆配向で融合した T A T A ボックスを含む第 2 の基本的な P o l I I I プロモーターからなり得る。例えは、 H 1 プロモーターでは、 D S E は P S E および T A T A ボックスと隣接しており、 U 6 プロモーターに由来する P S E および T A T A ボックスを付加することによって逆方向の転写が制御されるハイブリッドプロモーターを創出することによってプロモーターを双方向性にすることができる。例えは、その全体があらゆる目的に関して参照により本明細書に組み込まれる U S 2 0 1 6 / 0 0 7 4 5 3 5 を参照されたい。 C a s タンパク質をコードする遺伝子およびガイド R N A をコードする遺伝子を同時に発現させるために双方向プロモーターを使用することにより、送達を容易にするための緻密な発現力セットの生成が可能になる。

20

#### 【 0 3 2 0 】

30

40

50

## (2) ガイド RNA

「ガイド RNA」または「g RNA」は、Cas タンパク質（例えば、Cas9 タンパク質）に結合し、Cas タンパク質を標的 DNA（例えば、HSD17B13 遺伝子）内の特定の場所にターゲティングする RNA 分子である。特に、Cas 酵素を、HSD17B13 遺伝子座または HSD17B13 遺伝子に結合するか、またはそれを切断するように方向付けるのに有効なガイド RNA が本明細書に開示される。1つの例示的なガイド RNA は、Cas 酵素を、HSD17B13 遺伝子に結合するか、またはそれを切断するように方向付けるのに有効なガイド RNA であって、HSD17B13 遺伝子を配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 の 12666 位に対応する位置を含むかまたはその位置に近接している、HSD17B13 遺伝子内のガイド RNA 認識配列とハイブリダイズする（すなわち、ガイド RNA 標的配列を標的とする）DNA 標的化セグメントを含む、ガイド RNA である。ガイド RNA 標的配列を標的とするとは、非相補鎖上のガイド RNA 標的配列の逆相補物である相補鎖配列とハイブリダイズすることを意味する。例えば、ガイド RNA 標的配列は、HSD17B13 遺伝子を配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 の 12666 位に対応する位置から約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、300、400、500、または 1,000 ヌクレオチドの範囲内の場合がある。他の例示的なガイド RNA は、HSD17B13 遺伝子を配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 のエクソン 6 および / またはイントロン 6 に対応する領域内である、HSD17B13 遺伝子内のガイド RNA 標的配列を標的とする DNA 標的化セグメントを含む。他の例示的なガイド RNA は、HSD17B13 遺伝子の開始コドンを含むかもしくはそれに近接しているまたは HSD17B13 遺伝子の終止コドンを含むかもしくはそれに近接している、HSD17B13 遺伝子内のガイド RNA 認識配列とハイブリダイズする（すなわち、ガイド RNA 標的配列を標的とする）DNA 標的化セグメントを含む。例えば、ガイド RNA 標的配列は、開始コドンから約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、300、400、500、もしくは 1,000 ヌクレオチドの範囲内、または終止コドンから約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、300、400、500、もしくは 1,000 ヌクレオチドの範囲内の場合がある。例えば、ガイド RNA 標的配列は、HSD17B13 遺伝子を配列番号 1 または 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 または 2 のエクソン 1 に対応する領域の範囲内の場合がある。同様に、ガイド RNA 標的配列は、HSD17B13 遺伝子を配列番号 1 または 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 または 2 のエクソン 7 に対応する領域の範囲内の場合がある。HSD17B13 遺伝子は、任意の生物体に由来する HSD17B13 遺伝子であってよい。例えば、HSD17B13 遺伝子は、ヒト HSD17B13 遺伝子または非ヒト哺乳動物、齧歯類、マウス、またはラットなどの別の生物体に由来するオルソログであってよい。

## 【0321】

ヒト HSD17B13 遺伝子の 5' 末端のガイド RNA 標的配列の例は、配列番号 20 ~ 81 に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、下記の表に記載されている。配列番号 20 ~ 81 に対応するガイド RNA DNA 標的化セグメントの例は、下記の表に記載されており、チミンの代わりにウラシルである以外は配列番号 20 ~ 81 と同一である。ガイド RNA DNA 標的化セグメントは、下記の表に記載の DNA 標的化セグメント配列のいずれかを含み得るか、それから本質的になり得るか、またはそれからなり得る。ヒト HSD17B13 遺伝子の転写開始部位 (TSS) に隣接するガイド RNA 標的配列の例は、配列番号 20 ~ 41 に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、下記の表に記載されている。TSS に隣接する例示的なガイド RNA 標的配列は、配列番号 21 ~ 23、33、および 35 を含む。配列番号 33

10

20

30

40

50

および 3' 5' は、TSS に最も近い。ヒト HSD17B13 遺伝子の 5' 末端のガイド RNA 標的配列に対応する例示的な cRNA および sgRNA (足場バージョン 1, 2, 3, または 4 を含む) は、下記の表に記載の配列のいずれかを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【0322】

【表 D】

ヒト HSD17B13 遺伝子の 5' 末端にあるガイド RNA 標的配列

番	PAM	ガイド RNA 標的配列	配列番号						
			gRNA 標的配列	DNA 標的化セグメント	crRNA	sgRNA			
						v1	v2	v3	v4
-	GGG	TGTCAGGTTAGTTAGATGAA	42	1423	270	500	730	960	1190
-	AGG	GITGICAGGTAGTTAGATGAA	43	1424	271	501	731	961	1191
+	AGG	CCTGACACATATACAGACTAA	44	1425	272	502	732	962	1192
+	GGG	CTGACACATATACAGACTAA	45	1426	273	503	733	963	1193
-	AGG	CCTTAGTCTGTATATGTGTC	46	1427	274	504	734	964	1194
+	AGG	CATATACAGACTAAAGGGACC	47	1428	275	505	735	965	1195
+	GGG	ATATACAGACTAAAGGGACC	48	1429	276	506	736	966	1196
-	TGG	TCAAAGTTTGTATAATTCCC	49	1430	277	507	737	967	1197
+	TGG	AAAATACAAAGATAAGTAGA	50	1431	278	508	738	968	1198
+	TGG	ACTCTGTGACTTTAAAAGT	51	1432	279	509	739	969	1199
-	AGG	GGTITCTGTGGATATTATAA	52	1433	280	510	740	970	1200
-	GGG	ACAGAGCATATTGGTTCTGT	53	1434	281	511	741	971	1201
-	TGG	GACAGAGCATATTGGTTCTG	54	1435	282	512	742	972	1202
-	TGG	TGCAAAACGACAGAGCATAT	55	1436	283	513	743	973	1203
-	AGG	GAGCTGGGCATGGATAGGC	56	1437	284	514	744	974	1204
-	AGG	ACTGGAGCTGGGCATGGAAAT	57	1438	285	515	745	975	1205
-	TGG	CTCATTACTGGAGCTGGCA	58	1439	286	516	746	976	1206
-	GGG	TIGTTCTCTTACTGGAGCT	59	1440	287	517	747	977	1207
-	TGG	ATTGTTCTCATTACTGGAGC	60	1441	288	518	748	978	1208
-	TGG	GGGGAGATTGTCTCATTAC	61	1442	289	519	749	979	1209
-	GGG	GAGGGAGAAAATCTGTGGCTG	62	1443	290	520	750	980	1210
-	GGG	AGAGGAGAAAATCTGTGGCT	63	1444	291	521	751	981	1211
-	TGG	CAGAGGAGAAAATCTGTGGC	64	1445	292	522	752	982	1212
-	TGG	TCCTCAGAGGAGAAAATCTG	65	1446	293	523	753	983	1213
-	AGG	TGAAGTTTTCACTCTCTAG	20	1447	294	524	754	984	1214
+	AGG	CTTCACCAACGACTCCAAGT	21	1448	295	525	755	985	1215
-	TGG	CTACTCCTACTTGGAGTCGT	22	1449	296	526	756	986	1216
+	TGG	CTCCAAGTAGGAGTAGATGAA	23	1450	297	527	757	987	1217
-	TGG	CACCATCATCTACTCCTACT	24	1451	298	528	758	988	1218
+	AGG	TGATGGTGTAGCAGAACGAGA	25	1452	299	529	759	989	1219
+	AGG	TCAGAACGAGAACGGATTCT	26	1453	300	530	760	990	1220
+	TGG	GATITCTAGGATGATGTCA	27	1454	301	531	761	991	1221
+	TGG	TTGCTCTGTCTCTCTCTTC	28	1455	302	532	762	992	1222
-	AGG	AGGACTGAACCGAGAACGAGA	29	1456	303	533	763	993	1223
-	AGG	TACACAAGGACTGAACCGAGA	30	1457	304	534	764	994	1224
+	AGG	TCAGTCCTTGTGTAGTCCT	31	1458	305	535	765	995	1225
+	GGG	TCAGTCCTTGTGTAGTCCTA	32	1459	306	536	766	996	1226
+	AGG	GTCCTTGTGTAGTCCTAGGG	33	1460	307	537	767	997	1227
+	AGG	CTTGTGTAGTCCTAGGGAGG	34	1461	308	538	768	998	1228
-	AGG	CTCCTCCCTAGGACTACACA	35	1462	309	539	769	999	1229
-	AGG	GTAGACAGTACCCCTCTCCCT	36	1463	310	540	770	1000	1230
+	AGG	TACTGTCTACACAGAGCT	37	1464	311	541	771	1001	1231
+	GGG	ACTGTCTACACAGAGCTCTA	38	1465	312	542	772	1002	1232
+	AGG	TCTACACAGAGCTCTAGGG	39	1466	313	543	773	1003	1233
+	GGG	CTACACAGAGCTCTAGGGAA	40	1467	314	544	774	1004	1234
+	GGG	TACACAGAGCTCTAGGGAA	41	1468	315	545	775	1005	1235
+	TGG	GGGGTGTGCCAGTTGTTAA	66	1469	316	546	776	1006	1236
+	GGG	GGGTGTGCCAGTTGTTAA	67	1470	317	547	777	1007	1237
-	GGG	TGGTAGTCCCCTTAAACAACT	68	1471	318	548	778	1008	1238
-	TGG	CTGGTAGTCCCCTTAAACAACT	69	1472	319	549	779	1009	1239
+	TGG	TIGTTAATGGGACTTACCAAGA	70	1473	320	550	780	1010	1240
+	TGG	TACCAAGATGGAAGCCAGCTT	71	1474	321	551	781	1011	1241
-	TGG	TTCCAAAGCTGCCATTCAC	72	1475	322	552	782	1012	1242
+	AGG	TGGAAGGCCAGCTTGGAAAGC	73	1476	323	553	783	1013	1243
-	TGG	ACAAGGCCTGCTTCAAAAGC	74	1477	324	554	784	1014	1244
+	TGG	GCCTGTTCACGTGTTCTAA	75	1478	325	555	785	1015	1245
+	GGG	CCTGTTCACGTGTTCTAA	76	1479	326	556	786	1016	1246
-	AGG	CCCATAGAACACGTGAACA	77	1480	327	557	787	1017	1247
-	AGG	TIGGCATCACTCATATTG	78	1481	328	558	788	1018	1248
-	TGG	CTTGTGCTTGGCATCACT	79	1482	329	559	789	1019	1249
-	TGG	AGCACACCTCTTGTGCTCT	80	1483	330	560	790	1020	1250
+	TGG	GCACAAAGAGAGTGTGCTCTC	81	1484	331	561	791	1021	1251

【0323】

ヒト HSD17B13 遺伝子の 3' 末端のガイド RNA 標的配列の例は、配列番号 82 ~ 225 に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、下記の表に記載されている。配列番号 82 ~ 225 に対応するガイド RNA-DNA 標的化セグメン

10

20

30

40

50

トの例は、それぞれ、チミンの代わりにウラシルである以外は配列番号 82 ~ 225 と同一である配列番号 1485 ~ 1628 に記載されている。ガイド RNA DNA 標的化セグメントは、配列番号 1485 ~ 1628 に記載の配列のいずれかを含み得るか、それから本質的になり得るか、またはそれからなり得る。ヒト HSD17B13 遺伝子の 3' 末端のガイド RNA 標的配列に対応する例示的な cRNA および sRNA (足場バージョン 1、2、3、または 4 を含む) は、下記の表に記載の配列のいずれかを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【0324】

【表 E - 1】

ヒト HSD17B13 遺伝子の 3' 末端にあるガイド RNA 標的配列

10

概	PAM	ガイド RNA 標的配列	配列番号					
			gRNA 標的配列	crRNA	sgRNA			
					v1	v2	v3	
+	AGG	GCTTAATCTCACACATAGAA	82	332	562	792	1022	1252
+	GGG	CTTAATCTCACACATAGAAA	83	333	563	793	1023	1253
+	GGG	TTAACCTCACACATAGAAAG	84	334	564	794	1024	1254
-	TGG	AGGAGTGCTGTTTATCAAC	85	335	565	795	1025	1255
-	TGG	TCTTTGACAGCAGGAGTGC	86	336	566	796	1026	1256
-	AGG	ACTCTGGTTCTTGACAGC	87	337	567	797	1027	1257
+	TGG	ACCAGAGTTGAGAAAACCC	88	338	568	798	1028	1258
-	TGG	TCCAGGGTTTCTCAACT	89	339	569	799	1029	1259
-	GGG	CAGTTATTAATGAATCCAG	90	340	570	800	1030	1260
-	GGG	GCAGTTATTAATGAATCCA	91	341	571	801	1031	1261
-	AGG	GGCAGTTATTAATGAATCC	92	342	572	802	1032	1262
-	TGG	TGAGTGTCTCTAAGAACCA	93	343	573	803	1033	1263
+	TGG	GCTGTACCATCCACATCCT	94	344	574	804	1034	1264
-	TGG	TCAAGAACCAAGGATGTGGA	95	345	575	805	1035	1265
-	TGG	TCCTCAAGAACCAAGGATG	96	346	576	806	1036	1266
-	AGG	TGAGTGTCTCTAAGAACCA	97	347	577	807	1037	1267
+	AGG	TTTATTTTAACTAACAAAG	98	348	578	808	1038	1268
+	AGG	TTGTTTTTAAATAAAACAAG	99	349	579	809	1039	1269
-	TGG	TATTATAGAATGCTTIGCA	100	350	580	810	1040	1270
+	TGG	CAAGATTAGTCTTGATGTAG	101	351	581	811	1041	1271
+	GGG	AAGATTAGTCTTGATGTAGT	102	352	582	812	1042	1272
+	CGG	AGTCCTGATGTAGTGGAGT	103	353	583	813	1043	1273
+	AGG	TTTTCTTAATAAAAAAAAAA	104	354	584	814	1044	1274
+	TGG	TCTATTAAAAAAAAAAAGGC	105	355	585	815	1045	1275
+	GGG	CTATTAAAAAAAAAAAGGCT	106	356	586	816	1046	1276
+	CGG	AAAAAAAAAAAGGCTGGGCA	107	357	587	817	1047	1277
+	TGG	AAAAAAAAGGCTGGGACGG	108	358	588	818	1048	1278
+	TGG	CACCCGTAAATCCCAGCACTT	109	359	589	819	1049	1279
+	GGG	ACCCGTAAATCCCAGCACTT	110	360	590	820	1050	1280
+	AGG	CGTAATCCCAGCACTTGGG	111	361	591	821	1051	1281
-	GGG	TCCCCAAAGTGTGGGATTAC	112	362	592	822	1052	1282
-	CGG	CTTCAAAAGTGTGGGATTAA	113	363	593	823	1053	1283
+	AGG	CCCAGCACTTGGGAGGCCG	114	364	594	824	1054	1284
-	GGG	CCTCGGCCCTCCCAAAGTGC	115	365	595	825	1055	1285
+	AGG	GCACTTGGGAGGCCGAGGC	116	366	596	826	1056	1286
+	TGG	CTTGGGAGGCCGAGGCAGG	117	367	597	827	1057	1287
+	AGG	GCCGAGGCAGGTGGATACG	118	368	598	828	1058	1288
-	CGG	ACCTCGTGTACCCACCTGCCT	119	369	599	829	1059	1289
+	AGG	GGCAGGTGGATACGAGGTC	120	370	600	830	1060	1290
+	TGG	TCAGGAGATCGAGACCATCT	121	371	601	831	1061	1291
+	TGG	CGAGACCATCTTGGCTAAC	122	372	602	832	1062	1292
-	TGG	TTCACCATGTTAGCCAAGA	123	373	603	833	1063	1293
-	GGG	TIGTATTTTGTAGAGACG	124	374	604	834	1064	1294
-	GGG	TTTGTATTTTGTAGAGAC	125	375	605	835	1065	1295
-	CGG	TTTGTATTTTGTAGAGA	126	376	606	836	1066	1296
+	CGG	AAAAAATACAAAAAATTAGC	127	377	607	837	1067	1297
+	GGG	AAAAAATACAAAAAATTAGCC	128	378	608	838	1068	1298
+	TGG	TACAAAAAATTAGCCGGGT	129	379	609	839	1069	1299
+	TGG	AAAAAATAGCCGGGTGTTGG	130	380	610	840	1070	1300
+	CGG	AAATTAGCCGGGTGTTGG	131	381	611	841	1071	1301
+	GGG	AATTAGCCGGGTGTTGG	132	382	612	842	1072	1302
-	CGG	CAGGCGCCGCCACCACACC	133	383	613	843	1073	1303
+	AGG	GCCTGAGTCCCAGCTACTC	134	384	614	844	1074	1304
+	AGG	TGTAGTCCCAGCTACTCAGG	135	385	615	845	1075	1305
-	AGG	TCCTGAGTAGCTGGGACTAC	136	386	616	846	1076	1306
+	AGG	CCCAGCTACTCAGGAGCTG	137	387	617	847	1077	1307
-	GGG	CCTCAGCCTCTGAGTAGCT	138	388	618	848	1078	1308
-	TGG	GCCTCAGCCTCTGAGTAGC	139	389	619	849	1079	1309
+	TGG	AGGAGGCTGAGGCAGGAGA	140	390	620	850	1080	1310
+	CGG	GCAGGAGAAATGGCGTGAAC	141	391	621	851	1081	1311
+	GGG	CAGGAGAAATGGCGTGAAC	142	392	622	852	1082	1312
+	AGG	GAGAATGGCGTGAACCCGGG	143	393	623	853	1083	1313

20

30

40

50

【表 E - 2】

概	PAM	ガイド RNA 標的配列	配列番号					
			gRNA 標的配列	crRNA	sgRNA			
					v1	v2	v3	v4
+	TGG	AATGGCGTGAACCGGGAGG	144	394	624	854	1084	1314
-	GGG	CACTGCAAGCTCCACCTCCC	145	395	625	855	1085	1315
-	CGG	TCACTGCAAGCTCCACCTCC	146	396	626	856	1086	1316
+	TGG	CATACCACTGCACTCCAGCC	147	397	627	857	1087	1317
+	GGG	ATACCACTGCACTCCAGCCT	148	398	628	858	1088	1318
-	TGG	TCGCCAGGCTGGAGTGCAG	149	399	629	859	1089	1319
-	TGG	TCTCACTCTTCGCCAGGC	150	400	630	860	1090	1320
-	AGG	GGAGCTCACTCTTCGCC	151	401	631	861	1091	1321
-	TGG	TGTTTTTGTTTTTGAGA	152	402	632	862	1092	1322
-	TGG	AGGAAGAAAAGAAAGGTTTT	153	403	633	863	1093	1323
-	AGG	AGAAGAAAAGGAAGAAAGAA	154	404	634	864	1094	1324
+	TGG	CTITCTCCCTTCTCTCT	155	405	635	865	1095	1325
+	GGG	TTTCTCTCTTCTCTCTT	156	406	636	866	1096	1326
-	AGG	AATGGGCAAGAGAAAGAAA	157	407	637	867	1097	1327
-	TGG	GGCTATTACATAAGAACAA	158	408	638	868	1098	1328
-	TGG	CACAGGAAAAGGAACGTAC	159	409	639	869	1099	1329
-	AGG	ATTAAGCTAACACAGGAAA	160	410	640	870	1100	1330
-	AGG	TCAAAATTAAAGCTAACAC	161	411	641	871	1101	1331
+	TGG	TAATAATGCTAAACATCTC	162	412	642	872	1102	1332
-	AGG	AGAGATGTTAGACAATT	163	413	643	873	1103	1333
+	AGG	TCTAACATCTGGGACCA	164	414	644	874	1104	1334
-	TGG	TITATGCTTCTATATCTC	165	415	645	875	1105	1335
+	AGG	AGCATAAAATTACAAGAAAAA	166	416	646	876	1106	1336
+	TGG	TACAAAGAAAAGGTTATCA	167	417	647	877	1107	1337
+	GGG	ACAAAGAAAAAGGTTATCAT	168	418	648	878	1108	1338
+	GGG	CAAAGAAAAAGGTTATCATG	169	419	649	879	1109	1339
+	CGG	TCTGAGTTAAATAGAGT	170	420	650	880	1110	1340
-	AGG	CTTATAAGATACATTATGAA	171	421	651	881	1111	1341
+	AGG	TATCTTATAAGACTATAAAA	172	422	652	882	1112	1342
+	GGG	ATCTTATAAGACTATAAAA	173	423	653	883	1113	1343
+	AGG	TTATAAGACTATAAAAAGG	174	424	654	884	1114	1344
+	AGG	TAAGAGGGAGGAATATAG	175	425	655	885	1115	1345
+	GGG	AAAAAGGGAGGAATATAGA	176	426	656	886	1116	1346
+	TGG	AAATATAGAGGGTCACTT	177	427	657	887	1117	1347
+	TGG	TATAGAGGGTCCACTTTGG	178	428	658	888	1118	1348
-	TGG	ACTCTGAAGTCCACCAAAAG	179	429	659	889	1119	1349
+	TGG	AGAATAGTGTGACCGTT	180	430	660	890	1120	1350
-	TGG	AAAACGGTCAACTCTATT	181	431	661	891	1121	1351
+	AGG	CCGTTTGGCTAATGAAAAA	182	432	662	892	1122	1352
-	CGG	CCTTTTCATTAGCCCCAAA	183	433	663	893	1123	1353
+	AGG	TGGGCTAATGAAAAGGAAG	184	434	664	894	1124	1354
+	AGG	TAATGAAAAGGAAGAGGCT	185	435	665	895	1125	1355
+	GGG	AATGAAAAAGGAAGAGGCTA	186	436	666	896	1126	1356
+	AGG	CTGAATCTTAAATATGTC	187	437	667	897	1127	1357
-	TGG	CAGGCAGCTTATCTCAACC	188	438	668	898	1128	1358
-	AGG	CTAAGAGATCAAGTTTCAGC	189	439	669	899	1129	1359
+	TGG	GTGTCCTGTTGATATCTG	190	440	670	900	1130	1360
+	TGG	CTTGTGATATCTGTCGA	191	441	671	901	1131	1361
+	TGG	TCTGTGGCATGGCTACAGAT	192	442	672	902	1132	1362
-	AGG	AGAACTTATTACACAGGGA	193	443	673	903	1133	1363
-	GGG	AAAGAGAACTTACACACACA	194	444	674	904	1134	1364
-	AGG	CAAAGAGAACTTACACAC	195	445	675	905	1135	1365
+	AGG	TCTCTTGTATTTACTTT	196	446	676	906	1136	1366
+	GGG	TCTCTTGTATTTACTTTA	197	447	677	907	1137	1367
+	AGG	CTTGTGATTTACTTTAGGG	198	448	678	908	1138	1368
+	TGG	AGCTTTGTCCACCTTAAA	199	449	679	909	1139	1369
-	TGG	TTTATTTTCCATTAAAGG	200	450	680	910	1140	1370
-	AGG	TATTTTATTTTCCATTAA	201	451	681	911	1141	1371
-	AGG	CTTACATAAAACACTTAA	202	452	682	912	1142	1372
+	AGG	TAAGCACAGAAGTTTAAAG	203	453	683	913	1143	1373
+	AGG	AAGTTTTAAGAGGCATGAA	204	454	684	914	1144	1374
-	AGG	ATATTTACGTAGTTTTCAT	205	455	685	915	1145	1375
+	AGG	CGTAAATATTCTGAGAAC	206	456	686	916	1146	1376
+	AGG	TCTTGAGAACAGGAAGAC	207	457	687	917	1147	1377
-	TGG	TAATATTAAAAACATTGGTT	208	458	688	918	1148	1378

10

20

30

40

50

【表 E - 3】

■	PAM	ガイド RNA 標的配列	配列番号					
			gRNA 標的配列	crRNA	sgRNA			
					v1	v2	v3	v4
+	AGG	CCAATGTTTTAATAATTATC	209	459	689	919	1149	1379
-	TGG	CCTGATAATATTAAAAACAT	210	460	690	920	1150	1380
+	TGG	CATTATCATGCATACATCTC	211	461	691	921	1151	1381
+	TGG	ATCATGCATACATCTCTGGC	212	462	692	922	1152	1382
+	TGG	TTCATTTCATTTGATTTG	213	463	693	923	1153	1383
-	TGG	ATTCAATTGAAAGCAGTGGT	214	464	694	924	1154	1384
-	TGG	GAATATTCAATTGAAAGCAG	215	465	695	925	1155	1385
+	AGG	CATACGATTTAAATCGCTG	216	466	696	926	1156	1386
+	AGG	AAAATCGCTGAGGCGCGTTC	217	467	697	927	1157	1387
-	AGG	TTTTTTTTCTTTTTGTAC	218	468	698	928	1158	1388
-	TGG	CTGTTGTCAAAGATTTAAA	219	469	699	929	1159	1389
+	TGG	TGACAAACAGAGTTCTGTTT	220	470	700	930	1160	1390
+	TGG	AGAATACGCTGAGAGTTATC	221	471	701	931	1161	1391
-	AGG	GCAAGAGAAGAAAAGAACGG	222	472	702	932	1162	1392
-	CGG	GTTGCAAGAGAAGAAAAGAA	223	473	703	933	1163	1393
-	TGG	ATGCACACGTAAAAGAGAGG	224	474	704	934	1164	1394
-	AGG	AAGATGCACACGTAAAAGAG	225	475	705	935	1165	1395

【0325】

配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位に対応する位置に近接しているガイド RNA 標的配列の例は、配列番号 2 2 6 ~ 2 3 9 に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、下記の表に記載されている。配列番号 2 2 6 ~ 2 3 9 に対応するガイド RNA DNA 標的化セグメントの例は、それぞれ、チミンの代わりにウラシルである以外は配列番号 2 2 6 ~ 2 3 9 と同一である配列番号 1 6 2 9 ~ 1 6 4 2 に記載されている。ガイド RNA DNA 標的化セグメントは、配列番号 1 6 2 9 ~ 1 6 4 2 に記載の配列のいずれかを含み得るか、それから本質的になり得るか、またはそれからなり得る。配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位に対応する位置に近接している例示的なガイド RNA 標的配列は、配列番号 2 3 0 および 2 3 1 を含む。配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位に対応する位置に近接しているガイド RNA 標的配列に対応する例示的な crRNA および sgRNA (足場バージョン 1 、 2 、 3 、または 4 を含む) は、下記の表に記載の配列のいずれかを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【0326】

【表 F】

## rs72613567 変形形態付近のガイド RNA 標的配列

■	PAM	ガイド RNA 標的配列	変形形態距離 (bp)	配列番号					
				gRNA 標的配列	crRNA	sgRNA			
						v1	v2	v3	v4
+	TGG	AICATGCATACATCTCTGGC	107	226	476	706	936	1166	1396
+	TGG	TTCAATTTCATTTGATTTG	74	227	477	707	937	1167	1397
-	TGG	ATTCAATTGAAAGCAGTGGT	62	228	478	708	938	1168	1398
-	TGG	GAATATTCAATTGAAAGCAG	58	229	479	709	939	1169	1399
+	AGG	CATACGATTTAAATCGCTG	22	230	480	710	940	1170	1400
+	AGG	AAAATCGCTGAGGCGCGTTC	12	231	481	711	941	1171	1401
-	AGG	TTTTTTTTCTTTTTGTAC	22	232	482	712	942	1172	1402
-	TGG	CTGTTGTCAAAGATTTAAA	40	233	483	713	943	1173	1403
+	TGG	TGACAAACAGAGTTCTGTTT	65	234	484	714	944	1174	1404
+	TGG	AGAATACGCTGAGAGTTATC	94	235	485	715	945	1175	1405
-	AGG	GCAAGAGAAGAAAAGAACGG	121	236	486	716	946	1176	1406
-	CGG	GTTGCAAGAGAAGAAAAGAA	124	237	487	717	947	1177	1407
-	TGG	ATGCACACGTAAAAGAGAGG	146	238	488	718	948	1178	1408
-	AGG	AAGATGCACACGTAAAAGAG	149	239	489	719	949	1179	1409

## 【0327】

マウス H s d 1 7 b 1 3 遺伝子を配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 の 1 2 6 6 6 位に対応する位置に近接しているマウス H s d 1 7 b 1 3 遺伝子内のガイド RNA 標的配列の例は、実施例 4 における表 1 2 に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。マウス H s d 1 7 b 1 3 遺伝子の 5' 末端のガイド RNA 標的配列の例は、実施例 4 における表 1 2 に記載の配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。それらのガイド RNA 標的配列に対応するガイド RNA-DNA 標的化セグメントの例も実施例 4 における表 1 2 に記載されている。ガイド RNA-DNA 標的化セグメントは、これらの配列のいずれかを含み得るか、それから本質的になり得るか、またはそれからなり得る。実施例 4 における表 1 2 のガイド RNA 標的配列に対応する例示的な cr RNA および sg RNA (足場バージョン 1、2、3、または 4 を含む) は、実施例 4 における表 1 2 に記載の cr RNA または sg RNA 配列のいずれかを含み得るか、それから本質的になり得るか、またはそれからなり得る。

## 【0328】

ガイド RNA は、2 つのセグメント：「DNA 標的化セグメント」および「タンパク質結合セグメント」を含み得る。「セグメント」は、RNA 内のヌクレオチドの連続したひと続きなどの、分子の区画または領域を含む。Cas 9 に対するものなどの一部の g RNA は、2 つの別々の RNA 分子：「活性化因子 - RNA」(例えば、tracr RNA) および「標的化因子 - RNA」(例えば、CRISPR RNA または cr RNA) を含み得る。他の g RNA は、単一の RNA 分子 (単一の RNA ポリヌクレオチド) であり、「單一分子 g RNA」、「單一ガイド RNA」、または「sg RNA」とも称され得る。例えば、それぞれが、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、WO 2013/176772、WO 2014/065596、WO 2014/089290、WO 2014/093622、WO 2014/099750、WO 2013/142578、および WO 2014/131833 を参照されたい。Cas 9 に関しては、例えば、單一ガイド RNA は、tracr RNA と融合した cr RNA (例えば、リンカーを介して) を含み得る。Cpf 1 に関しては、例えば、標的配列への結合および / または標的配列の切断を実現するためには cr RNA のみが必要である。「ガイド RNA」および「g RNA」という用語は、2 重分子 (すなわち、モジュラー) g RNA および單一分子 g RNA の両方を含む。

## 【0329】

例示的な 2 分子 g RNA は、cr RNA 様 (「CRISPR RNA」または「標的化因子 - RNA」または「cr RNA」または「cr RNA リピート」) 分子および対応する tracr RNA 様 (「トランス作用性 CRISPR RNA」または「活性化因子 - RNA」または「tracr RNA」) 分子を含む。cr RNA は、g RNA の DNA 標的化セグメント (一本鎖) および g RNA のタンパク質結合セグメントの ds RNA 2 重鎖の片方を形成するヌクレオチドのひと続き (すなわち、cr RNA 尾部) の両方を含む。DNA 標的化セグメントの下流 (3' 側) に位置する cr RNA 尾部の例は、GUUUUAGAGCUAUGC (配列番号 1421) を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。本明細書に開示される DNA 標的化セグメントのいずれかを配列番号 1421 の 5' 末端に接合して cr RNA を形成することができる。

## 【0330】

対応する tracr RNA (活性化因子 - RNA) は、g RNA のタンパク質結合セグメントの ds RNA 2 重鎖のあとの半分を形成するヌクレオチドのひと続きを含む。cr RNA のヌクレオチドのひと続きは、tracr RNA のヌクレオチドのひと続きと相補的であり、ハイブリダイズして、g RNA のタンパク質結合ドメインの ds RNA 2 重鎖を形成する。したがって、各 cr RNA は、対応する tracr RNA を有すると言うことができる。tracr RNA 配列の例は、AGCAUAGCAAGGUAAAAUAAGGCCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCCACCGAGUCGGUGCUUU (配列番号 1422) を含むか、それから本質的になるか、またはそれ

10

20

30

40

50

からなる。

【0331】

c r R N A および t r a c r R N A の両方が必要な系では、c r R N A および対応する t r a c r R N A がハイブリダイズして g R N A を形成する。c r R N A のみが必要な系では、c r R N A が g R N A になることができる。c r R N A は、逆の鎖（すなわち、相補鎖）とハイブリダイズすることにより、ガイド R N A 標的配列を標的とする一本鎖 D N A 標的化セグメントをさらにもたらす。細胞内での改変に使用する場合、所与の c r R N A または t r a c r R N A 分子の正確な配列は、R N A 分子を使用する種に特異的になるよう 10 に設計することができる。例えば、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Maliら（2013年）Science、339巻：823～826頁；Jinekら（2012年）Science、337巻：816～821頁；Hwangら（2013年）Nat. Biotechnol.、31巻：227～229頁；Jiangら（2013年）Nat. Biotechnol.、31巻：233～239頁；およびCongら（2013年）Science、339巻：819～823頁を参照されたい。

【0332】

所与の g R N A の D N A 標的化セグメント（c r R N A）は、標的 D N A 内の配列と相補的なヌクレオチド配列（すなわち、ガイド R N A 標的配列と逆の鎖上のガイド R N A 認識配列の相補鎖）を含む。g R N A の D N A 標的化セグメントは、標的 D N A（例えば、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子）と配列特異的にハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対合）によって相互作用する。したがって、D N A 標的化セグメントのヌクレオチド配列は、変動させることができ、g R N A と標的 D N A が相互作用する標的 D N A 内の場所を決定する。主題の g R N A の D N A 標的化セグメントを、標的 D N A 内の任意の所望の配列とハイブリダイズするように改変することができる。天然に存在する c r R N A は、C R I S P R / C a s 系および生物体に応じて異なるが、多くの場合、21～46ヌクレオチドの長さの2つのダイレクトリピート（D R）に挟まれた21～72ヌクレオチドの長さの標的化セグメントを含有する（例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる WO 2014 / 131833 を参照されたい）。S . p y o g e n e s の場合では、D R は36ヌクレオチドの長さであり、標的化セグメントは30ヌクレオチドの長さである。3'側に位置するD R が対応する t r a c r R N A と相補的であり、ハイブリダイズし、それが今度は C a s タンパク質に結合する。 20 30

【0333】

D N A 標的化セグメントは、少なくとも約12ヌクレオチド、少なくとも約15ヌクレオチド、少なくとも約17ヌクレオチド、少なくとも約18ヌクレオチド、少なくとも約19ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約25ヌクレオチド、少なくとも約30ヌクレオチド、少なくとも約35ヌクレオチド、または少なくとも約40ヌクレオチドの長さを有し得る。そのような D N A 標的化セグメントは、約12ヌクレオチドから約100ヌクレオチドまで、約12ヌクレオチドから約80ヌクレオチドまで、約12ヌクレオチドから約50ヌクレオチドまで、約12ヌクレオチドから約40ヌクレオチドまで、約12ヌクレオチドから約30ヌクレオチドまで、約12ヌクレオチドから約25ヌクレオチドまで、または約12ヌクレオチドから約20ヌクレオチドまでの長さを有し得る。例えば、D N A 標的化セグメントは、約15ヌクレオチドから約25ヌクレオチドまで（例えば、約17ヌクレオチドから約20ヌクレオチドまで、または約17ヌクレオチド、約18ヌクレオチド、約19ヌクレオチド、または約20ヌクレオチド）であつてよい。例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる U S 2 0 1 6 / 0 0 2 4 5 2 3 を参照されたい。S . p y o g e n e s 由来の C a s 9 に関しては、典型的な D N A 標的化セグメントは、16から20ヌクレオチドの間の長さまたは17から20ヌクレオチドの間の長さである。S . a u r e u s 由来の C a s 9 に関しては、典型的な D N A 標的化セグメントは、21から23ヌクレオチドの間の長さである。C p f 1 に関しては、典型的な D N A 標的化セグメントは、少なくとも16ヌクレオチドの長さまたは少なくとも18ヌクレオチドの長さである。 40 50

## 【0334】

t r a c r R N A は、任意の形態（例えば、全長 t r a c r R N A または活性な部分的 t r a c r R N A ）および様々な長さであってよい。t r a c r R N A は、一次転写産物またはプロセシングされた形態を含み得る。例えば、t r a c r R N A（単一ガイド R N A の一部としてかまたは 2 分子 g R N A の一部としての別々の分子として）は、野生型 t r a c r R N A 配列（例えば、野生型 t r a c r R N A 配列の約 20 ヌクレオチドもしくはそれよりも多く、約 26 ヌクレオチドもしくはそれよりも多く、約 32 ヌクレオチドもしくはそれよりも多く、約 45 ヌクレオチドもしくはそれよりも多く、約 48 ヌクレオチドもしくはそれよりも多く、約 54 ヌクレオチドもしくはそれよりも多く、約 63 ヌクレオチドもしくはそれよりも多く、約 67 ヌクレオチドもしくはそれよりも多く、約 85 ヌクレオチドもしくはそれよりも多く、またはそれよりも多くのヌクレオチド）の全部または一部を含み得るか、またはそれからなり得る。S. pyogenes 由来の野生型 t r a c r R N A 配列の例としては、171 ヌクレオチド、89 ヌクレオチド、75 ヌクレオチド、および 65 ヌクレオチドバージョンが挙げられる。例えば、それぞれが、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Deltcheva ら（2011 年）Nature、471巻：602～607頁；WO 2014/093661 を参照されたい。単一ガイド R N A（s g R N A）内の t r a c r R N A の例としては、s g R N A の +48、+54、+67、および +85 バージョンに見出される t r a c r R N A セグメントが挙げられ、ここで、「+n」は、最大 +n ヌクレオチドの野生型 t r a c r R N A が s g R N A に含まれることを示す。あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる U S 8,697,359 を参照されたい。10 20

## 【0335】

D N A 標的化配列と標的 D N A 内のガイド R N A 認識配列の相補鎖との間のパーセント相補性は、少なくとも 60%（例えば、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100%）であり得る。D N A 標的化配列と標的 D N A 内のガイド R N A 認識配列の相補鎖との間のパーセント相補性は、約 20 個連續したヌクレオチドにわたって少なくとも 60% であり得る。例として、D N A 標的化配列と標的 D N A 内のガイド R N A 認識配列の相補鎖との間のパーセント相補性は、標的 D N A の相補鎖内のガイド R N A 認識配列の相補鎖の 5' 末端では 14 個連續したヌクレオチドにわたって 100% であり、残りにわたっては 0% の低さである。そのような場合では、D N A 標的化配列は、14 ヌクレオチドの長さとみなすことができる。別の例として、D N A 標的化配列と標的 D N A 内のガイド R N A 認識配列の相補鎖との間のパーセント相補性は、標的 D N A の相補鎖内のガイド R N A 認識配列の相補鎖の 5' 末端では 7 個連續したヌクレオチドにわたって 100% であり、残りにわたっては 0% の低さである。そのような場合では、D N A 標的化配列は、7 ヌクレオチドの長さとみなすことができる。一部のガイド R N A では、D N A 標的化配列内の少なくとも 17 ヌクレオチドが標的 D N A と相補的である。例えば、D N A 標的化配列は 20 ヌクレオチドの長さであり得、ガイド R N A 認識配列の相補鎖とのミスマッチを 1 つ、2 つ、または 3 つ含み得る。ミスマッチはプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列に隣接しないこと（例えば、ミスマッチは D N A 標的化配列の 5' 末端にあるか、またはミスマッチは PAM 配列から少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または 19 塩基対離れている）ことが好ましい。30 40

## 【0336】

g R N A のタンパク質結合セグメントは、互いと相補的な 2 つのヌクレオチドのひと続きを含み得る。タンパク質結合セグメントの相補的なヌクレオチドはハイブリダイズして二本鎖 R N A 2 重鎖（d s R N A）を形成する。主題の g R N A のタンパク質結合セグメントは C a s タンパク質と相互作用し、g R N A は、結合した C a s タンパク質を、D N A 標的化セグメントを介して標的 D N A 内の特定のヌクレオチド配列に方向付ける。

## 【0337】

单一ガイドRNAは、DNA標的化セグメントおよび足場配列（すなわち、ガイドRNAのタンパク質結合またはCas結合配列）を有する。例えば、そのようなガイドRNAは、5' DNA標的化セグメントおよび3'足場配列を有する。例示的な足場配列は、GUU UUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGGUUAAAUAAGGCUAGUCGU (バージョン1；配列番号1420)；GUUGGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCGUUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (バージョン2；配列番号256)；GUUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGGUUAAAUAAGGCUAGUCGUUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (バージョン3；配列番号257)；およびGUUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAA GUUAAAUAAGGCUAGUCGUUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (バージョン4；配列番号258)を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。本明細書に開示されるガイドRNA標的配列のいずれか（例えば、配列番号20～239および259～268）を標的とするガイドRNAとしては、例えば、ガイドRNAの3'末端上の例示的なガイドRNA足場配列のいずれかと融合したガイドRNAの5'末端上のDNA標的化セグメントを挙げることができる。すなわち、本明細書に開示されるDNA標的化セグメントのいずれかを配列番号1420、256、257、または258のいずれか1つの5'末端と接合して、单一のガイドRNA（キメラガイドRNA）を形成することができる。本明細書の他の箇所で開示されるガイドRNAバージョン1、2、3、および4は、それぞれ足場バージョン1、2、3、および4と接合したDNA標的化セグメントを指す。

20

【 0 3 3 8 】

ガイドRNAは、追加的な望ましい特徴（例えば、改变または制御された安定性；細胞内標的化；蛍光標識を用いた追跡；タンパク質またはタンパク質複合体の結合部位など）をもたらす改变または配列を含み得る。そのような改变の例としては、例えば、5'キャップ（例えば、7'-メチルグアニル酸キャップ（m7G））；3'ポリアデニル化尾部（すなわち、3'ポリ(A)尾部）；リボスイッチ配列（例えば、安定性の制御ならびに／またはタンパク質および／もしくはタンパク質複合体による接近可能性の制御を可能にするため）；安定性調節配列；dsRNA 2重鎖（すなわち、ヘアピン）を形成する配列；RNAを細胞内の場所（例えば、核、ミトコンドリア、葉緑体など）にターゲティングする改变または配列；追跡をもたらす改变または配列（例えば、蛍光分子との直接コンジュゲーション、蛍光検出を容易にする部分とのコンジュゲーション、蛍光検出を可能にする配列など）；タンパク質（例えば、転写活性化因子、転写リプレッサー、DNAメチルトランスフェラーゼ、DNAデメチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストン脱アセチル化酵素などを含めたDNAに作用するタンパク質）の結合部位をもたらす改变または配列；およびこれらの組合せが挙げられる。改变の他の例としては、工学的に操作されたステムループ2重鎖構造、工学的に操作されたバルジ領域、ステムループ2重鎖構造の工学的に操作されたヘアピン3'、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるUS2015/0376586を参照されたい。バルジは、crrRNA様領域および最小のtracrRNA様領域で構成される2重鎖内の対合していないヌクレオチドの領域であり得る。バルジは、2重鎖の片側に対合していない5'-XXXXY-3'（配列中、Xは任意のプリンであり、Yは逆の鎖上のヌクレオチドとゆらぎ対を形成し得るヌクレオチドであり得る）、および、他方の側の2重鎖に対合していないヌクレオチド領域を含み得る。

40

〔 0 3 3 9 〕

一部の場所では、MS2-p65-HSF1と対戦したdCas9-VP64融合タンパク質を含む転写活性化系を使用することができる。そのような系では、ガイドRNAを、二量体を形成したMS2バクテリオファージコートタンパク質に結合するように設計されたsgRNAテトラループおよびステムループ2に付加されたアブタマー配列を用いて設

50

計することができる。例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるKonermannら(2015年)Nature、517巻(7536号):583~588頁を参照されたい。

#### 【0340】

ガイドRNAは、任意の形態でもたらすことができる。例えば、gRNAは、RNAの形態で、2つの分子(別々のcrrRNAおよびtracrRNA)としてかまたは1つの分子(sgRNA)としてのいずれかでもたらすことができ、必要に応じて、Casタンパク質との複合体の形態でもたらすことができる。例えば、gRNAは、例えばT7RNAポリメラーゼを使用したin vitro転写によって調製することができる(例えば、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、WO2014/089290およびWO2014/065596を参照されたい)。ガイドRNAは、化学合成によって調製することもできる。

10

#### 【0341】

gRNAは、gRNAをコードするDNAの形態でもたらすこともできる。gRNAをコードするDNAは、単一のRNA分子(sgRNA)をコードしていてもよく、別々のRNA分子(例えば、別々のcrrRNAおよびtracrRNA)をコードしていてもよい。後者の場合、gRNAをコードするDNAは、1つのDNA分子としてもたらすことができ、それぞれcrrRNAおよびtracrRNAをコードする別々のDNA分子としてもたらすこともできる。

20

#### 【0342】

gRNAをDNAの形態でもたらす場合、gRNAを細胞において一過性に、条件付きで、または構成的に発現させることができる。gRNAをコードするDNAを細胞のゲノムに安定に組み込み、細胞において活性なプロモーターに作動可能に連結することができる。あるいは、gRNAをコードするDNAを発現構築物中でプロモーターに作動可能に連結することができる。例えば、gRNAをコードするDNAは、異種核酸を含むベクターであってよい。ベクターは、外因性ドナー配列をさらに含んでよく、かつ/または、ベクターは、Casタンパク質をコードする核酸をさらに含んでよい。あるいは、gRNAをコードするDNAを、外因性ドナー配列を含むベクターおよび/またはCasタンパク質をコードする核酸を含むベクターとは別のベクターまたはプラスミド内に入れることができる。そのような発現構築物に使用することができるプロモーターとしては、例えば、真核細胞、ヒト細胞、非ヒト細胞、哺乳動物細胞、非ヒト哺乳動物細胞、齧歯類細胞、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、ウサギ細胞、多能性細胞、胚性幹(ES)細胞、成体幹細胞、発生的に制限された前駆細胞、人工多能性幹(iPS)細胞、または1細胞期胚の1つまたは複数において活性なプロモーターが挙げられる。そのようなプロモーターは、例えば、条件付きプロモーター、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、または組織特異的プロモーターであってよい。そのようなプロモーターはまた、例えば、双向プロモーターであってよい。適切なプロモーターの特定の例としては、ヒトU6プロモーター、ラットU6ポリメラーゼIIIIプロモーター、またはマウスU6ポリメラーゼIIIIプロモーターなどのRNAポリメラーゼIIIIプロモーターが挙げられる。

30

#### 【0343】

本明細書に開示される1つまたは複数のガイドRNA(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれよりも多くのガイドRNA)、および単離された核酸またはタンパク質の安定性を増大させる(例えば、所与の保管条件下で(例えば、-20、4、または周囲温度)、分解生成物が閾値未満、例えば出発核酸またはタンパク質の0.5重量%未満に留まる期間を延長させる;またはin vivoにおける安定性を増大させる)担体を含む組成物も本明細書に開示される。そのような担体の非限定的な例としては、ポリ(乳酸)(PLA)マイクロスフェア、ポリ(D,L-乳酸・ポリグリコール酸共重合体)(PLGA)マイクロスフェア、リポソーム、ミセル、逆ミセル、脂質コクリエート、および脂質微小管が挙げられる。そのような組成物は、Cas9タンパク質などのCasタンパク質、またはCasタンパク質をコードする核酸をさらに含み得る。そのような組成物

40

50

は、本明細書の他の箇所で開示される通り、1つもしくは複数（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、もしくはそれよりも多く）の外因性ドナー配列および/または1つもしくは複数（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、もしくはそれよりも多く）の標的化ベクターおよび/または1つもしくは複数（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、もしくはそれよりも多く）の発現ベクターをさらに含み得る。

#### 【0344】

##### (3) ガイドRNA認識配列およびガイドRNA標的配列

「ガイドRNA認識配列」という用語は、結合のための十分な条件が存在すればgRNAのDNA標的化セグメントが結合する標的DNA（例えば、HSD17B13遺伝子）に存在する核酸配列を包含する。ガイドRNA認識配列という用語は、本明細書で使用される場合、標的二本鎖DNAの両方の鎖（すなわち、ガイドRNAがハイブリダイズする相補鎖上の配列、およびプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）に隣接する非相補鎖上の対応する配列）を包含する。「ガイドRNA標的配列」という用語は、本明細書で使用される場合、具体的には、PAMに隣接する非相補鎖上（すなわち、PAMの上流または5'側）の配列を指す。すなわち、ガイドRNA標的配列は、ガイドRNAがハイブリダイズする相補鎖上の配列に対応する非相補鎖上の配列を指す。ガイドRNA標的配列は、ガイドRNAのDNA標的化セグメントと等しいが、ウラシルの代わりにチミンである。一例として、Cas9酵素に対するガイドRNA標的配列は、5' - NGG - 3' PAMに隣接する非相補鎖上の配列を指すことになる。ガイドRNA認識配列は、ガイドRNAが相補性を有するように設計された配列を含み、ガイドRNA認識配列の相補鎖とガイドRNAのDNA標的化配列のハイブリダイゼーションにより、CRISPR複合体の形成が促進される。ハイブリダイゼーションを引き起こし、CRISPR複合体の形成を促進するのに十分な相補性があれば、完全な相補性は必ずしも必要ではない。ガイドRNA認識配列またはガイドRNA標的配列は、下でより詳細に記載されているCasタンパク質の切断部位も含む。ガイドRNA認識配列またはガイドRNA標的配列は、例えば、細胞の核もしくは細胞質内、またはミトコンドリアもしくは葉緑体などの細胞の細胞小器官内に位置し得る任意のポリヌクレオチドを含み得る。

#### 【0345】

標的DNA内のガイドRNA認識配列は、Casタンパク質またはgRNAによって標的化することができる（すなわち、Casタンパク質またはgRNAが結合することができる、またはCasタンパク質またはgRNAがハイブリダイズすることができる、またはCasタンパク質またはgRNAが相補的であり得る）。適切なDNA/RNA結合条件としては、細胞において通常存在する生理的条件が挙げられる。他の適切なDNA/RNA結合条件（例えば、無細胞系における条件）が公知である（例えば、あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれるMolecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版（Sambrookら、Harbor Laboratory Press、2001年）を参照されたい）。Casタンパク質またはgRNAと相補的であり、それとハイブリダイズする標的DNAの鎖は、「相補鎖」と称することができ、「相補鎖」と相補的な（したがって、Casタンパク質またはgRNAとは相補的でない）標的DNAの鎖は、「非相補鎖」または「鋳型鎖」と称することができる。

#### 【0346】

Casタンパク質は、核酸を、gRNAのDNA標的化セグメントが結合する標的DNAに存在する核酸配列の内部または外部の部位で切断し得る。「切断部位」は、Casタンパク質により一本鎖切断または二本鎖切断が生じる、核酸の位置を含む。例えば、CRISPR複合体（ガイドRNA認識配列の相補鎖とハイブリダイズし、Casタンパク質と複合体を形成したgRNAを含む）の形成により、gRNAのDNA標的化セグメントが結合する標的DNAに存在する核酸配列内またはその付近（例えば、gRNAのDNA標的化セグメントが結合する標的DNAに存在する核酸配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、またはそれよりも多くの塩基対の範囲内）での一方または両方の鎖の切断がもたらされ得る。切断部位が、gRNAのDNA標的化セグメントが

10

20

30

40

50

結合する核酸配列の外部にある場合、切断部位はなお「ガイドRNA認識配列」またはガイドRNA標的配列内にあるとみなされる。切断部位は、核酸の一方の鎖上のみにあってもよく、両方の鎖上にあってもよい。切断部位は、核酸の両方の鎖上の同じ位置にあってもよく（平滑末端が生じる）、各鎖上の異なる部位にあってもよい（付着末端（すなわち、突出部）が生じる）。付着末端は、例えば、それぞれが異なる鎖上の異なる切断部位で一本鎖切断を生じさせる2つのCasタンパク質を使用し、それにより、二本鎖切断を生じさせることによって生じさせることができる。例えば、第1のニッカーゼにより、二本鎖DNA(dsDNA)の第1の鎖上に一本鎖切断を創出することができ、第2のニッカーゼにより、dsDNAの第2の鎖上に一本鎖切断を創出することができ、その結果、突出部配列が創出される。一部の場合では、第1の鎖上のニッカーゼのガイドRNA認識配列またはガイドRNA標的配列は、第2の鎖上のニッカーゼのガイドRNA認識配列またはガイドRNA標的配列から少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100、250、500、または1,000塩基対離れている。

#### 【0347】

Casタンパク質による標的DNAの部位特異的結合および/または切断は、(i) gRNAと標的DNAとの間の塩基対合相補性および(ii) 標的DNA内のプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と称される短いモチーフの両方によって決定される場所で起こり得る。PAMは、ガイドRNAがハイブリダイズする鎖と逆の非相補鎖上のガイドRNA標的配列に隣接し得る。必要に応じて、ガイドRNA標的配列の3'末端にPAMが隣接し得る。あるいは、ガイドRNA標的配列の5'末端にPAMが隣接し得る。例えば、Casタンパク質の切断部位は、PAM配列の約1～約10または約2～約5塩基対（例えば、3塩基対）上流または下流であり得る。一部の場合では（例えば、*S. pyogenes*由来のCas9または密接に関連するCas9を使用する場合）、非相補鎖のPAM配列は、5' - N<sub>1</sub> G G - 3'（配列中、N<sub>1</sub>は任意のDNAヌクレオチドである）であり得、標的DNAの非相補鎖のガイドRNA認識配列のすぐ3'側（すなわち、ガイドRNA標的配列のすぐ3'側）である。したがって、相補鎖のPAM配列は、5' - C C N<sub>2</sub> - 3'（配列中、N<sub>2</sub>は任意のDNAヌクレオチドである）になり、標的DNAの相補鎖のガイドRNA認識配列のすぐ5'側である。一部のそのような場合では、N<sub>1</sub>とN<sub>2</sub>は相補的であり得、N<sub>1</sub> - N<sub>2</sub>塩基対は任意の塩基対であり得る（例えば、N<sub>1</sub> = CおよびN<sub>2</sub> = G；N<sub>1</sub> = GおよびN<sub>2</sub> = C；N<sub>1</sub> = AおよびN<sub>2</sub> = T；またはN<sub>1</sub> = T、およびN<sub>2</sub> = A）。*S. aureus*由来のCas9の場合では、PAMは、N N G R R TまたはN N G R R（配列中、NはA、G、C、またはTであり得、RはGまたはAであり得る）であり得る。一部の場合では（例えば、*F. n. C p f 1*に関して）、PAM配列は、5'末端の上流であり得、配列5' - T T N - 3'を有し得る。

#### 【0348】

ガイドRNA標的配列またはPAM配列に加えてガイドRNA標的配列の例を以下に提示する。例えば、ガイドRNA標的配列は、Cas9タンパク質によって認識されるNGGモチーフの直前の20ヌクレオチドのDNA配列であり得る。そのようなガイドRNA標的配列とそれに加えてPAM配列の例は、G N<sub>1</sub> 9 N G G（配列番号248）またはN<sub>2</sub> 0 N G G（配列番号249）である。例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるWO 2014/165825を参照されたい。5'末端のグアニンにより、細胞におけるRNAポリメラーゼによる転写を容易にすることができる。ガイドRNA標的配列とそれに加えてPAM配列の他の例としては、*in vitro*におけるT7ポリメラーゼによる効率的な転写を容易にするための、5'末端の2つのグアニンヌクレオチド（例えば、G G N<sub>2</sub> 0 N G G；配列番号250）を挙げることができる。例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるWO 2014/065596を参照されたい。他のガイドRNA標的配列とそれに加えてPAM配列は、5' GまたはG Gおよび3' G GまたはN G Gを含む、配列番号248～250の4～22ヌクレオチドの長さを有し得る。さらに他のガイドRNA標的配列は、配列番号248～

250の14から20ヌクレオチドの間の長さを有し得る。

【0349】

ガイドRNA認識配列またはガイドRNA標的配列は、細胞に対して内因性または外因性の任意の核酸配列であり得る。ガイドRNA認識配列またはガイドRNA標的配列は、遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードする配列の場合もあり、非コード配列（例えば、制御配列）の場合もあり、両方を含む場合もある。

【0350】

一例として、ガイドRNA認識配列またはガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2のエクソン6および／もしくはイントロン6、エクソン6および／もしくはエクソン7、またはエクソン6および／もしくはイントロン6および／もしくはエクソン7に対応する領域の範囲内の場合がある。別の例として、ガイドRNA認識配列またはガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置を含むかまたはそれに近接している場合がある。例えば、ガイドRNA認識配列またはガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアラインメントした場合、配列番号2の12666位に対応する位置から約1000、500、400、300、200、100、50、45、40、35、30、25、20、15、10、または5ヌクレオチドの範囲内の場合がある。さらに別の例として、ガイドRNA認識配列またはガイドRNA標的配列は、HSD17B13遺伝子の開始コドンまたはHSD17B13遺伝子の終止コドンを含むかまたはそれに近接している場合がある。例えば、ガイドRNA認識配列またはガイドRNA標的配列は、開始コドンまたは終止コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内の場合がある。そのようなガイドRNA標的配列およびそのようなガイドRNA標的配列を標的とするガイドRNAの例は、本明細書の他の箇所で開示される。

10

20

30

【0351】

F. 外因性ドナー配列または標的化ベクター

本明細書に開示される方法および組成物では、HSD17B13遺伝子の切断を伴わずに、またはヌクレアーゼ作用剤を用いたHSD17B13遺伝子の切断後に、HSD17B13遺伝子を改変するために外因性ドナー配列（例えば、標的化ベクターまたは修復錆型）を利用することができる。外因性ドナー配列は、標的配列との部位特異的組換えを可能にするために必要なエレメントを含む任意の核酸またはベクターを指す。外因性ドナー配列をヌクレアーゼ作用剤と組み合わせて使用することにより、相同組換え修復を促進することによってHSD17B13遺伝子内でのより厳密な改変をもたらすことができる。

30

【0352】

そのような方法では、ヌクレアーゼ作用剤によりHSD17B13遺伝子が切断されて一本鎖切断（ニック）または二本鎖切断が創出され、非相同末端結合（NHEJ）媒介性ライゲーションまたは相同組換え修復事象によって外因性ドナー配列がHSD17B13遺伝子と組換えられる。必要に応じて、外因性ドナー配列を用いた修復によりヌクレアーゼ切断部位が除去または破壊され、その結果、標的化された対立遺伝子がヌクレアーゼ作用剤によって再度標的化されることができなくなる。

40

【0353】

外因性ドナー配列は、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、直鎖形態であっても環状形態であってもよいデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）を含み得る。例えば、外因性ドナー配列は、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ssODN）であり得る。例えば、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるYoshimiら（2016年）Nat. Commun.、7巻：10431頁を参照されたい。例示的な外因性ドナー配列は、約50ヌクレオチド～約5kbの長さであるか、約50ヌクレオチド～約3kbの長さであるか、または約50～約1,000ヌクレオチドの長さである。他の例示的な外因性ドナー配列は、約40～約200ヌクレオチドの長さである。例えば、

50

外因性ドナー配列は、約 50 ~ 約 60 、約 60 ~ 約 70 、約 70 ~ 約 80 、約 80 ~ 約 90 、約 90 ~ 約 100 、約 100 ~ 約 110 、約 110 ~ 約 120 、約 120 ~ 約 130 、約 130 ~ 約 140 、約 140 ~ 約 150 、約 150 ~ 約 160 、約 160 ~ 約 170 、約 170 ~ 約 180 、約 180 ~ 約 190 、または約 190 ~ 約 200 ヌクレオチドの長さであってよい。あるいは、外因性ドナー配列は、約 50 ~ 約 100 、約 100 ~ 約 200 、約 200 ~ 約 300 、約 300 ~ 約 400 、約 400 ~ 約 500 、約 500 ~ 約 600 、約 600 ~ 約 700 、約 700 ~ 約 800 、約 800 ~ 約 900 、または約 900 ~ 約 1,000 ヌクレオチドの長さであってよい。あるいは、外因性ドナー配列は、約 1 kb ~ 約 1.5 kb 、約 1.5 kb ~ 約 2 kb 、約 2 kb ~ 約 2.5 kb 、約 2.5 kb ~ 約 3 kb 、約 3 kb ~ 約 3.5 kb 、約 3.5 kb ~ 約 4 kb 、約 4 kb ~ 約 4.5 kb 、または約 4.5 kb ~ 約 5 kb の長さであってよい。あるいは、外因性ドナー配列は、例えば、5 kb 以下、4.5 kb 以下、4 kb 以下、3.5 kb 以下、3 kb 以下、2.5 kb 以下、2 kb 以下、1.5 kb 以下、1 kb 以下、900 ヌクレオチド以下、800 ヌクレオチド以下、700 ヌクレオチド以下、600 ヌクレオチド以下、500 ヌクレオチド以下、400 ヌクレオチド以下、300 ヌクレオチド以下、200 ヌクレオチド以下、100 ヌクレオチド以下、または 50 ヌクレオチド以下の長さであってよい。  
10

#### 【 0354 】

一実施例では、外因性ドナー配列は、約 80 ヌクレオチドから約 200 ヌクレオチドの間の長さ（例えば、約 120 ヌクレオチドの長さ）の ssODN である。別の例では、外因性ドナー配列は、約 80 ヌクレオチドから約 3 kb の間の長さの ssODN である。そのような ssODN は、例えば、それぞれが約 40 ヌクレオチドから約 60 ヌクレオチドの間の長さである相同アームを有してよい。そのような ssODN はまた、例えば、それぞれが約 30 ヌクレオチドから 100 ヌクレオチドの長さである相同アームを有してもよい。相同アームは、対称的であってもよく（例えば、それぞれが 40 ヌクレオチド、またはそれぞれが 60 ヌクレオチドの長さである）、非対称的であってもよい（例えば、36 ヌクレオチドの長さの相同アームが 1 つと 91 ヌクレオチドの長さの相同アームが 1 つ）。

20

#### 【 0355 】

外因性ドナー配列は、追加的な望ましい特徴（例えば、改変または制御された安定性；蛍光標識を用いた追跡または検出；タンパク質またはタンパク質複合体の結合部位など）をもたらす改変または配列を含み得る。外因性ドナー配列は、1 つまたは複数の蛍光標識、精製タグ、エピトープタグ、またはこれらの組合せを含み得る。例えば、外因性ドナー配列は、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、または少なくとも 5 つの蛍光標識などの、1 つまたは複数の蛍光標識（例えば、蛍光タンパク質または他のフルオロフォアまたは色素）を含み得る。例示的な蛍光標識としては、フルオレセイン（例えば、6 - カルボキシフルオレセイン（ 6 - F A M ））、テキサスレッド、HE X 、 C y 3 、 C y 5 、 C y 5 . 5 、 P a c i f i c B l u e 、 5 - ( および - 6 ) - カルボキシテラメチルローダミン（ T A M R A ）、および C y 7 などのフルオロフォアが挙げられる。オリゴヌクレオチドの標識のために広範囲の蛍光色素が商業的に入手可能である（例えば、 I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s から）。そのような蛍光標識（例えば、内部蛍光標識）を、例えば、外因性ドナー配列の末端と適合する突出末端を有する切断された H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に直接組み込まれた外因性ドナー配列を検出するために使用することができる。標識またはタグは、外因性ドナー配列の 5' 末端、3' 末端、または内部にあってよい。例えば、外因性ドナー配列の 5' 末端に I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s からの I R 7 0 0 フルオロフォア（ 5' I R D Y E ( 登録商標 ) 7 0 0 ）をコンジュゲートすることができる。

30

#### 【 0356 】

外因性ドナー配列はまた、 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に組み込まれる D N A のセグメントを含む核酸挿入物も含み得る。 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子への核酸挿入物の組込みにより、 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子における目的の核酸配列の付加、 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子における目的の核酸配列の欠失、または H S D 1 7 B 1 3 遺伝子における目的の核酸配列の置換え

40

50

(すなわち、欠失および挿入)をもたらすことができる。一部の外因性ドナー配列は、HSD17B13遺伝子におけるいかなる対応する欠失も伴わずにHSD17B13遺伝子に核酸挿入物が挿入されるように設計される。他の外因性ドナー配列は、核酸挿入物のいかなる対応する挿入も伴わずにHSD17B13遺伝子において目的の核酸配列が欠失するように設計される。さらに他の外因性ドナー配列は、HSD17B13遺伝子において目的の核酸配列が欠失し、それが核酸挿入物で置き換えられるように設計される。

【0357】

核酸挿入または欠失および／もしくは置換えを受けるHSD17B13遺伝子内の対応する核酸は種々の長さであってよい。例示的な核酸挿入または欠失および／もしくは置換えを受けるHSD17B13遺伝子内の対応する核酸は、約1ヌクレオチド～約5kbの長さまたは約1ヌクレオチド～約1,000ヌクレオチドの長さである。例えば、核酸挿入または欠失および／もしくは置換えを受けるHSD17B13遺伝子内の対応する核酸は、約1～約10、約10～約20、約20～約30、約30～約40、約40～約50、約50～約60、約60～約70、約70～約80、約80～約90、約90～約100、約100～約110、約110～約120、約120～約130、約130～約140、約140～約150、約150～約160、約160～約170、約170～約180、約180～約190、または約190～約200ヌクレオチドの長さであってよい。同様に、核酸挿入または欠失および／もしくは置換えを受けるHSD17B13遺伝子内の対応する核酸は、約1～約100、約100～約200、約200～約300、約300～約400、約400～約500、約500～約600、約600～約700、約700～約800、約800～約900、または約900～約1,000ヌクレオチドの長さであってよい。同様に、核酸挿入または欠失および／もしくは置換えを受けるHSD17B13遺伝子内の対応する核酸は、約1kb～約1.5kb、約1.5kb～約2kb、約2kb～約2.5kb、約2.5kb～約3kb、約3kb～約3.5kb、約3.5kb～約4kb、約4kb～約4.5kb、または約4.5kb～約5kbの長さであってよい。

【0358】

核酸挿入物は、ゲノムDNAまたは任意の他の型のDNAを含み得る。例えば、核酸挿入物は、cDNAを含み得る。

【0359】

核酸挿入物は、HSD17B13遺伝子の全部または一部（例えば、HSD17B13タンパク質の特定のモチーフまたは領域をコードする遺伝子の一部）と相同な配列を含み得る。例えば、核酸挿入物は、HSD17B13遺伝子における置換えの標的とされる配列と比較して1つもしくは複数の点突然変異（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくはそれよりも多く）または1つもしくは複数のヌクレオチド挿入もしくは欠失を含む配列を含み得る。

【0360】

核酸挿入または欠失および／もしくは置換えを受けるHSD17B13遺伝子内の対応する核酸は、エクソンなどのコード領域；イントロン、非翻訳領域、もしくは制御領域（例えば、プロモーター、エンハンサー、もしくは転写リプレッサー結合エレメント）などの非コード領域；またはこれらの任意の組合せであってよい。

【0361】

核酸挿入物はまた、条件付き対立遺伝子も含み得る。条件付き対立遺伝子は、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれるUS2011/0104799に記載されている多機能性対立遺伝子であってよい。例えば、条件付き対立遺伝子は、(a)標的遺伝子の転写に関してセンス配向の発動配列；(b)センスまたはアンチセンス配向の薬物選択力セット(DSC)；(c)アンチセンス配向の目的のヌクレオチド配列(NSI)；ならびに(d)リバース配向の反転モジュールによる条件付け(COIN、エクソン分裂性イントロンおよび反転性遺伝子トラップ様モジュールを利用する)を含み得る。例えば、US2011/0104799を参照されたい。条件付き対立遺伝子は、

10

20

30

40

50

第1のリコンビナーゼに曝露すると、組換えられて、(i)発動配列およびDSCを欠き、かつ(ii)センス配向のNSIおよびアンチセンス配向のCOINを含有する条件付き対立遺伝子を形成する、組換え可能単位をさらに含み得る。例えば、U S 2 0 1 1 / 0 1 0 4 7 9 9 を参照されたい。

【0362】

核酸挿入物はまた、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドも含み得る。あるいは、核酸挿入物は、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドを欠き得る。選択マーカーを選択力セットに含有させることができる。必要に応じて、選択力セットは、自己消去力セットであってよい。例えば、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、U S 8 , 6 9 7 , 8 5 1 およびU S 2 0 1 3 / 0 3 1 2 1 2 9 を参照されたい。例として、自己消去力セットは、マウスP r m 1 プロモーターに作動可能に連結したC r e i 遺伝子(イントロンで分離された、C r e リコンビナーゼをコードする2つのエクソン含む)およびヒトユビキチンプロモーターに作動可能に連結したネオマイシン耐性遺伝子を含み得る。例示的な選択マーカーとして、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(n e o r )、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ(h y g r )、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ(p u r o r )、プラストサイジンSデアミナーゼ(b s r r )、キサンチン/グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(g p t )、または単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(H S V - k )、またはこれらの組合せが挙げられる。選択マーカーをコードするポリヌクレオチドを、標的化される細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結することができる。プロモーターの例は、本明細書の他の箇所に記載されている。

10

20

30

【0363】

核酸挿入物はまた、レポーター遺伝子も含み得る。例示的なレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、-ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質(G F P)、高感度緑色蛍光タンパク質(e G F P)、シアノ蛍光タンパク質(C F P)、黄色蛍光タンパク質(Y F P)、高感度黄色蛍光タンパク質(e Y F P)、青色蛍光タンパク質(B F P)、高感度青色蛍光タンパク質(e B F P)、D s R e d 、Z s G r e e n 、M m G F P 、m P l u m 、m C h e r r y 、t d T o m a t o 、m S t r a w b e r r y 、J - R e d 、m O r a n g e 、m K O 、m C i t r i n e 、V e n u s 、Y P e t 、E m e r a l d 、C y P e t 、C e r u l e a n 、T - S a p p h i r e 、およびアルカリホスファターゼをコードするものが挙げられる。そのようなレポーター遺伝子を、標的とされる細胞内で活性なプロモーターに作動可能に連結することができる。プロモーターの例は、本明細書の他の箇所に記載されている。

【0364】

核酸挿入物はまた、1つまたは複数の発現力セットまたは欠失力セットも含み得る。所与の力セットは、目的のヌクレオチド配列、選択マーカーをコードするポリヌクレオチド、およびレポーター遺伝子のうちの1つまたは複数を、発現に影響を及ぼす種々の制御構成成分と一緒に含み得る。含めることができる選択性マーカーおよびレポーター遺伝子の例は、本明細書の他の箇所で詳細に論じられている。

30

【0365】

核酸挿入物は、部位特異的組換え標的配列に挟まれた核酸を含み得る。あるいは、核酸挿入物は、1つまたは複数の部位特異的組換え標的配列を含み得る。核酸挿入物全体がそのような部位特異的組換え標的配列に挟まれていてもよいが、核酸挿入物内の任意の領域または個々の目的のポリヌクレオチドがそのような部位に挟まれていてもよい。核酸挿入物または核酸挿入物内の任意の目的のポリヌクレオチドを挟むことができる部位特異的組換え標的配列としては、例えば、l o x P 、l o x 5 1 1 、l o x 2 2 7 2 、l o x 6 6 、l o x 7 1 、l o x M 2 、l o x 5 1 7 1 、F R T 、F R T 1 1 、F R T 7 1 、a t t p 、a t t 、F R T 、r o x 、またはこれらの組合せを挙げることができる。一例では、核酸挿入物に含有される、選択マーカーをコードするポリヌクレオチドおよび/またはレポーター遺伝子が部位特異的組換え部位に挟まれている。H S D 1 7 B 1 3 遺伝子への核酸

40

50

挿入物の組込み後、部位特異的組換え部位間の配列を切り出すことができる。必要に応じて、それぞれが部位特異的組換え部位を含む核酸挿入物を有する2つの外因性ドナー配列を使用することができる。外因性ドナー配列を、目的の核酸を挟む5'および3'領域にターゲティングすることができる。2つの核酸挿入物の標的ゲノム遺伝子座への組込み後、2つの挿入された部位特異的組換え部位間の目的の核酸を切り出すことができる。

#### 【0366】

核酸挿入物はまた、I型、II型、III型、およびIV型エンドヌクレアーゼを含めた制限エンドヌクレアーゼ（すなわち、制限酵素）の1つまたは複数の制限部位も含み得る。I型およびIII型制限エンドヌクレアーゼは、特異的な認識配列を認識するが、一般には、切断部位（認識配列）から数百塩基対離れることがあるヌクレアーゼ結合部位由来の種々の位置で切断する。II型系では、制限活性はいかなるメチラーゼ活性からも独立しており、切断は、一般には結合部位内または結合部位付近の特定の部位で起こる。大多数のII型酵素はパリンドローム配列をカットするが、II型a酵素は、非パリンドローム認識配列を認識し、認識配列の外部を切断し、II型b酵素は、配列を2度カットし、どちらの部位も認識配列の外側にあり、また、II型s酵素は、非対称認識配列を認識し、認識配列から約1～20ヌクレオチドの定義された距離で片側を切断する。IV型制限酵素は、メチル化されたDNAを標的とする。制限酵素は、例えば、REBASEデータベース（ウェブページ [rebase.neb.com](http://rebase.neb.com) ; Robertsら、(2003年) Nucleic Acids Res.、31巻：418～420頁；Robertsら、(2003年) Nucleic Acids Res.、31巻：1805～1812頁；およびBelfortら(2002年)、Mobile DNA II、761～783頁、Craigieら編、(ASM Press, Washington, DC)）においてさらに記載され、分類されている。

10

#### 【0367】

##### （1）非相同末端結合媒介性挿入のためのドナー配列

一部の外因性ドナー配列は、標的ゲノム遺伝子座における（例えば、HSD17B13遺伝子における）ヌクレアーゼ媒介性またはCasタンパク質媒介性切断によって創出される1つまたは複数の突出部と相補的な短い一本鎖領域を5'末端および/または3'末端に有する。これらの突出部は、5'および3'相同アームとも称され得る。例えば、一部の外因性ドナー配列は、標的ゲノム遺伝子座の5'および/または3'標的配列におけるCasタンパク質媒介性切断によって創出される1つまたは複数の突出部と相補的な短い一本鎖領域を5'末端および/または3'末端に有する。一部のそのような外因性ドナー配列は、相補的な領域を5'末端のみに有するかまたは3'末端のみに有する。例えば、一部のそのような外因性ドナー配列は、相補的な領域を、標的ゲノム遺伝子座の5'標的配列において創出される突出部に相補的な5'末端のみに有するかまたは標的ゲノム遺伝子座の3'標的配列において創出される突出部に相補的な3'末端のみに有する。他のそのような外因性ドナー配列は、相補的な領域を5'および3'末端の両方に有する。例えば、他のそのような外因性ドナー配列は、相補的な領域を5'および3'末端の両方に有し、これらは、例えば、それぞれ標的ゲノム遺伝子座におけるCas媒介性切断によって生じる第1および第2の突出部に相補的である。例えば、外因性ドナー配列が二本鎖である場合、一本鎖の相補的な領域を、ドナー配列の上鎖の5'末端およびドナー配列の下鎖の5'末端から伸長させ、それにより、各末端に5'突出部を創出することができる。あるいは、一本鎖の相補的な領域をドナー配列の上鎖の3'末端および鋸型の下鎖の3'末端から伸長させ、それにより、3'突出部を創出することができる。

20

30

#### 【0368】

相補的な領域は、外因性ドナー配列とHSD17B13遺伝子との間のライゲーションを促進するのに十分な任意の長さであってよい。例示的な相補的な領域は、約1～約5ヌクレオチドの長さ、約1～約25ヌクレオチドの長さ、または約5～約150ヌクレオチドの長さである。例えば、相補的な領域は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチドの長さであってよい。あるいは、相補的な領域

40

50

は、約5～約10、約10～約20、約20～約30、約30～約40、約40～約50、約50～約60、約60～約70、約70～約80、約80～約90、約90～約100、約100～約110、約110～約120、約120～約130、約130～約140、約140～約150ヌクレオチドの長さであってよい、またはそれより長くてよい。

### 【0369】

そのような相補的な領域は、ニッカーゼの2つの対によって創出される突出部と相補的であってよい。DNAの逆の鎖を切断して第1の二本鎖切断を創出する第1および第2のニッカーゼ、ならびにDNAの逆の鎖を切断して第2の二本鎖切断を創出する第3および第4のニッカーゼを使用することにより、付着末端を有する2つの二本鎖切断を創出することができる。例えば、Casタンパク質を使用して、第1、第2、第3、および第4のガイドRNAに対応する第1、第2、第3、および第4のガイドRNA標的配列にニックを入れることができる。第1および第2のガイドRNA標的配列を、第1の切断部位が創出され、その結果、DNAの第1および第2の鎖上の第1および第2のニッカーゼによって創出されるニックにより二本鎖切断が創出される（すなわち、第1の切断部位が第1および第2のガイドRNA標的配列内にニックを含む）ように位置付けることができる。同様に、第3および第4のガイドRNA標的配列を、第2の切断部位が創出され、その結果、DNAの第1および第2の鎖上の第3および第4のニッカーゼによって創出されるニックにより二本鎖切断が創出される（すなわち、第2の切断部位が第3および第4のガイドRNA標的配列内にニックを含む）ように位置付けることができる。第1および第2のガイドRNA標的配列ならびに/または第3および第4のガイドRNA標的配列内のニックにより、突出部を創出するニックをオフセットすることができるが好ましい。オフセットウインドウは、例えば、少なくとも約5bp、10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bpであるかまたはそれよりも大きくてよい。それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ranら（2013年）Cell、154巻：1380～1389頁；Maliら（2013年）Nat. Biotech.、31巻：833～838頁；およびShenら（2014年）Nat. Methods、11巻：399～404頁を参照されたい。そのような場合では、二本鎖外因性ドナー配列は、第1および第2のガイドRNA標的配列内のニックによってならびに第3および第4のガイドRNA標的配列内のニックによって創出される突出部に相補的である一本鎖の相補的な領域を有するように設計することができる。次いで、そのような外因性ドナー配列を非相同末端結合媒介性ライゲーションによって挿入することができる。

### 【0370】

#### （2）相同組換え修復によって挿入するためのドナー配列

一部の外因性ドナー配列（すなわち、標的化ベクター）は、相同アームを含む。外因性ドナー配列が核酸挿入物も含む場合、相同アームにより核酸挿入物が挟まれていてよい。参考しやすくするために、本明細書では、相同アームを5'および3'（すなわち、上流および下流の）相同アームと称する。この用語法は、外因性ドナー配列内の核酸挿入物に対する相同アームの相対的な位置に関する。5'および3'相同アームは、本明細書においてそれぞれ「5'標的配列」および「3'標的配列」と称されるHSD17B13遺伝子内の領域に対応する。

### 【0371】

相同アームおよび標的配列は、当該2つの領域が互いにに対して相同組換え反応の基質としての機能を果たすのに十分なレベルの配列同一性を共有する場合、互いに「対応する（correspond）」または「対応する（corresponding）」。「相同性」という用語は、対応する配列と同一であるかまたは配列同一性を共有するDNA配列を包含する。所与の標的配列と外因性ドナー配列に見出される対応する相同アームとの間の配列同一性は、相同組換えが起こるのを可能にする任意の程度の配列同一性であってよい。例えば、外因性ドナー配列（またはその断片）の相同アームおよび標的配列（またはその断片）によって共有される配列同一性の量は、配列が相同組換えを受けるように、少な

10

20

30

40

50

くとも 5 0 %、 5 5 %、 6 0 %、 6 5 %、 7 0 %、 7 5 %、 8 0 %、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %の配列同一性であってよい。さらに、相同アームと対応する標的配列との間の対応する相同領域は、相同組換えを促進するのに十分な任意の長さであってよい。例示的な相同アームは、約 2 5 ヌクレオチド～約 2 . 5 k b の長さであるか、約 2 5 ヌクレオチド～約 1 . 5 k b の長さであるか、または約 2 5 ～約 5 0 0 ヌクレオチドの長さである。例えば、所与の相同アーム（もしくは相同アームのそれぞれ）および／または対応する標的配列は、相同アームが H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の対応する標的配列との相同組換えを受けるのに十分な相同性を有するように、約 2 5 ～約 3 0 、約 3 0 ～約 4 0 、約 4 0 ～約 5 0 、約 5 0 ～約 6 0 、約 6 0 ～約 7 0 、約 7 0 ～約 8 0 、約 8 0 ～約 9 0 、約 9 0 ～約 1 0 0 、約 1 0 0 ～約 1 5 0 、約 1 5 0 ～約 2 0 0 、約 2 0 0 ～約 2 5 0 、約 2 5 0 ～約 3 0 0 、約 3 0 0 ～約 3 5 0 、約 3 5 0 ～約 4 0 0 、約 4 0 0 ～約 4 5 0 、または約 4 5 0 ～約 5 0 0 ヌクレオチドの長さの対応する相同領域を含み得る。あるいは、所与の相同アーム（もしくは各相同アーム）および／または対応する標的配列は、約 0 . 5 k b ～約 1 k b 、約 1 k b ～約 1 . 5 k b 、約 1 . 5 k b ～約 2 k b 、または約 2 k b ～約 2 . 5 k b の長さの対応する相同領域を含み得る。例えば、相同アームはそれぞれ約 7 5 0 ヌクレオチドの長さであってよい。相同アームは対称的であってもよく（それぞれの長さがほぼ同じサイズ）、非対称的であってもよい（一方が他方よりも長い）。

## 【 0 3 7 2 】

相同アームは、細胞に対してネイティブな遺伝子座（例えば、標的化遺伝子座）に対応し得る。あるいは、例えば、相同アームは、例えば、導入遺伝子、発現カセット、または D N A の異種もしくは外因性領域を含めた、細胞のゲノムに組み込まれた異種または外因性 D N A のセグメントの領域に対応し得る。あるいは、標的化ベクターの相同アームは、妥当な宿主細胞に含有される酵母人工染色体（ Y A C ）、細菌人工染色体（ B A C ）、ヒト人工染色体、または任意の他の工学的に操作された領域の領域に対応し得る。なおさらに、標的化ベクターの相同アームは、 B A C ライブライマー、コスミドライブライマー、もしくは P 1 ファージライブライマーの領域に対応し得るもしくはそれに由来し得る、または合成 D N A に由来し得る。

## 【 0 3 7 3 】

ヌクレアーゼ作用剤を外因性ドナー配列と組み合わせて使用する場合、 5 ' および 3 ' 標的配列は、ヌクレアーゼ切斷部位における一本鎖切斷（ニック）または二本鎖切斷の際の標的配列と相同アームとの間の相同組換え事象の発生が促進されるように、ヌクレアーゼ切斷部位に対して十分に近傍に位置することが好ましい。「ヌクレアーゼ切斷部位」という用語は、ヌクレアーゼ作用剤（例えば、ガイド R N A と複合体を形成した C a s 9 タンパク質）によってニックまたは二本鎖切斷が創出される D N A 配列を包含する。外因性ドナー配列の 5 ' および 3 ' 相同アームに対応する H S D 1 7 B 1 3 遺伝子内の標的配列は、ヌクレアーゼ切斷部位における一本鎖切斷または二本鎖切斷の際の 5 ' および 3 ' 標的配列と相同アームとの間の相同組換え事象の発生が促進されるような距離にあれば、ヌクレアーゼ切斷部位に対して「十分に近傍に位置する」。したがって、外因性ドナー配列の 5 ' および／または 3 ' 相同アームに対応する標的配列は、例えば、所与のヌクレアーゼ切斷部位から少なくとも 1 ヌクレオチドの範囲内または所与のヌクレアーゼ切斷部位から少なくとも 1 0 ヌクレオチド～約 1 , 0 0 0 ヌクレオチドの範囲内であり得る。例として、ヌクレアーゼ切斷部位は、標的配列の少なくとも一方または両方のすぐ隣にあり得る。

## 【 0 3 7 4 】

外因性ドナー配列の相同アームに対応する標的配列とヌクレアーゼ切斷部位の空間的関係は変動し得る。例えば、標的配列がヌクレアーゼ切斷部位の 5 ' 側に位置する場合もあり、標的配列がヌクレアーゼ切斷部位の 3 ' 側に位置する場合もあり、標的配列がヌクレアーゼ切斷部位を挟んでいる場合もある。

## 【 0 3 7 5 】

10

20

30

40

50

## I V . 治療的および予防的適用

内因性 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の発現を改変または変更するための本明細書に開示される方法を使用した、慢性肝疾患を有するかまたはそのリスクがある対象における当該疾患の治疗方法および処置または予防方法も提供される。内因性 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子の発現を改変または変更するための本明細書に開示される方法を使用した、アルコール性肝疾患または非アルコール性肝疾患などの肝疾患を有するかまたはそのリスクがある対象における当該疾患の治疗方法および処置または予防方法も提供される。H S D 1 7 B 1 3 m R N A 転写産物の発現を低減するための方法を使用するか、または、対象に H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする組換え核酸を提供するか、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする m R N A を提供するかもしくは H S D 1 7 B 1 3 タンパク質を提供するための方法を使用した、慢性肝疾患を有するかまたはそのリスクがある対象における当該疾患の治疗方法および処置または予防方法も提供される。H S D 1 7 B 1 3 m R N A 転写産物の発現を低減するための方法を使用するか、または、対象に H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする組換え核酸を提供するか、H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする m R N A を提供するかもしくは H S D 1 7 B 1 3 タンパク質を提供するための方法を使用した、アルコール性肝疾患または非アルコール性肝疾患などの肝疾患を有するかまたはそのリスクがある対象における当該疾患の治疗方法および処置または予防方法も提供される。方法は、1つまたは複数の核酸またはタンパク質を対象に、対象の肝臓に、または対象の細胞（例えば、肝細胞）に（例えば、in vivo または ex vivo において）導入するステップを含み得る。

## 【 0 3 7 6 】

慢性肝疾患は、6ヶ月間にわたって続く肝臓の疾患を含み、それらとして、例えば、線維症および肝硬変に至る可能性がある、肝実質の進行性の破壊および再生を伴う肝臓の疾患を挙げることができる。慢性肝疾患は、アルコール性肝疾患または非アルコール性肝疾患であり得る。慢性肝疾患に含まれる肝臓病態としては、例えば、炎症（例えば、慢性肝炎）、肝硬変、および肝細胞癌を挙げることができる。慢性肝疾患の型は、本明細書の他の箇所で開示され、それらとして、例えば、脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患、アルコール性脂肪性肝疾患、肝硬変、および肝細胞癌が挙げられる。慢性肝疾患の症状および徴候は公知であり、それらとして、例えば、肝腫大、疲労、右上腹部の疼痛、腹部膨満（腹水）、皮膚の表面の真下の血管の肥大、男性の乳房肥大、脾腫、手掌紅斑、ならびに皮膚および眼の黄変（黄疸）を挙げることができる。慢性肝疾患に関する検査は、血液検査、肝臓のイメージング、および肝臓の生検を伴い得る。個体は、対象が、その危険因子を有する個体の疾患発症のリスクが危険因子を有さない個体よりも統計的に有意に大きくなる、少なくとも1つの公知の危険因子（例えば、疾患を引き起こす突然変異などの遺伝因子）を有する場合、慢性肝疾患のリスクが高い。慢性肝疾患の危険因子も周知であり、それらとして、例えば、過剰なアルコールの使用、肥満症、高コレステロール、高レベルの血中トリグリセリド、多囊胞性卵巣症候群、睡眠時無呼吸、2型糖尿病、不活性甲状腺（甲状腺機能低下症）、不活性下垂体（下垂体機能低下症）、および血中脂質の上昇を含めたメタボリックシンドロームを挙げることができる。

## 【 0 3 7 7 】

「対象」という用語は、予防的または治療的処置のいずれかを受けるヒトおよび他の哺乳動物対象（例えば、ネコ科の動物、イヌ科の動物、齧歯類、マウス、もしくはラット）または非哺乳動物対象（例えば、家禽）を包含する。そのような対象は、例えば、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではない（または単に H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントのヘテロ接合体保因者である）対象、および慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象（例えば、ヒト）であり得る。ゲノム DNA を含む生体試料中の H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの存在を検出するため、m R N A もしくは c D N A を含む生体試料中の H S D 1 7 B 1 3 転写産物 C、D、E、F、F'、G、および H のいずれか1つもしくは組合せ、特に D の存在もしくはレベルを検出するため、またはタンパク質を含む生体試料中の H S D 1 7 B 1 3 タンパク

10

20

30

40

50

質アイソフォーム C、D、E、F、F'、G、または H のいずれか 1 つもしくは組合せ、特に D の存在もしくはレベルを検出するための種々の方法が可能である。ゲノム DNA 内の配列の存在を検出するため、および特定の mRNA 転写産物またはタンパク質アイソフォームの存在を検出するための方法は周知である。集団内の遺伝子配列、および mRNA、およびそのような遺伝子によってコードされるタンパク質は、一塩基多型などの多型に起因して変動し得ることが理解される。HSD17B13 遺伝子について、ならびに各 HSD17B13 転写産物および HSD17B13 アイソフォームについて本明細書において提示される配列は、単に、HSD17B13 遺伝子について、ならびに各 HSD17B13 転写産物および HSD17B13 アイソフォームについての例示的な配列である。HSD17B13 遺伝子について、ならびに各 HSD17B13 転写産物および HSD17B13 アイソフォームについての他の配列も可能である。 10

### 【 0 3 7 8 】

例えば、細胞内でまたはヒト対象などの対象において HSD17B13 rs72613567 バリアントを検出するための方法は、例えば、HSD17B13 遺伝子を含む対象由来の生体試料を得るステップ、ならびに、HSD17B13 遺伝子および配列番号 2 を最適にアラインメントした場合、配列番号 2 の 12666 位に対応する HSD17B13 遺伝子の位置がチミンに占有されていること、または HSD17B13 遺伝子および配列番号 1 を最適にアラインメントした場合、12665 位に対応する位置および 12666 位に対応する位置の間にチミンが挿入されていることを決定するアッセイを生体試料に対して実施するステップを含み得る。HSD17B13 遺伝子および配列番号 2 を最適にアラインメントした場合、配列番号 2 の 12666 位に対応する HSD17B13 遺伝子の位置がチミンに占有されていることを決定することとは、配列番号 1 の 12665 位および 12666 位に対応する位置にチミンが挿入されていると決定する位置と 12666 位に対応する位置との間にチミンが挿入されていると決定することが可能であることを意味することが理解される。そのようなアッセイは、例えば、HSD17B13 遺伝子および配列番号 2 (または配列番号 1 ) を最適にアラインメントした場合、配列番号 2 の 12666 位 (または配列番号 1 の 12665 位および 12666 位) および 1 つまたは複数の周囲の位置 (例えば、配列番号 2 の 12666 位または配列番号 1 の 12665 位および 12666 位の片側または両側に隣接する少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 力所の位置) に対応する HSD17B13 遺伝子の位置の同一性を決定することを含み得る。そのような方法におけるアッセイは、例えば、HSD17B13 遺伝子および配列番号 2 を最適にアラインメントした場合、配列番号 2 の 12666 位または 12666 位および 12667 位に対応する位置を含む HSD17B13 遺伝子の一部を配列決定することを含み得る。同様に、アッセイは、HSD17B13 遺伝子および配列番号 1 を最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 12665 位および 12666 位に対応する位置を含む HSD17B13 遺伝子の一部を配列決定することを含み得る。あるいは、そのような方法におけるアッセイは、生体試料を、HSD17B13 rs72613567 バリアントに特異的にハイブリダイズし、対応する野生型 HSD17B13 配列にはハイブリダイズしない (例えば、ストリンジエントな条件下で) プライマーまたはプローブと接触させること、およびハイブリダイゼーションが起こったかどうかを決定することを含み得る。 20 30 40

### 【 0 3 7 9 】

そのような方法は、ゲノム編集または遺伝子治療を含み得る。例えば、HSD17B13 rs72613567 バリアントではない内因性 HSD17B13 遺伝子を、HSD17B13 rs72613567 バリアントに特異的にハイブリダイズし、対応する野生型 HSD17B13 配列にはハイブリダイズしない (例えば、ストリンジエントな条件下で) プライマーまたはプローブと接触させること、およびハイブリダイゼーションが起こったかどうかを決定することを含み得る。別の例として、HSD17B13 rs72613567 バリアントではない内因性 HSD 50

17 B 1 3 遺伝子をノックアウトまたは不活性化することができる。同様に、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントではない内因性 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子をノックアウトまたは不活性化することができ、かつ、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントに関連する変更を含む H S D 1 7 B 1 3 遺伝子（例えば、変更を含む完全な H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントまたはミニ遺伝子）を導入し、発現させることができる。同様に、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントではない内因性 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子をノックアウトまたは不活性化することができ、かつ、H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C、D、F、G、および H（またはその断片）のいずれか 1 つまたはそれらの任意の組合せをコードする組換え DNA を導入し、発現させることができるか、H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C、D、F、G、および H（またはその断片）のいずれか 1 つまたはそれらの任意の組合せをコードする mRNA を導入し、発現させることができるか（例えば、細胞内タンパク質補充療法）、または H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C、D、F、G、および H（またはその断片）のいずれか 1 つまたはそれらの任意の組合せを導入することができる（例えば、タンパク質補充療法）。特定の実施形態では、H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム（またはコードする DNA もしくは mRNA）の組合せは、H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D を含む組合せ（例えば、D、D C、D F、D G、D H、D C F、D C G、D C H、D F G、D F H、D G H、D C F G、D C F H、D C G H、D F G H、または D C F G H）である。

#### 【 0 3 8 0 】

他のそのような方法は、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントではない内因性 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子をノックアウトまたは不活性化せずに、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントに関連する変更を含む組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子（例えば、変更を含む完全な H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントもしくはミニ遺伝子）を導入し、発現させるステップ、H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C、D、F、G、および H もしくはその断片のいずれか 1 つもしくはそれらの任意の組合せをコードする組換え核酸（例えば、DNA）を導入し、発現させるステップ、H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C、D、F、G、および H またはその断片のいずれか 1 つもしくはそれらの任意の組合せをコードする 1 つもしくは複数の mRNA を導入し、発現させるステップ（例えば、細胞内タンパク質補充療法）、または H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C、D、F、G、および H もしくはその断片のいずれか 1 つもしくはそれらの任意の組合せを導入するステップ（例えば、タンパク質補充療法）を含み得る。特定の実施形態では、H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム（またはコードする DNA もしくは mRNA）の組合せは、H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D を含む組合せ（例えば、D、D C、D F、D G、D H、D C F、D C G、D C H、D F G、D F H、D G H、D C F G、D C F H、D C G H、D F G H、または D C F G H）である。必要に応じて、そのような方法は、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者（例えば、転写産物 A、B、E、および F'）において発現が低減する H S D 1 7 B 1 3 転写産物を、例えばアンチセンス RNA、s i RNA、または s h RNA の使用による発現の低減のために標的化する方法と組み合わせて行うこともできる。特定の実施形態では、発現の低減のために標的化される H S D 1 7 B 1 3 転写産物は、転写産物 A を含む組合せ（例えば、A、A B、A E、A F'、A B E、A B F'、A E F'、または A B E F'）である。

#### 【 0 3 8 1 】

H S D 1 7 B 1 3 遺伝子またはミニ遺伝子または H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C、D、F、G、および H またはその断片のいずれか 1 つまたはそれらの任意の組合せをコードする DNA は、ゲノムを変更しない発現ベクターの形態で導入し、発現させることができるか、H S D 1 7 B 1 3 遺伝子座にゲノム的に組み込まれるように標的化ベクターの形態で導入することができるか、または H S D 1 7 B 1 3 遺伝子座以外の遺伝子座、例えばセーフハーバー遺伝子座にゲノム的に組み込まれるように導入することができる。ゲノム的に組み込まれる H S D 1 7 B 1 3 遺伝子は、H S D 1 7 B 1 3 プロモーターまたは組込み部位の内因性プロモーターなどの別のプロモーターに作動可能に連結することができる。

10

20

30

40

50

セーフハーバー遺伝子座は、目的の組織全てにおいて遺伝子の構造または発現に悪影響を及ぼすことなく導入遺伝子を安定にかつ確実に発現させることができる、染色体上の部位である。セーフハーバー遺伝子座は、例えば、以下の特性の1つまたは複数または全てを有し得る：(1)任意の遺伝子の5'末端からの距離が50 kbよりも大きい；任意のがん関連遺伝子からの距離が300 kbよりも大きい；任意のマイクロRNAからの距離が300 kbよりも大きい；遺伝子転写単位の外側であり、超保存領域の外側である。適切なセーフハーバー遺伝子座の例としては、アデノ随伴ウイルス部位1(AAVS1)、ケモカイン(CCR5)受容体5(CCR5)遺伝子遺伝子座、およびマウスROSA26遺伝子座のヒトオルソログが挙げられる。

## 【0382】

10

導入し、発現させることができるHSD17B13タンパク質アイソフォームまたはHSD17B13タンパク質アイソフォームをコードする核酸の組合せとしては、例えば、C、D、F、G、H、CD、CF、CG、CH、DF、DG、DH、FG、FH、GH、CDF、CDG、CDH、CFG、CFH、CGH、DFG、DFH、DGH、FGH、CDFG、CDFH、CFGH、DFGH、およびCDFGHが挙げられる。特定の方法では、HSD17B13アイソフォームDまたはアイソフォームDをコードする核酸（単独で、または他のアイソフォームと組み合わせて）を導入するかまたは発現させる。これらのアイソフォームおよび転写産物のそれぞれの例示的な配列は本明細書の他の箇所に提示される。しかし、集団内の遺伝子配列、そのような遺伝子から転写されるmRNA配列、およびそのようなmRNAから翻訳されるタンパク質は、一塩基多型などの多型に起因して変動し得ることが理解される。各転写産物について本明細書において提示される配列およびアイソフォームは、単に例示的な配列である。他の配列も可能である。

## 【0383】

20

アンチセンスRNA、shRNA、またはsiRNAによる低減のために発現を標的化することができるHSD17B13転写産物の組合せとしては、例えば、A、B、E、F'、AB、AE、AF'、BE、BF'、ABE、ABF'、AEF'、BEF'、およびABEF'が挙げられる。特定の方法では、HSD17B13転写産物A（単独で、または他の転写産物と組み合わせて）を標的化する。例えば、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAは、配列番号4（HSD17B13転写産物A）内の配列とハイブリダイズし得る。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAを、配列番号7（HSD17B13転写産物D）には存在しない、配列番号4（HSD17B13転写産物A）に存在する配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンスRNA、siRNA、またはshRNAを、配列番号4（HSD17B13転写産物A）のエクソン7内の配列またはエクソン6とエクソン7との境界にまたがる配列とハイブリダイズする。

30

## 【0384】

40

例えば、一部のそのような方法は、HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではなく（または単にHSD17B13 rs72613567バリアントのヘテロ接合体保因者であり）、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、(a) HSD17B13遺伝子内のヌクレアーゼ標的配列に結合するヌクレアーゼ作用剤（またはコードする核酸）であって、ヌクレアーゼ標的配列が、HSD17B13遺伝子を配列番号2と最適にアライメントした場合、配列番号2の1266位に対応する位置を含むかまたはその位置に近接している、ヌクレアーゼ作用剤（またはコードする核酸）；ならびに(b)配列番号2の1266位に対応する位置の5'側の標的配列とハイブリダイズする5'相同アーム、配列番号2の1266位に対応する位置の3'側の標的配列とハイブリダイズする3'相同アーム、および5'相同アームと3'相同アームに挟まれたチミンを含む核酸挿入物を含む外因性ドナー配列を対象に導入するかまたは対象の肝細胞に導入するステップを含む方法を含む。ヌクレアーゼ作用剤が対象の肝細胞内でHSD17B13遺伝子を切断することができ、外因性ドナー配列が肝細胞内のHSD17B13遺伝子と組換えられることができ、外因性ドナー配列がHSD17B13遺伝子と組換えられると、HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアライ

50

ンメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間にチミンが挿入される。そのような方法において使用することができるヌクレアーゼ作用剤（例えば、Cas9タンパク質およびガイドRNA）の例は、本明細書の他の箇所で開示される。適切なガイドRNAおよびガイドRNA標的配列の例は、本明細書の他の箇所で開示される。そのような方法において使用することができる外因性ドナー配列の例は、本明細書の他の箇所で開示される。

【0385】

別の例として、一部のそのような方法は、HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではなく（または単にHSD17B13 rs72613567バリアントのヘテロ接合体保因者であり）、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、配列番号2の12666位に対応する位置の5'側の標的配列とハイブリダイズする5'相同アーム、配列番号2の12666位に対応する位置の3'側の標的配列とハイブリダイズする3'相同アーム、および5'相同アームと3'相同アームに挟まれたチミンを含む核酸挿入物を含む外因性ドナー配列を対象に導入するかまたは対象の肝細胞に導入するステップを含む方法を含む。外因性ドナー配列が肝細胞内のHSD17B13遺伝子と組換えられることができ、外因性ドナー配列がHSD17B13遺伝子と組換えられると、HSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間にチミンが挿入される。そのような方法において使用することができる外因性ドナー配列の例は、本明細書の他の箇所で開示される。

10

【0386】

一部のそのような方法は、HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではなく（または単にHSD17B13 rs72613567バリアントのヘテロ接合体保因者であり）、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、（a）HSD17B13遺伝子内のヌクレアーゼ標的配列に結合するヌクレアーゼ作用剤（またはコードする核酸）であって、ヌクレアーゼ標的配列が、HSD17B13遺伝子の開始コドンを含むか、または開始コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内であるか、または配列番号20～81から選択される、ヌクレアーゼ作用剤（またはコードする核酸）を対象に導入するかまたは対象の肝細胞に導入するステップを含む方法を含む。ヌクレアーゼ作用剤が対象の肝細胞内でHSD17B13遺伝子を切断し、その発現を破壊することができる。一部そのような方法は、HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではなく（または単にHSD17B13 rs72613567バリアントのヘテロ接合体保因者であり）、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、（a）HSD17B13遺伝子内のヌクレアーゼ標的配列に結合するヌクレアーゼ作用剤（またはコードする核酸）であって、ヌクレアーゼ標的配列が、HSD17B13遺伝子の開始コドンを含むか、または開始コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内であるか、または配列番号20～81から選択される、ヌクレアーゼ作用剤（またはコードする核酸）；および（b）組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えHSD17B13遺伝子を含む発現ベクターを対象に導入するかまたは対象の肝細胞に導入するステップを含む方法を含む。発現ベクターは、ゲノム的に組み込まれないものであつてよい。あるいは、組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えHSD17B13遺伝子を含む標的化ベクター（すなわち、外因性ドナー配列）を導入することができる。ヌクレアーゼ作用剤が対象の肝細胞内でHSD17B13遺伝子を切断し、その発現を破壊することができる、発現ベクターが対象の肝細胞内で組換えHSD17B13遺伝子を発現することができ

20

30

40

50

る。あるいは、ゲノム的に組み込まれた組換えHSD17B13遺伝子が対象の肝細胞内で発現することができる。そのような方法において使用することができるヌクレアーゼ作用剤（例えば、ヌクレアーゼ活性Cas9タンパク質およびガイドRNA）の例は、本明細書の他の箇所で開示される。適切なガイドRNAおよびガイドRNA標的配列の例は、本明細書の他の箇所で開示される。適切なガイドRNAおよびガイドRNA標的配列の例は、本明細書の他の箇所で開示される。ステップ(b)は、代わりに、HSD17B13アイソフォームC、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードする核酸（例えば、DNA）を含み、かつ/または、HSD17B13転写産物C、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である配列を含む、発現ベクターまたは標的化ベクターを導入することを含んでもよい。同様に、ステップ(b)は、代わりに、HSD17B13アイソフォームC、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードし、かつ/または、HSD17B13転写産物C、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である相補DNA（またはその一部）を有するmRNAを導入することを含んでもよい。同様に、ステップ(b)は、代わりに、HSD17B13アイソフォームC、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である配列を含むタンパク質を導入することを含んでもよい。特定の方法では、転写産物はHSD17B13転写産物D（例えば、配列番号7）であり得るか、またはアイソフォームはHSD17B13アイソフォームD（例えば、配列番号15）であり得る。他の特定の方法では、HSD17B13アイソフォームの組合せ、またはHSD17B13アイソフォームの組合せをコードする発現ベクターもしくは標的化ベクター、またはHSD17B13アイソフォームの組合せをコードするmRNAを導入することができる（例えば、D、DC、DF、DG、DH、DCF、DCG、DCH、DFG、DFH、DGH、DCFG、DCFH、DCGH、DFGH、またはDCFGH）。

#### 【0387】

一部のそのような方法では、第2のヌクレアーゼ作用剤も対象または対象の肝細胞に導入し、ここで、第2のヌクレアーゼ作用剤は、HSD17B13遺伝子内の第2のヌクレアーゼ標的配列に結合し、第2のヌクレアーゼ標的配列は、HSD17B13遺伝子の終止コドンを含むか、または終止コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌクレオチドの範囲内であるか、または配列番号82～225から選択され、ヌクレアーゼ作用剤は、肝細胞内のHSD17B13遺伝子を第1のヌクレアーゼ標的配列内および第2のヌクレアーゼ標的配列内の両方で切断し、肝細胞が、第1のヌクレアーゼ標的配列と第2のヌクレアーゼ標的配列との間に欠失を含むように改変される。例えば、第2のヌクレアーゼ作用剤は、Cas9タンパク質およびガイドRNAであり得る。終止コドンの近傍にある適切なガイドRNAおよびガイドRNA標的配列は、本明細書の他の箇所で開示される。

#### 【0388】

そのような方法はまた、HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではなく（または単にHSD17B13 rs72613567バリアントのヘテロ接合体保因者であり）、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、(a) HSD17B13遺伝子内のDNA結合タンパク質標的配列に結合するDNA結合タンパク質（またはコードする核酸）であって、DNA結合タンパク質標的配列が、HSD17B13遺伝子の開始コドンを含むか、または開始コドンから約10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または1,000ヌク

10

20

30

40

50

レオチドの範囲内であるか、または配列番号 20 ~ 81 から選択される、DNA 結合タンパク質（またはコードする核酸）を対象に導入するかまたは対象の肝細胞に導入するステップを含む方法も含み得る。DNA 結合タンパク質は、対象の肝細胞内での HSD17B13 遺伝子の発現を変更（例えば、低減）することができる。そのような方法はまた、HSD17B13 rs72613567 バリアントの保因者ではなく（または単に HSD17B13 rs72613567 バリアントのヘテロ接合体保因者であり）、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、(a) HSD17B13 遺伝子内の DNA 結合タンパク質標的配列に結合する DNA 結合タンパク質（またはコードする核酸）であって、DNA 結合タンパク質標的配列が、HSD17B13 遺伝子の開始コドンを含むか、または開始コドンから約 10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、または 1,000 ヌクレオチドの範囲内であるか、または配列番号 20 ~ 81 から選択される、DNA 結合タンパク質（またはコードする核酸）；および (b) 組換え HSD17B13 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 12665 位に対応するヌクレオチドと 12666 位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換え HSD17B13 遺伝子を含む発現ベクターを対象に導入するかまたは対象の肝細胞に導入するステップを含む方法も含み得る。発現ベクターは、ゲノム的に組み込まれないものであってよい。あるいは、組換え HSD17B13 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 12665 位に対応するヌクレオチドと 12666 位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換え HSD17B13 遺伝子を含む標的化ベクター（すなわち、外因性ドナー配列）を導入することができる。DNA 結合タンパク質が対象の肝細胞内での HSD17B13 遺伝子の発現を変更（例えば、低減）することができ、発現ベクターが対象の肝細胞内で組換え HSD17B13 遺伝子を発現することができる。あるいは、ゲノム的に組み込まれた組換え HSD17B13 遺伝子が対象の肝細胞内で発現することができる。そのような方法における使用に適した DNA 結合タンパク質の例は、本明細書の他の箇所で開示される。そのような DNA 結合タンパク質（例えば、Cas9 タンパク質およびガイド RNA）は、転写リプレッサーと融合するかまたは作動可能に連結することができる。例えば、DNA 結合タンパク質は、転写リプレッサーと融合した、触媒として不活性な Cas9 タンパク質であり得る。そのような転写リプレッサーと融合した DNA 結合タンパク質は、例えば、野生型 HSD17B13 遺伝子または rs72613567 バリアントではない HSD17B13 遺伝子の発現を低減するために（例えば、HSD17B13 転写産物またはアイソフォーム A の発現を低減するために）使用することができる。適切なガイド RNA およびガイド RNA 標的配列の例は、本明細書の他の箇所で開示される。ステップ (b) は、代わりに、HSD17B13 アイソフォーム C、D、F、G、もしくは H またはその断片と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である HSD17B13 タンパク質をコードする核酸（例えば、DNA）を含み、かつ / または、HSD17B13 転写産物 C、D、F、G、もしくは H またはその断片と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である配列を含む、発現ベクターまたは標的化ベクターを導入することを含んでもよい。同様に、ステップ (b) は、代わりに、HSD17B13 アイソフォーム C、D、F、G、もしくは H またはその断片と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である HSD17B13 タンパク質をコードし、かつ / または、HSD17B13 転写産物 C、D、F、G、もしくは H またはその断片と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である相補 DNA（またはその一部）を有する mRNA を導入することを含んでもよい。同様に、ステップ (b) は、代わりに、HSD17B13 アイソフォーム C、D、F、G、もしくは H またはその断片と少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97% 10 20 30 40 50

、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一である配列を含むタンパク質を導入することを含んでもよい。特定の方法では、転写産物は H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ( 例えは、配列番号 7 ) であり得るか、またはアイソフォームは H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D ( 例えは、配列番号 15 ) であり得る。他の特定の方法では、 H S D 1 7 B 1 3 アイソフォームの組合せ、または H S D 1 7 B 1 3 アイソフォームの組合せをコードする発現ベクターもしくは標的化ベクター、または H S D 1 7 B 1 3 アイソフォームの組合せをコードする mRNA を導入することができる ( 例えは、 D 、 D C 、 D F 、 D G 、 D H 、 D C F 、 D C G 、 D C H 、 D F G 、 D F H 、 D G H 、 D C F G 、 D C F H 、 D C G H 、 D F G H 、または D C F G H ) 。

## 【 0 3 8 9 】

10  
そのような方法はまた、 H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントの保因者ではなく ( または単に H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアントのヘテロ接合体保因者であり ) 、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、 H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A 、 B 、 E 、および F ' のうちの 1 つまたは複数 ( 特に A ) の領域内の、必要に応じて、 1 つまたは複数の H S D 1 7 B 1 3 転写産物 C 、 D 、 F 、 G 、および H ( 特に D ) には存在しない配列とハイブリダイズするアンチセンス RNA 、 siRNA 、または shRNA を対象に導入するかまたは対象の肝細胞に導入するステップを含む方法も含み得る。必要に応じて、アンチセンス RNA 、 siRNA 、または shRNA は、配列番号 4 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A ) 内の配列とハイブリダイズし、アンチセンス RNA 、 siRNA 、または shRNA は、細胞内の H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A の発現を低減し得る。必要に応じて、アンチセンス RNA 、 siRNA 、または shRNA は、配列番号 7 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ) には存在しない、配列番号 4 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A ) に存在する配列とハイブリダイズする。必要に応じて、アンチセンス RNA 、 siRNA 、または shRNA は、配列番号 4 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A ) のエクソン 7 内の配列またはエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる配列とハイブリダイズする。例えは、アンチセンス RNA 、 siRNA 、または shRNA は、エクソン 7 の領域内または配列番号 4 ( H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A ) のエクソン 6 とエクソン 7 との境界にまたがる領域内の配列とハイブリダイズし、対象の肝細胞内での H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A の発現を低減し得る。必要に応じて、そのような方法は、組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位に対応するヌクレオチドと 1 2 6 6 6 位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を含む発現ベクターを対象に導入するステップをさらに含み得る。発現ベクターは、ゲノム的に組み込まれないものであってよい。あるいは、組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を配列番号 1 と最適にアラインメントした場合、配列番号 1 の 1 2 6 6 5 位に対応するヌクレオチドと 1 2 6 6 6 位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を含む標的化ベクター ( すなわち、外因性ドナー配列 ) を導入することができる。発現ベクターを使用する方法では、発現ベクターが対象の肝細胞内で組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子を発現することができる。あるいは、組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子がゲノム的に組み込まれる方法では、組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子が対象の肝細胞内で発現することができる。そのような方法は、代わりに、 H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C 、 D 、 F 、 G 、もしくは H またはその断片と少なくとも 90% 、少なくとも 95% 、少なくとも 96% 、少なくとも 97% 、少なくとも 98% 、少なくとも 99% 、または 100% 同一である H S D 1 7 B 1 3 タンパク質をコードする核酸 ( 例えは、 DNA ) を含み、かつ / または、 H S D 1 7 B 1 3 転写産物 C 、 D 、 F 、 G 、もしくは H またはその断片と少なくとも 90% 、少なくとも 95% 、少なくとも 96% 、少なくとも 97% 、少なくとも 98% 、少なくとも 99% 、または 100% 同一である配列を含む、発現ベクターまたは標的化ベクターを導入するステップを含んでもよい。同様に、そのような方法は、代わりに、 H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム C 、 D 、 F 、 G 、もしくは H またはその断片と少なくとも 90% 、少なくとも 95% 、少なくとも 96% 、少なくとも 97% 、少なくとも 98% 、少なくとも 99% 10  
20  
30  
40  
50

、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードし、かつ／または、HSD17B13転写産物C、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である相補DNA（またはその一部）を有するmRNAを導入するステップを含んでもよい。同様に、そのような方法は、代わりに、HSD17B13アイソフォームC、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である配列を含むタンパク質を導入するステップを含んでもよい。特定の方法では、転写産物はHSD17B13転写産物D（例えば、配列番号7）であり得るか、またはアイソフォームはHSD17B13アイソフォームD（例えば、配列番号15）であり得る。他の特定の方法では、HSD17B13アイソフォームの組合せ、またはHSD17B13アイソフォームの組合せをコードする発現ベクターもしくは標的化ベクター、またはHSD17B13アイソフォームの組合せをコードするmRNAを導入することができる（例えば、D、DC、DF、DG、DH、DCF、DCG、DCH、DFG、DFH、DGH、DCF G、DCF H、DCGH、DFGH、またはDCFGH）。

#### 【0390】

他のそのような方法は、HSD17B13 rs72613567バリアントの保因者ではなく（または単にHSD17B13 rs72613567バリアントのヘテロ接合体保因者であり）、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象を処置する方法であって、発現ベクターを対象に導入するかまたは対象の肝細胞に導入するステップを含み、発現ベクターが、組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えHSD17B13遺伝子を含み、発現ベクターが、対象の肝細胞内で組換えHSD17B13遺伝子を発現する、方法を含み得る。発現ベクターは、ゲノム的に組み込まれないものであってよい。あるいは、組換えHSD17B13遺伝子を配列番号1と最適にアラインメントした場合、配列番号1の12665位に対応するヌクレオチドと12666位に対応するヌクレオチドとの間に挿入されたチミンを含む組換えHSD17B13遺伝子を含む標的化ベクター（すなわち、外因性ドナー配列）を導入することができる。発現ベクターを使用する方法では、発現ベクターが対象の肝細胞内で組換えHSD17B13遺伝子を発現することができる。あるいは、組換えHSD17B13遺伝子がゲノム的に組み込まれる方法では、組換えHSD17B13遺伝子が対象の肝細胞内で発現することができる。そのような方法は、代わりに、HSD17B13アイソフォームC、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードする核酸（例えば、DNA）を含み、かつ／または、HSD17B13転写産物C、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である配列を含む、発現ベクターまたは標的化ベクターを導入するステップを含んでもよい。同様に、そのような方法は、代わりに、HSD17B13アイソフォームC、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるHSD17B13タンパク質をコードし、かつ／または、HSD17B13転写産物C、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である相補DNA（またはその一部）を有するmRNAを導入するステップを含んでもよい。同様に、そのような方法は、代わりに、HSD17B13アイソフォームC、D、F、G、もしくはHまたはその断片と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%

10

20

30

40

50

%同一である配列を含むタンパク質を導入するステップを含んでもよい。特定の方法では、転写産物は H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D ( 例えは、配列番号 7 ) であり得るか、またはアイソフォームは H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D ( 例えは、配列番号 1 5 ) であり得る。他の特定の方法では、 H S D 1 7 B 1 3 アイソフォームの組合せ、または H S D 1 7 B 1 3 アイソフォームの組合せをコードする発現ベクターもしくは標的化ベクター、または H S D 1 7 B 1 3 アイソフォームの組合せをコードする mRNA を導入することができる ( 例えは、 D 、 D C 、 D F 、 D G 、 D H 、 D C F 、 D C G 、 D C H 、 D F G 、 D F H 、 D G H 、 D C F G 、 D C F H 、 D C G H 、 D F G H 、または D C F G H ) 。

#### 【 0 3 9 1 】

上記の方法のいずれかにおいて使用するための適切な発現ベクターおよび組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子は、本明細書の他の箇所で開示される。例えは、組換え H S D 1 7 B 1 3 遺伝子は、完全な r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアント遺伝子であってもよく、遺伝子の 1 つまたは複数の非必須セグメントが対応する野生型 H S D 1 7 B 1 3 遺伝子に対して欠失している H S D 1 7 B 1 3 ミニ遺伝子であってもよい。例として、欠失したセグメントは、 1 つまたは複数のインtron 配列を含み得、ミニ遺伝子は、配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 のインtron 6 に対応するインtron を含み得る。完全な r s 7 2 6 1 3 5 6 7 バリアント遺伝子の例は、配列番号 2 と最適にアラインメントした場合、配列番号 2 と少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、または少なくとも 9 9 % 同一であるものである。

#### 【 0 3 9 2 】

一部のそのような方法は、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象において細胞 ( 例えは、肝細胞 ) を改変する方法を含む。そのような方法では、ヌクレアーゼ作用剤および / または外因性ドナー配列および / または組換え発現ベクターを、細胞に、処置される慢性肝疾患の発症を遅延させる、重症度を低下させる、さらなる悪化を阻害する、および / または少なくとも 1 つの徴候もしくは症状を好転させる投与量、投与経路および投与の頻度を意味する有効なレジームで投与することにより導入することができる。「症状」という用語は、対象によって知覚される疾患の主観的証拠を指し、「徴候」は、医師によって観察される疾患の客観的証拠を指す。対象が疾患にすでに罹患している場合、レジームは、治療的に有効なレジームと称され得る。対象の疾患のリスクが一般集団と比べて上昇しているがまだ症状が出ていない場合、レジームは、予防的に有効なレジームと称され得る。一部の例では、治療的または予防的有効性は、個々の患者において歴史的対照または同じ対象における過去の経験と比べて観察することができる。他の場合では、治療的または予防的有効性は、前臨床または臨床試験において、処置された対象の集団と無処置の対象の対照集団を比べて実証することができる。

#### 【 0 3 9 3 】

送達は、本明細書の他の箇所で開示される任意の適切な方法であってよい。例えは、ヌクレアーゼ作用剤または外因性ドナー配列または組換え発現ベクターを、ベクター送達、ウイルスによる送達、粒子媒介性送達、ナノ粒子媒介性送達、リポソーム媒介性送達、エキソソーム媒介性送達、脂質媒介性送達、脂質ナノ粒子媒介性送達、細胞透過性ペプチド媒介性送達、または埋め込み型デバイス媒介性送達によって送達することができる。一部の特定の例として、流体力学的送達、ウイルス媒介性送達、および脂質ナノ粒子媒介性送達が挙げられる。

#### 【 0 3 9 4 】

投与は、例えは、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、局所、鼻腔内、または筋肉内を含めた任意の適切な経路によるものであってよい。例えはタンパク質補充療法のために多くの場合使用される具体例は、静脈内注入である。投与の頻度および投与量の数は、他の因子の中でも、ヌクレアーゼ作用剤または外因性ドナー配列または組換え発現ベクターの半減期、対象の状態、および投与経路に依存し得る。投与するための医薬組成物は、無菌かつ実質的に等張性であり、 G M P 条件下で製造されることが好ましい。医薬組成物は、単位剤形 ( すなわち、単回投与用の投与量 ) で提供することが

10

20

30

40

50

できる。医薬組成物は、1つまたは複数の生理的かつ薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤または助剤を使用して製剤化することができる。製剤は、選択される投与経路に依存する。「薬学的に許容される」という用語は、担体、希釈剤、賦形剤、または助剤が製剤の他の成分に適合し、そのレシピエントに対して実質的に有害でないことを意味する。

【0395】

他のそのような方法は、慢性肝疾患を有するかまたはそれを発症しやすい対象由来の細胞におけるe x v i v o方法を含む。次いで、標的化遺伝子改変を有する細胞を対象に移植し戻すことができる。

【0396】

本明細書に開示される治療または予防方法はいずれも、より臨床的に進行した段階の慢性肝疾患への進行（例えば、単純な脂肪症から、より臨床的に進行した段階の慢性肝疾患への進行、または単純な脂肪症から脂肪性肝炎、線維症、肝硬変、および肝細胞癌の1つまたは複数への進行）に付随する1つまたは複数の症状が防止または緩和されるように調整された治療薬を投与するステップをさらに含み得る。例えば、そのような処置は、炎症を防止もしくは低減することまたは線維症を防止もしくは低減することに焦点を当てることができる。開発中のそのような治療薬の例を以下に提示する。

【表G】

薬物(会社)	段階	型	遺伝子標的	注釈
OCA-オベチコール酸 (Intercept)	第 III 相	アゴニスト	NR1H4 (FXR)	改善された NAS、第 IIb 相において線維症を逆転させた
GS-9674 (Gilead)				
シムツズマブ(Gilead)	第 II 相	阻害剤	LOXL2	線維症(NASH/PSC)を逆転させる潜在性
GS-4997 (Gilead)	第 II 相	阻害剤	MAP3K5	酸化ストレスを低減する
NDI-010976 (Gilead)	第 I 相	阻害剤	ACACA	脂質生成を妨げる
			ACACB	
GFT505 / Elafibranor (Genfit)	第 III 相	アゴニスト	PPARA	脂肪酸を分解する、脂肪&グルコース産生を遮断する、炎症を低減する
			PPARD	
Aramchol (Galmed)	第 II 相	阻害剤	SCD (ABCA1)	脂肪酸-胆汁酸コンジュゲート:肝臓脂肪代謝をブーストする
Cenicriviroc (Tobira)	第 IIb 相		CCR2 CCR5	
GR-MD-02 (Galectin Therapeutics)	第 II 相	阻害剤	LGALS3	線維症ではガレクチン-3 が上方制御される
TD139 (Galecto Biotech)	第 I 相			
SHP626 (Shire)	第 I 相	阻害剤	SLC10A2	胆汁酸再利用に干渉する
PXS4728A - (Boehringer Ingelheim)	第 I 相	阻害剤	AOC3	抗炎症性
RP103-システアミン酒石酸塩 (Raptor)	第 II 相	枯渴剤	CTNS	システィンを枯渇させる:潜在的な抗酸化剤

【0397】

上文または下で引用されている全ての特許出願、ウェブサイト、他の刊行物、受託番号などは、各項目が参照により組み込まれることが具体的にかつ個別に示されるのと同じ程度に、あらゆる目的に関してその全体が参照により組み込まれる。違う時間に受託番号に異

10

20

30

40

50

なるバージョンの配列が関連付けられている場合、本出願の有効な出願日において受託番号に関連付けられるバージョンを意味する。有効な出願日とは、該当する場合、受託番号に関して実際の出願日または優先出願の出願日の早い方を意味する。同様に、異なるバージョンの刊行物、ウェブサイトなどが違う時間に公開されている場合、別段の指定のない限り本出願の有効な出願日時点で直近に公開されたバージョンを意味する。特に他の指示がなければ、本発明の任意の特徴、ステップ、要素、実施形態、または態様を任意の他のものと組み合わせて使用することができる。本発明を明瞭さおよび理解のために図表および例によって少し詳細に記載してきたが、ある特定の変化および改変を添付の特許請求の範囲内で実施することができるようにならう。

【 0 3 9 8 】

10

#### 配列の簡単な説明

添付の配列表に列挙されているヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、ヌクレオチド塩基については標準の文字略語、およびアミノ酸については3文字コードを使用して示されている。ヌクレオチド配列は、配列の5'末端から始まり、フォワード方向に（すなわち、各線の左から右に）3'末端まで進む標準の慣習に従う。各ヌクレオチド配列の一方の鎖のみが示されているが、示されている鎖へのいかなる言及にも相補鎖が含まれると理解される。アミノ酸配列は、配列のアミノ末端から始まり、フォワード方向に（すなわち、各線の左から右に）カルボキシ末端まで進む標準の慣習に従う。

20

30

40

50

【表H-1】

配列番号	型	説明
1	DNA	<p>HSD17B13 野生型ゲノム配列(Human Genome Assembly GRCh38)</p> <p><b>野生型 HSD17B13 遺伝子を有する対象により広く行きわたっている転写産物:</b></p> <p><b>転写産物 A</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- エクソン 1 = 1-275</li> <li>- エクソン 2 = 4471-4578</li> <li>- エクソン 3 = 5684-5815</li> <li>- エクソン 4 = 7308-7414</li> <li>- エクソン 5 = 8947-9084</li> <li>- エクソン 6v1 = 12548-12664</li> <li>- エクソン 7 = 17599-19118</li> </ul> <p><b>転写産物 B</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- エクソン 1 = 1-275</li> <li>- エクソン 2 = スキップ</li> <li>- エクソン 3 = 5684-5815</li> <li>- エクソン 4 = 7308-7414</li> <li>- エクソン 5 = 8947-9084</li> <li>- エクソン 6v1 = 12548-12664</li> <li>- エクソン 7 = 17599-19118</li> </ul> <p><b>転写産物 E</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- エクソン 1 = 1-275</li> <li>- エクソン 2 = 4471-4578</li> <li>- エクソン 3 = 5684-5815</li> <li>- エクソン 3' = 6210-6281</li> <li>- エクソン 4 = 7308-7414</li> <li>- エクソン 5 = 8947-9084</li> <li>- エクソン 6v1 = 12548-12664</li> <li>- エクソン 7 = 17599-19118</li> </ul> <p><b>転写産物 F'</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- エクソン 1 = 1-275</li> <li>- エクソン 2 = 4471-4578</li> <li>- エクソン 3 = 5684-5815</li> <li>- エクソン 4 = 7308-7414</li> <li>- エクソン 5 = 8947-9084</li> <li>- エクソン 6v3 = 12548-13501 (エクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーアンノテーション)</li> <li>- エクソン 7 = スキップ</li> </ul>

10

20

30

40

50

【表 H - 2】

配列番号	型	説明	
2	DNA	<p>HSD17B13 ゲノム配列バリエント(Human Genome Assembly GRCh38:rs72613567-chr4:87310241-87310240 への T の挿入):12666 位への T の挿入</p> <p><i>rs72613567 HSD17B13 遺伝子バリエントを有する対象により広く行きわたっている 転写産物:</i></p> <p><b>転写産物 C</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- エクソン 1 = 1-275</li> <li>- エクソン 2 = 4471-4578</li> <li>- エクソン 3 = 5684-5815</li> <li>- エクソン 4 = 7308-7414</li> <li>- エクソン 5 = 8947-9084</li> <li>- エクソン 6 = スキップ</li> <li>- エクソン 7 = 17600-19119</li> </ul> <p><b>転写産物 D</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- エクソン 1 = 1-275</li> <li>- エクソン 2 = 4471-4578</li> <li>- エクソン 3 = 5684-5815</li> <li>- エクソン 4 = 7308-7414</li> <li>- エクソン 5 = 8947-9084</li> <li>- エクソン 6v2 = 12548-12665 (3'末端に追加的な残基 12665 を含む)</li> <li>- エクソン 7 = 17600-19119</li> </ul> <p><b>転写産物 F</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- エクソン 1 = 1-275</li> <li>- エクソン 2 = 4471-4578</li> <li>- エクソン 3 = 5684-5815</li> <li>- エクソン 4 = 7308-7414</li> <li>- エクソン 5 = 8947-9084</li> <li>- エクソン 6v3 = 12548-13502 (エクソン 6 からイントロン 6 へのリードスルーアンス 12665~13502)</li> <li>- エクソン 7 = スキップ</li> </ul> <p><b>転写産物 G</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- エクソン 1 = 1-275</li> <li>- エクソン 2 = スキップ</li> <li>- エクソン 3 = 5684-5815</li> <li>- エクソン 4 = 7308-7414</li> <li>- エクソン 5 = 8947-9084</li> <li>- エクソン 6v2 = 12548-12665 (3'末端に追加的な残基 12665 を含む)</li> <li>- エクソン 7 = 17600-19119</li> </ul> <p><b>転写産物 H</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- エクソン 1 = 1-275</li> <li>- エクソン 2 = 4471-4578</li> <li>- エクソン 3 = 5684-5815</li> <li>- エクソン 3' = 6210-6281</li> <li>- エクソン 4 = 7308-7414</li> <li>- エクソン 5 = 8947-9084</li> <li>- エクソン 6v2 = 12548-12665 (3'末端に追加的な残基 12665 を含む)</li> <li>- エクソン 7 = 17600-19119</li> </ul>	10
3	DNA	内因性 HSD17B13 プロモーター(転写開始部位(TSS)に対して-499~100)	
4	DNA	HSD17B13 転写産物 A cDNA	
5	DNA	HSD17B13 転写産物 B cDNA	
6	DNA	HSD17B13 転写産物 C cDNA	
7	DNA	HSD17B13 転写産物 D cDNA	
8	DNA	HSD17B13 転写産物 E cDNA	
9	DNA	HSD17B13 転写産物 F cDNA	
10	DNA	HSD17B13 転写産物 G cDNA	
11	DNA	HSD17B13 転写産物 H cDNA	40

【表 H - 3】

配列番号	型	説明	
12	タンパク質	HSD17B13 タンパク質アイソフォーム A	
13	タンパク質	HSD17B13 タンパク質アイソフォーム B	
14	タンパク質	HSD17B13 タンパク質アイソフォーム C	
15	タンパク質	HSD17B13 タンパク質アイソフォーム D	
16	タンパク質	HSD17B13 タンパク質アイソフォーム E	
17	タンパク質	HSD17B13 タンパク質アイソフォーム F	
18	タンパク質	HSD17B13 タンパク質アイソフォーム G	
19	タンパク質	HSD17B13 タンパク質アイソフォーム H	
20-41	DNA	ヒト <i>HSD17B13</i> TSS ガイド RNA 標的配列	10
42-81	DNA	他のヒト <i>HSD17B13</i> 5'ガイド RNA 標的配列	
82-225	DNA	ヒト <i>HSD17B13</i> 3'ガイド RNA 標的配列	
226-239	DNA	rs72613567 変形形態付近のヒト <i>HSD17B13</i> ガイド RNA 標的配列	
240	タンパク質	ヒト HSD17B13 タンパク質 Q7Z5P4-1	
241	タンパク質	ヒト HSD17B13 タンパク質 Q7Z5P4-2	
242	タンパク質	ヒト HSD17B13 タンパク質 NP_835236.2	
243	タンパク質	ヒト HSD17B13 タンパク質 NP_001129702.1	
244	DNA	ヒト HSD17B13 cDNA NM_178135.4	
245	DNA	ヒト HSD17B13 cDNA NM_001136230.2	
246	DNA	HSD17B13 転写産物 F'	
247	タンパク質	HSD17B13 タンパク質アイソフォーム F'	
248-250	DNA	ガイド RNA 標的配列+PAM	20
251	DNA	PST516 プライマー	
252	DNA	PST517 プライマー	
253	DNA	DE002 プライマー	
254	DNA	HSD17B13 プライマー1	
255	DNA	HSD17B13 プライマー2	
256-258	RNA	ガイド RNA 足場 v2-v4	
259-263	DNA	マウス 5'ガイド RNA 標的配列	
264-268	DNA	マウスエクソン 6/7 ガイド RNA 標的配列	
269	DNA	マウス <i>Hsd17b13</i> 遺伝子座	
270-489	RNA	ヒト <i>HSD17B13</i> crRNAs	
490-499	RNA	マウス <i>Hsd17b13</i> crRNAs	
500-719	RNA	ヒト <i>HSD17B13</i> sgRNAs v1	30
720-729	RNA	マウス <i>Hsd17b13</i> sgRNAs v1	
730-949	RNA	ヒト <i>HSD17B13</i> sgRNAs v2	
950-959	RNA	マウス <i>Hsd17b13</i> sgRNAs v2	
960-1179	RNA	ヒト <i>HSD17B13</i> sgRNAs v3	
1180-1189	RNA	マウス <i>Hsd17b13</i> sgRNAs v3	
1190-1409	RNA	ヒト <i>HSD17B13</i> sgRNAs v4	
1410-1419	RNA	マウス <i>Hsd17b13</i> sgRNAs v4	
1420	RNA	ガイド RNA 足場 v1	
1421	RNA	crRNA 尾部	
1422	RNA	tracrRNA	
1423-1642	RNA	ヒト <i>HSD17B13</i> ガイド RNA DNA 標的化セグメント	
1643-1652	RNA	マウス <i>Hsd17b13</i> ガイド RNA DNA 標的化セグメント	40

## 【実施例】

## 【0 3 9 9】

## (実施例 1)

17ベータ-ヒドロキシステロイドヒドロゲナーゼ13バリアントは慢性肝疾患に対して保護する

慢性肝疾患および肝硬変は、米国における疾病率死亡率の主因である（あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kochanekら（2016年）Natl Vital Stat Rep 65巻：1～122頁）。肝硬変の最も一般的な病因は、アルコール性肝疾患、慢性C型肝炎、および非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）であると共に

、肝移植を待っている患者の約80%を占める（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Wongら（2015年）*Gastroenterology* 148巻：547～555頁）。注目すべきことに、米国におけるNAFLDの推定有病率は、19～46パーセントであり（それぞれ、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Browningら（2004年）*Hepatology* 40巻：1387～1395頁；Lazoら（2013年）*Am J Epidemiol* 178巻：38～45頁；およびWilliamsら（2011年）*Gastroenterology* 140巻：124～131頁）、おそらく肥満症の率の増大と関連して、時間と共に上昇している（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Younossiら（2011年）*Clin Gastroenterol Hepatol* 9巻：524～530e1頁；quiz e60（2011年））。今まで、NAFLDの進行および転帰における個体間変動に関しては依然として非常に不安定である；基礎となる遺伝的因子の知識は、リスク階層化を改善し、新規治療戦略のための基礎を提供することができる。ここで、本発明者らは、HSD17B13（ヒドロキシステロイド-17-ベータデヒドロゲナーゼ13をコードする）におけるスプライスバリエントの保因者は、アルコール性および非アルコール性肝疾患のリスクが低く、NAFLD進行のリスクが低いことを示す。DiscovEHR研究における46,544人の歐州祖先参加者に由来する電子カルテにリンクされた全エクソーム配列データの関連研究は、アラニントランスアミナーゼおよびアスパラギン酸トランスアミナーゼレベルの低下と関連するHSD17B13(rs72613567)中のスプライスバリエントの同定をもたらした；これらの知見を、12,528人の個体を含む3つの別々のコホートにおいて再現した。ディスカバリークホートにおいて、HSD17B13バリエントは、アルコール性および非アルコール性肝疾患、肝硬変、および肝細胞癌のリスクの低下と関連していた。肥満外科手術コホートにおいては、バリエントは、脂肪症を有する個体における組織病理学的脂肪性肝炎のリスクの低下と関連していた。肥満外科手術コホートに由来するヒト肝臓試料のRNA配列決定により、スプライスバリエントのホモ接合体保因者が、トランケートされたHSD17B13アイソフォームをコードする新規転写産物を主に発現することが示された。これらの知見は、肝疾患進行の促進におけるHSD17B13の役割、ならびに脂肪性肝炎および肝硬変のための治療標的としてのその可能性に新しい光明を投じるものである。

#### 【0400】

以前のゲノムワイド関連解析（GWA S）により、限られた数の、慢性肝疾患に関連する遺伝子およびバリエントが同定されている。現在までに最もしっかりと検証された遺伝的関連は、パタチン様ホスホリパーゼDメイン含有3遺伝子（PNPLA3 p. Ile148Met、rs738409）における共通のミスセンスバリエントに関するものであり、これは、最初に非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）のリスクの上昇に関連することが見出され（Romeoら（2008年）*Nat Genet*、40巻：1461～1465頁およびSpeliotisら（2011年）*PLoS Genet*、7巻：e1001324頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、続いて、疾患の重症度（Rotmanら（2010年）*Hepatology*、52巻：894～903頁およびSookoianら（2009年）*J Lipid Res*、50巻：2111～2116頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）および進行（Trepoら（2016年）*J Hepatol* doi:10.1016/j.jhep.2016.03.011、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に関連することが見出された。膜貫通6スーパーファミリーメンバー2（TM6SF2）遺伝子の変化によりNAFLDのリスクの上昇が付与されることも示されている（Kozlitinaら（2014年）*Nat Genet*、46巻：352～356頁、Liuら（2014年）*Nat Commun* 5巻：4309頁；およびSookoianら（2015年）*Hepatology*、61巻：515～525頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。これらの2種のタンパク質の正常な機能は十分には理解されていないにもかかわらず、どちらも、肝細胞の脂質代謝に関与することが提唱されてきた。PNPLA3およびTM6SF2の

10

20

30

40

50

バリアントが肝疾患のリスクの上昇にどのように寄与するかはまだ解明されていない。G W A S により、臨床的に頻繁に測定される肝細胞傷害および肝臓脂肪蓄積の定量的マークターである血清アラニンアミノトランスフェラーゼ ( A L T ) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ ( A S T ) に関する遺伝因子もいくつか同定された ( Chambers ら ( 2 0 1 1 年 ) *Nat Genet*、4 3 卷 : 1 1 3 1 ~ 1 1 3 8 頁および Yuan ら ( 2 0 0 8 年 ) *Am J Hum Genet*、8 3 卷 : 5 2 0 ~ 5 2 8 頁、それぞれが、あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる )。現在まで、慢性肝疾患に対する保護的遺伝子バリアントは記載されていない。心血管疾患のリスクを低下させる P C S K 9 の機能喪失型バリアントなどの他の状況での保護的遺伝子バリアントの発見が、新しいクラスの治療薬を開発するための促進要因になっている。

10

#### 【 0 4 0 1 】

Regeneron Genetics Center と Geisinger Health System ( G H S ) との DiscovEHR 共同研究は、エクソーム配列決定を、非特定化された電子カルテ ( E H R ) データに繋いで、遺伝子発見および精密医療を可能にする ( あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる、Dewey ら ( 2 0 1 6 年 ) *Science* 3 5 4 卷 ( 6 3 1 9 頁 ) doi:10.1126/science.aaf6814 )。DiscovEHR コホートは、肝臓生検標本を有する肥満外科手術患者を含む、G H S 統合医療システムにわたる一次および特殊医療コホートから募集した患者を含む ( あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる、Gorden ら ( 2 0 1 3 年 ) *Hum Hered* 7 5 卷 : 3 4 ~ 4 3 頁 )。この研究では、本発明者らは、包括的機能ゲノミクス手法に着手して、DiscovEHR コホートに由来する欧州子孫の 4 9 , 1 8 8 人の個体における慢性肝疾患および肝硬変と関連する量的形質、疾患診断、および組織病理学的表現型への、エクソーム配列変化の寄与を評価すると共に、欧州祖先の 9 , 8 8 3 人の個体の全エクソーム配列決定を使用するフォローアップ研究を行った。

20

#### 【 0 4 0 2 】

E H R 由来表現型に関連付けられた全エクソーム配列データを使用して、本発明者らは、DiscovEHR コホートに由来する欧州子孫の 4 6 , 5 4 4 人の個体 ( 「 G H S ディスカバリーコホート」 ) における血清 A L T および A S T 測定値の関連研究を最初に実行した。このコホートの臨床的特徴は、表 1 A に記載される。E H R に文書化されたトランスアミナーゼ測定値を有する個体は 4 1 , 9 0 8 人であった ( A L T と A S T 測定値の両方を有する 4 0 , 5 6 1 人の個体を含む )。本発明者らは、線形混合モデル ( あらゆる目的に関してその全体が参考により本明細書に組み込まれる、Yang ら ( 2 0 1 1 年 ) *Am J Hum Genet* 8 8 卷 : 7 6 ~ 8 2 頁 ) を使用して、log 1 0 変換された A L T および A S T レベル中央値 ( 性別、年齢、年齢 2 、体格指数 ( B M I ) および祖先の最初の 4 つの主成分について調整されたもの ) と、0 . 1 % より高いマイナー対立遺伝子頻度を有する 5 0 2 , 2 1 9 個の二対立遺伝子単一バリアントとの関連を検出した。P < 1 . 0 × 1 0 - 7 のエクソームワイド有意性閾値を使用して、本発明者らは、A L T と A S T の両方と関連する 7 個の遺伝子中の 8 個のバリアントを含む、A L T または A S T と有意に関連する 1 9 個の遺伝子中の 3 5 個のバリアントを同定した ( 図 1 および表 2 )。

30

#### 【 0 4 0 3 】

40

50

## 【表 1 A】

表 1A. ディスカバリーコホートおよび再現コホートに由来する配列決定された欧州祖先の個体の  
人口および臨床特徴

特徴	ディスカバリーコホート (N = 46,544)	肥満外科手術 コホート (N = 2,644)	Dallas Heart Study (N = 1,357)	Penn Medicine Biobank (N = 8,526)
年齢(歳)-中央値(IQR)	62.9 (49.6 - 73.8)	52.9 (44.1 - 61.2)	46.0 (38.0 - 54.0)	68.0 (60.0 - 76.0)
女性-数(%)	26,875 (57.7)	2,119 (80.1)	724 (53.4)	3,242 (38.0)
ボディマス指数-中央値(IQR)	29.9 (35.4 - 44.8)	47.4 (42.0 - 53.7)	28 (25-32)	30 (25-32)
トランスアミナーゼレベル(U/L)-中央値(IQR)				
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	22.0 (17.0 - 29.0)	23.0 (17.5 - 29.5)	20.0 (15.0 - 27.0)	22.0 (17.0 - 30.0)
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)	23.0 (20.0 - 27.5)	23.0 (20.0 - 27.0)	21.0 (18.0 - 25.0)	24.0 (20.0 - 30.5)
肝疾患の存在(ICD-9 コードによる)-N(%)				
アルコール性肝疾患	197 (0.4)	7 (0.3)	-	-
アルコール性肝硬変	130 (0.3)	3 (0.1)	-	-
非アルコール性、非ウイルス性肝疾患	1,938 (4.2)	1,543 (58.4)	-	-
非アルコール性肝硬変	382 (0.8)	24 (0.9)	-	-
肝細胞癌	76 (0.2)	1 (0.04)	-	-
肝疾患なし	30,628 (65.8)	1 (0.04)	-	-

## 【0404】

## 【表 1 B】

表 1B. Dallas Liver Study および Pediatric Liver Study に由来するジェノタイピングされた多民族症例および対照の人口および臨床特徴

特徴	Dallas Liver Study 症例 (N = 517)	Dallas Liver Study 対照 (N = 4,279)	Dallas Pediatric Liver Study 症 例 (N = 203)	Dallas Pediatric Liver Study 対 照 (N = 244)
年齢(歳)-中央値(IQR)	55 (48 - 60)	44 (36 - 53)	12 (10 - 15)	12 (11 - 14)
女性-数(%)	277 (54)	2,494 (58)	65 (32)	126 (52)
ボディマス指数-中央値(IQR)	30 (27 - 35)	30 (26 - 35)	30 (27 - 34)	31 (28 - 35)
自己報告された民族性				
アフリカ系米国人	33 (6)	2,291 (54)	-	-
欧州系米国人	158 (31)	1,266 (30)	-	-
ヒスパニック系米国人	326 (63)	722 (17)	203 (100)	244 (100)
肝疾患の存在(ICD-9 コードによる)-N(%)				
アルコール性肝疾患	223 (43)	-	-	-
アルコール性肝硬変	215 (42)	-	-	-
非アルコール性、非ウイルス性肝疾患	212 (20)	-	-	-
非アルコール性肝硬変	100 (19)	-	-	-
肝細胞癌	44 (9)	-	-	-
肝疾患なし	-	4,279 (100)	-	-244 (100)

## 【0405】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

平野 AST または ALT が 0 の場合																					
星		BP	RA	DEC	RAID	DECID	赤道子	注記	AA	AAF	N	REF	REF	REF	REF	ALT	ALT	REF	REF	ALT	ALT
1	2309/00028	A	T	G	r3642438	MARCI	ミセシソ	P Th165A8	0.068(0.001)	4.67E-08	0.7067	41,414	3,515	17,762	20,637	23,88	24,32	24,92	24,41		
4	8823,392	A	T	G	*73716357	HSD/BU1	ミセシソ	P Th165A8	-0.069(0.001)	4.16E-12	0.7654	41,414	22,441	16,130	2,843	25,02	24,26	24,41	24,32	24,92	
8	14497604	C	T	T	r37111903	PLEC	ミセシソ	P A26307Th	-0.160(0.026)	1.90E-09	0.0005	41,413	41,373	41,387	41,414	24,67	18,1	N/A	N/A		
8	1459802	G	A	A	r3596570	KFPC	ミセシソ	P Gai74Ly5	-0.033(0.005)	1.40E-11	0.0039	41,414	41,414	41,414	41,414	24,67	13,8	N/A	N/A		
8	145962918	G	A	A	r34140807	GPT	ミセシソ	P A68316	-0.314(0.026)	3.78E-18	0.0003	41,414	41,393	21	0	24,67	12,07	N/A	N/A		
8	145700672	G	A	A	r3415597	GPT	ミセシソ	P A68774d	-0.234(0.014)	6.78E-59	0.00018	41,414	41,414	41,414	41,414	24,67	12,07	N/A	N/A		
8	145730161	C	T	G	r31254931	GPT	ミセシソ	P A26217Ly5	-0.033(0.005)	1.75E-11	0.0136	41,414	40,293	11,111	10	24,71	3,09	18,35	18,35		
8	14571636	T	G	G	r3451576	GPT	ミセシソ	P Th263*	-0.234(0.031)	1.70E-14	0.0004	41,394	41,394	30	0	24,67	14,07	N/A	N/A		
8	145712114	G	G	G	r3415097	GPT	ミセシソ	P Gai30Cin	-0.234(0.013)	8.64E-14	0.0019	41,373	41,373	150	2	24,68	14,46	13,75	13,75		
8	145712151	G	G	G	r341462595	GPT	ミセシソ	P A68421d	-0.077(0.013)	1.18E-09	0.00021	41,406	41,232	174	0	24,71	20,87	N/A	N/A		
8	145721880	G	G	G	r341798239	GPT	ミセシソ	P Va65216	-0.225(0.013)	1.91E-65	0.00019	41,413	41,234	159	0	24,71	14,74	N/A	N/A		
8	145722005	G	G	G	r341798239	GPT	ミセシソ	P Gai74756	-0.271(0.013)	1.00E-11	0.00004	41,414	41,385	29	0	24,67	14,24	N/A	N/A		
8	145748532	A	G	G	r365140720	LRBC24	ミセシソ	P Lec790Se	-0.185(0.029)	3.42E-11	0.00004	41,393	41,358	35	0	24,67	17,71	N/A	N/A		
9	11122302	C	T	G	r3748176	ACX4	ミセシソ	P Gai55Cin	-0.007(0.001)	0.232	0.0232	41,414	9,414	11,355	23,12	24,72	24,18	24,72	24,18		
9	11124731	G	A	A	r3748176	ACX4	ミセシソ	P Th454Le	-0.007(0.001)	4.31E-09	0.0230	41,412	9,427	20,634	11,351	25,12	24,73	24,73	24,18		
10	10159506	T	A	T	r31722373	ABCC2	ミセシソ	P Va1183Cin	-0.015(0.003)	2.97E-08	0.0068	41,414	36,543	41,394	41,414	24,77	23,97	23,97	22,03		
10	101600661	G	T	G	r3139683	ABCC2	ミセシソ	P Va1430Vai	-0.015(0.003)	2.71E-08	0.0068	41,414	36,543	41,394	41,414	24,77	23,97	23,97	22,03		
10	101610383	C	T	T	r38171707	ABCC2	ミセシソ	P Va1489HS	-0.015(0.003)	2.71E-08	0.0068	41,414	36,542	41,394	41,414	24,77	23,97	23,97	22,03		
10	101611294	G	A	A	r38171710	ABCC2	ミセシソ	P Cys151STY	-0.015(0.003)	2.15E-08	0.00611	41,414	36,519	41,726	169	24,77	23,97	23,97	21,99		
10	101912644	T	C	T	r32865954	ERLDH	ミセシソ	P Va1917d	-0.012(0.001)	2.45E-21	0.0755	41,414	11,319	26,919	9,1277	25,32	24,71	24,71	24,01		
10	101917883	T	T	T	r3236084	CPTX	ミセシソ	P Val6818	-0.009(0.001)	1.93E-13	0.5072	41,414	10,948	20,333	10,633	25,18	24,75	24,01	24,01		
10	11397085	T	A	A	r325537	GRAM	ミセシソ	P Pro681Pro	-0.008(0.001)	4.61E-10	0.7073	41,414	3,627	16,884	20,863	25	24,97	24,36	24,36		
10	113980329	T	C	C	r328137d	GRAM	ミセシソ	P Val6818	-0.008(0.001)	4.58E-10	0.7087	41,414	3,610	16,810	20,355	25	24,98	24,36	24,36		
14	94849497	C	T	T	r32899474	SERP24U	ミセシソ	P Gai661Ly5	0.042(0.005)	9.78E-21	0.0171	41,414	40,006	1,3399	9	24,58	26,91	43,89	26,91		
19	11395349	C	G	G	r38816759	TMSPF2	ミセシソ	P Gai671Ly5	0.014(0.002)	4.70E-09	0.0733	41,413	35,388	345	0	24,52	25,36	26,84	26,84		
22	44334727	C	G	G	r3728409	FPTP43	ミセシソ	P Th1483d	0.033(0.002)	1.34E-09	0.02351	41,414	24,527	14,337	2,320	24,06	24,99	26,91	26,91		
22	44334730	C	T	T	r3728409	FPTP43	ミセシソ	P Th1483d	0.033(0.002)	1.11E-10	0.02349	41,414	24,273	14,824	2,317	24,06	24,98	26,92	26,92		
22	44362116	A	G	G	r3294913	FPTP43	ミセシソ	P Lys34Cin	0.007(0.001)	5.56E-08	0.03986	41,412	6,691	19,833	14,888	24,15	24,47	24,47	24,45		
22	44368122	A	G	G	r32865672	SAP100	ミセシソ	P Asp100Cin	0.019(0.002)	8.63E-10	0.1682	41,413	24,626	1,1638	1,169	24,23	25,36	25,36	25,45		
22	44385451	T	C	C	r310077863	P4R2B	ミセシソ	P Th1747d	0.010(0.001)	7.68E-16	0.1963	41,414	15,036	18,920	6,458	24,15	24,6	24,6	26,69		
4	83231392	T	TA	TA	r32865672	ERLDH	ミセシソ	HSD/Th1313	0.006(0.001)	6.48E-10	0.03688	41,414	20,688	1,5870	2,315	24,47	24,1	24,1	23,95		
10	18242331	A	G	G	r31716176	SC3941d	ミセシソ	P Ser36dly	-0.006(0.001)	1.09E-10	0.02351	41,414	20,645	16,338	3,370	24,47	24,15	23,95	23,95		
10	101157378	C	G	G	r32310243	GOTT	ミセシソ	P Asp189dcl	-0.221(0.024)	1.06E-20	0.0002	41,412	40,733	20	0	24,29	14,7	N/A	N/A		
10	101156333	G	T	T	r32310243	GOTT	ミセシソ	P Gai189dcl	0.221(0.027)	2.43E-24	0.0002	40,753	40,736	17	0	24,28	44,5	N/A	N/A		
10	101192064	A	T	T	r32310243	GOTT	ミセシソ	P Val1917d	0.012(0.001)	4.82E-09	0.0754	40,753	7,113	24,866	9,129	24,43	24,26	24,26	24,53		
11	22271870	A	C	C	r3281551	AN05	ミセシソ	P Lys227Phc	0.004(0.001)	9.61E-08	0.1983	40,753	7,113	24,69	12,03	24,69	24,43	24,43	24,53		
14	96484947	C	T	T	r32899474	SERP24U	ミセシソ	P Gai661Ly5	0.007(0.003)	2.44E-20	0.01072	40,753	39,361	1,394	8	24,24	25,56	34,5	34,5		

【表 2 - 2】

品目	ID	遺伝子	注釈	A.A.頻度	P	P-値(SE)	N	平均AST値±SD(UL)		REF	REF	ALT	ALT
								REF	ALT				
22	4454727	C	Q	*Y535469 PNPPL3	P.H4884s P.NPPL3	0.01*(0.001)	8.31E-46	0.2343	40.753	23.889	14.622	2.242	24.48
22	4454730	C	T	*Y535468 PNPPL3	P.H4884s P.NPPL3	0.01*(0.001)	8.93E-46	0.2341	40.753	23.905	14.609	2.239	23.96
22	4458122	A	G	*Y536472 SAB0650	P.Asp100Hs P.Asp100Hs	0.01*(0.001)	1.23E-22	0.1680	40.752	38.170	11.450	1.132	24.47
22	4459561	T	C	*Y51007863 P.ARP3B	P.TP2/TAP P.TP2/TAP	0.008*(0.001)	1.31E-13	0.3961	40.753	14.761	6.314	24.07	24.64
													24.02
													24.23
													25.1

\*ALTとASTの両方とのエクソームワードは有意な関連を有するバリアントを示す。

省略形:AAF、代替対立遺伝子頻度:Alt、代替対立遺伝子:ALT、アスパラギン酸アミノトランスクエラーゼ:AST、アスパラギン酸アミノトランスクエラーゼ:Ref、参照対立遺伝子:SE、標準誤差。

【0406】

これらの関連を再現するために、本発明者らは、3つの別々の歐州祖先コホート: D i s c o v E H R に由来する 2,644 人の肥満外科手術患者（「G H S 肥満外科手術コホート」）、Dallas Heart Study に由来する 1,357 人の個体、およびPenn Medicine Biobank に由来する 8,526 人の個体における全エクソーム配列決定により確認された 35 個の AST または ALT 関連バリアントを分析した（表 1 A）。再現コホートのメタ分析において、9 個の遺伝子中の 13 個のバリアントが、ALT または AST と有意に関連していた（ $p < 1.43 \times 10^{-3}$  のボンフェローニ有意性閾値）（表 3）。これらのものは、P N P L A 3 p . I l e 1 4 8 M e t ( あら

ゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Romeoら(2008年)Nat Genet 40巻:1461~1465頁)、TM6SF2 p.Glu167Lys(あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kozlitinaら(2014年)Nat Genet 46巻:352~356頁)、およびSERPINA1 p.Glu366Lys(アルファ-1-抗トリプシン欠損と関連するZ対立遺伝子)(あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Brantlyら(1988年)Am J Med 84巻:13~31頁)、SAMM50、およびERLIN1などの、以前に報告された肝疾患関連遺伝子およびバリエントを含んでいた。SERPINA1は、アルファ-1-抗トリプシンをコードし、その機能的欠損は、遺伝性肝疾患を引き起こすことが公知である; SAMM50との関連は、PNPLA3における変化との連鎖不均衡により媒介される可能性があり、ERLIN1は肝臓脂肪沈着に関与していた。それぞれ、ALTおよびASTをコードする遺伝子であるGPTおよびGOT1におけるいくつかのバリエントは、ALTまたはASTレベルと有意に関連していたが、肝疾患と関連するとは以前に報告されていなかった。SLC39A12は、トランスアミナーゼまたは肝疾患と以前は関連付けられていなかった。メタ分析はまた、ALT(ベータ(SE))-0.009(0.001); P = 4.16 × 10 - 12)およびAST(ベータ(SE))-0.005(0.001); P = 6.24 × 10 - 10)レベルの低下と、17-ベータヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼファミリーの特徴付けられていないメンバーであるヒドロキシステロイド17-ベータデヒドロゲナーゼ13をコードする遺伝子であるHSD17B13におけるスプライスバリエントとの間の本発明者らのディスカバリーコホートにおける新しい関連を再現した。このバリエント、rs72613567は、ドナースプライス部位に隣接するAヌクレオチドの挿入に対応する(TA対立遺伝子)。これらの関連に関する再現メタ分析のP値は、それぞれ、ALTおよびASTについて、3.85 × 10 - 5および9.38 × 10 - 5であり、結合メタ分析のP値は、1.17 × 10 - 15および6.82 × 10 - 13であった(表3)。以前のGWA Sは、ALTレベルと関連するものとして4q22での近隣遺伝子座(rs6834314)を同定した(あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Chambersら(2011年)Nat Genet 43巻:1131~1138頁); 本発明者らの知る限り、rs72613567との関連を記載する以前の研究はない。

【0407】

10

20

30

40

50

【表3-1】  
**表3.3 つの別々の欧洲祖先コホート中のディスカバリーコホートに由来する35のエクソームワイドな有意な单一ヌクレオチドバリアントの再現および結合メタ分析**

SNP	BP	rsID	遺伝子	AA	AA 遷換	GHS ディスクバリーコホート						Dallas Heart Study						U. Penn						**再現&分析 ( $N=3$ )								
						GHS 肥満外科手術コホート			Dallas Heart Study			U. Penn			ベータ(SE)			P			ベータ(SE)			P			ベータ(SE)			P		
						$\beta$	SE	$\beta/\text{SE}$	$\beta$	SE	$\beta/\text{SE}$	$\beta$	SE	$\beta/\text{SE}$	$\beta$	SE	$\beta/\text{SE}$	$\beta$	SE	$\beta/\text{SE}$	$\beta$	SE	$\beta/\text{SE}$	$\beta$	SE	$\beta/\text{SE}$	$\beta$	SE	$\beta/\text{SE}$	$\beta$		
-	236970028	✓	rs2643438	MRC7	S	p.Thr165Ala	0.008	4.67E-08	7.7	0.005	3.10E-01	0.011	1.70E-01	0.007	1.02E-01	8519	0.007	0.007	1.35E-01	0.004	2.31E-02	0.008	(0.001)	3.38E-09								
+	88231392	✓	rs75613567	HSD17B13	S		0.009	4.16E-08	7.7	0.005	3.10E-01	0.011	1.70E-01	0.007	1.02E-01	8519	0.007	0.007	1.35E-01	0.004	2.31E-02	0.008	(0.001)	3.38E-09								
+	144997694	✓	rs371119003	PLC	S	p.Ala390Thr	-0.160	1.30E-07	7.7	-0.492	2.84E-03	0.051	2.47E-03	0.051	1.30E-02	8519	0.051	4.79E-01	8519	0.051	6.50E-02	0.155	(0.025)	2.68E-10								
+	145068502	✓		PLC	S	p.Arg522Cys	-0.268	3.26E-07	7.7	-0.161	3.29E-01	0.011	2.47E-01	0.011	1.30E-01	8519	0.011	0.011	1.35E-01	0.004	2.31E-02	0.010	(0.001)	1.17E-15								
+	145692918	✓	rs39663570	KIF2C	S	p.Glu174Lys	-0.033	1.40E-07	7.7	-0.009	6.48E-01	0.032	2.47E-01	0.032	1.30E-01	8519	0.032	0.032	1.35E-01	0.013	2.31E-02	0.024	(0.013)	5.54E-18								
+	145730072	✓	rs1434038057	GPT	S	p.Arg83His	-0.314	3.38E-07	7.7	-0.169	2.90E-01	0.011	2.47E-01	0.011	1.30E-01	8519	0.011	0.011	1.35E-01	0.004	2.31E-02	0.010	(0.001)	2.25E-12								
+	145730161	✓	rs201815297	GPT	S	p.Arg87Lys	-0.224	6.28E-07	7.7	-0.341	3.64E-01	0.028	2.47E-01	0.028	1.30E-01	8519	0.028	0.028	1.35E-01	0.013	2.31E-02	0.032	(0.013)	4.69E-02								
+	145730221	✓	rs112574791	GPT	S	p.Arg107Lys	-0.033	4.25E-07	7.7	-0.069	6.45E-01	0.028	2.47E-01	0.028	1.30E-01	8519	0.028	0.028	1.35E-01	0.013	2.31E-02	0.033	(0.005)	1.92E-12								
+	145731636	✓	rs145155876	GPT	S	p.Tyr326*	-0.235	1.70E-07	7.7	-0.14	5.11E-01	0.049	2.47E-01	0.049	1.30E-01	8519	0.049	0.049	1.35E-01	0.013	2.31E-02	0.023	(0.013)	4.49E-04								
+	145732114	✓	rs14505249	GPT	S	p.Glu430Gln	-0.224	8.94E-07	7.7	-0.273	9.93E-01	0.049	2.47E-01	0.049	1.30E-01	8519	0.049	0.049	1.35E-01	0.013	2.31E-02	0.023	(0.012)	6.06E-78								

【表 3 - 2】

ID	BP	RSID	位点	GRS 等位力 (y-GRS)				GRS 调整系数 (y-GRS)				Delta's Stein Study				U. Penn				**两两分析 (N=3)				***综合分析 (N=4)							
				AA 替换		AA 替换		AA 替换		AA 替换		AA 替换		AA 替换		AA 替换		AA 替换		AA 替换		AA 替换		AA 替换							
				位点	BP	位点	BP	位点	BP	位点	BP	位点	BP	位点	BP	位点	BP	位点	BP	位点	BP	位点	BP	位点							
8	145732154	0	r1446295	GPT	8.18E-09	-0.077	1.18E-09	-0.115	4.82E-02	-0.06	-0.106	2.47E-01	-0.099	-0.049	2.27E-01	-0.041	-0.049	2.27E-01	-0.041	-0.049	2.27E-01	-0.041	-0.049	2.27E-01	-0.041	-0.049	2.27E-01	-0.041			
8	145732180	0	r147998249	GPT	8.19E-65	-0.225	8.19E-65	-0.225	4.26E-08	-0.191	6.38E-03	-0.191	0.197	1.31E-06	0.041	0.221	1.31E-06	0.041	0.221	1.31E-06	0.041	0.221	1.31E-06	0.041	0.221	1.31E-06	0.041	0.221	1.31E-06	0.041	
8	145732305	0	r14732305	GPT	8.19E-48	-0.221	8.19E-48	-0.221	3.27E-01	-0.161	3.27E-01	-0.161	0.569	1.31E-02	0.035	0.229	1.31E-02	0.035	0.229	1.31E-02	0.035	0.229	1.31E-02	0.035	0.229	1.31E-02	0.035	0.229	1.31E-02	0.035	
8	145746532	0	r567462720	LRRK2	8.19E-11	-0.165	3.27E-39	-0.165	3.27E-01	-0.161	3.27E-01	-0.161	0.307	1.31E-02	0.013	0.244	1.31E-02	0.013	0.244	1.31E-02	0.013	0.244	1.31E-02	0.013	0.244	1.31E-02	0.013	0.244	1.31E-02	0.013	
6	117122202	0	r3748177	AKNA	8.19E-09	-0.007	9.31E-09	-0.004	4.09E-01	-0.004	6.18E-01	-0.004	0.004	1.35E-01	-0.004	0.007	5.39E-01	-0.004	0.005	8.47E-01	-0.003	0.005	8.47E-01	-0.003	0.005	8.47E-01	-0.003	0.005	8.47E-01	-0.003	
6	117124731	0	r3748176	AKNA	8.19E-09	-0.007	4.31E-09	-0.004	3.01E-01	-0.004	3.01E-01	-0.004	0.003	1.35E-01	-0.004	0.007	4.24E-01	-0.004	0.005	8.51E-01	-0.003	0.005	8.51E-01	-0.003	0.005	8.51E-01	-0.003	0.005	8.51E-01	-0.003	
01	101592996	0	r1722723	ABC2	8.19E-01	-0.007	8.19E-01	-0.007	2.47E-01	-0.002	8.01E-01	-0.002	0.007	1.35E-01	-0.002	0.017	1.55E-01	-0.002	0.012	8.51E-01	-0.001	0.012	8.51E-01	-0.001	0.012	8.51E-01	-0.001	0.012	8.51E-01	-0.001	
01	101606861	0	r137968	ABC2	8.19E-01	-0.005	2.71E-01	-0.003	2.71E-01	-0.003	0.003	1.35E-01	-0.003	0.008	6.38E-01	-0.003	0.017	1.70E-01	-0.003	0.012	8.51E-01	-0.002	0.012	8.51E-01	-0.002	0.012	8.51E-01	-0.002	0.012	8.51E-01	-0.002
10	101610533	0	r5187707	ABC2	8.19E-08	-0.015	2.71E-08	-0.003	7.93E-01	-0.01	6.28E-01	-0.01	0.008	1.35E-01	-0.01	0.017	1.70E-01	-0.01	0.012	8.51E-01	-0.005	0.012	8.51E-01	-0.005	0.012	8.51E-01	-0.005	0.012	8.51E-01	-0.005	
10	101611294	0	r5187710	ABC2	8.19E-08	-0.015	2.71E-08	-0.003	7.93E-01	-0.01	6.28E-01	-0.01	0.010	1.35E-01	-0.01	0.016	2.77E-01	-0.01	0.011	8.51E-01	-0.005	0.011	8.51E-01	-0.005	0.011	8.51E-01	-0.005	0.011	8.51E-01	-0.005	
01	101912064	0	r3862954	ERIN1	8.19E-01	-0.012	8.19E-01	-0.012	2.47E-01	-0.010	2.47E-01	-0.010	0.006	1.35E-01	-0.010	0.012	2.06E-01	-0.010	0.009	8.51E-01	-0.004	0.011	8.51E-01	-0.004	0.011	8.51E-01	-0.004	0.011	8.51E-01	-0.004	
01	101917783	0	r236894	CHIK	8.19E-13	-0.009	1.93E-13	-0.006	2.05E-01	-0.005	0.0001	9.94E-01	-0.005	0.011	3.91E-01	-0.004	0.008	8.51E-01	-0.003	0.009	8.51E-01	-0.003	0.009	8.51E-01	-0.003	0.009	8.51E-01	-0.003			
10	113917085	0	r2354537	GPM	8.19E-10	-0.008	4.61E-10	-0.003	5.80E-01	-0.003	1.15E-01	-0.003	0.008	1.35E-01	-0.003	0.013	5.12E-01	-0.003	0.007	8.51E-01	-0.003	0.007	8.51E-01	-0.003	0.007	8.51E-01	-0.003	0.007	8.51E-01	-0.003	

【表3-3】

座標	BP	rsID	遺伝子	GHS 脂漏外科手術手術												再発リスク											
				Dallas Heart Study				U. Penn				...再発リスク分析 (N=3)				...再発リスク分析 (N=4)											
SNP	rsID	AA置換	AA置換	$\beta$ -SE	P	$\beta$ -SE	P	$\beta$ -SE	P	$\beta$ -SE	P	$\beta$ -SE	P	$\beta$ -SE	P	$\beta$ -SE	P	$\beta$ -SE	P	$\beta$ -SE	P	$\beta$ -SE	P				
01	115940329	T	C	rs292751	GP2M	SNP	p.Ile43Val	-0.008 (0.001)	2.54E -10	-0.003 (0.005)	5.61E -01	-0.013 (0.008)	2.47E -01	-0.008 (0.004)	1.33E -01	-0.008 (0.004)	4.77E -02	8219	-0.007 (0.003)	2.90E-02 (0.008)	-0.008 (0.003)	1.17E-11 (0.001)					
01	94844947	T	C	rs2929474	SERPINA1	SNP	p.Glu162Lys	0.042 (0.005)	9.38E -21	0.035 (0.009)	7.97E -02	0.034 (0.012)	2.90E -01	0.054 (0.013)	1.63E -05	8519	0.047 (0.010)	7.41E-06 (0.004)	0.043 (0.004)	1.59E-25 (0.004)							
01	19179549	T	C	rs5542926	TM6SF2	SNP	p.Glu162Lys	0.014 (0.002)	4.70E -09	0.040 (0.014)	2.00E -05	0.023 (0.014)	9.30E -02	0.013 (0.008)	7.51E -02	8219	0.024 (0.006)	2.13E-05 (0.006)	0.016 (0.002)	1.15E-12 (0.002)							
01	44324727	C	G	rs738469	PNP2L43	SNP	p.Leu48Met	0.023 (0.002)	1.14E -50	0.019 (0.006)	5.54E -04	0.006 (0.009)	5.43E -01	0.016 (0.004)	2.05E -04	8219	0.016 (0.003)	7.45E-07 (0.003)	0.021 (0.003)	3.55E-55 (0.003)							
01	44324750	C	T	rs738408	PNP2L43	SNP	p.Pro149Pro	0.023 (0.002)	1.11E -50	0.019 (0.006)	5.10E -04	0.006 (0.009)	5.43E -01	0.016 (0.004)	2.14E -04	8219	0.016 (0.003)	7.73E-07 (0.003)	0.021 (0.001)	3.10E-55 (0.001)							
01	44342116	G	A	rs2294918	PNP2L43	SNP	p.Lys34Glu	0.007 (0.001)	8.20E -48	0.001 (0.005)	7.77E -01	0.005 (0.008)	5.10E -01	0.005 (0.004)	2.16E -01	8219	0.004 (0.003)	1.91E-01 (0.003)	0.006 (0.001)	6.34E-08 (0.001)							
01	44368122	G	A	rs1761472	SAM60	SNP	p.Asp110Gly	0.019 (0.002)	8.85E -40	0.009 (0.006)	8.66E -01	0.001 (0.011)	9.37E -01	0.018 (0.005)	4.62E -04	8219	0.012 (0.004)	7.69E-04 (0.004)	0.018 (0.002)	1.03E-11 (0.002)							
01	44395451	T	C	rs1607863	PARD2	SNP	p.Tp37Arg	0.011 (0.001)	7.98E -16	0.003 (0.005)	5.22E -01	0.008 (0.008)	3.13E -01	0.009 (0.004)	2.20E -01	8219	0.007 (0.003)	1.78E-02 (0.003)	0.010 (0.001)	1.16E-16 (0.001)							
01	88231192	T	A	rs72615567	HSD17B13	SNP		-0.005 (0.001)	6.24E -10	-0.010 (0.003)	3.12E -03	-0.012 (0.006)	5.32E -02	-0.012 (0.004)	5.50E -02	9219	-0.007 (0.002)	-0.009 (0.002)	-0.006 (0.001)	6.82E-13 (0.001)							
01	18242311	A	G	rs1664176	SLC39A2	SNP	p.Ser36Gly	-0.006 (0.001)	1.69E -10	-0.010 (0.003)	2.91E -03	-0.003 (0.006)	5.80E -01	-0.009 (0.004)	1.03E -01	9219	-0.009 (0.002)	-0.009 (0.002)	-0.006 (0.001)	1.10E-13 (0.001)							
01	101157378	C	C	CGTR	CGTR	SNP	p.Asn389Asp	-0.121 (0.014)	1.66E -20	-0.205 (0.002)	8.47E -44	NA (NA)	NA	NA	NA	2.24E -03	5.97E -03	9219	0.218 (-0.05)	1.66E-05 (-0.051)	0.230 (-0.052)	1.68E-24 (-0.052)					
01	101165533	C	G	rs374966349	GOT1	SNP	p.Glu106Glu	0.271 (0.027)	2.31E -24	NA (NA)	NA	NA	NA	NA	NA	0.319 (-0.059)	1.87E -05	9219	0.319 (-0.059)	1.88E-05 (-0.059)	0.238 (-0.055)	3.25E-28 (-0.055)					
01	101912064	T	C	rs2862934	ERJ/N7	SNP	p.Ile29Val	-0.005 (0.001)	4.82E -09	-0.004 (0.003)	1.54E -01	-0.007 (0.006)	2.21E -01	-0.004 (0.005)	1.94E -01	9219	-0.005 (0.002)	2.51E-02 (0.002)	-0.005 (0.001)	3.68E-10 (0.001)							

【表3-4】

SNP	BP	rsID	遺伝子	GHS ディスカバリー コホート				GHS 肥満外科手術コホート				Dallas Heart Study				再現コホート				**再現メタ分析 (N=3)		***結合メタ分析 (N=4)	
				AA	AA 頻度	ベータ(SE)	P	z	β-SE(SE)	P	z	β-SE(SE)	P	z	β-SE(SE)	P	z	β-SE(SE)	P	z	β-SE(SE)	P	
rs116170	11	rs48991	ANXA5	S	0.004	9.61E-08	2.73	-0.001	7.85E-01	9.99	0.006	2.85E-01	0.002	5.44E-01	0.000	8.45E-01	0.004	1.13E-06	(0.001)	1.13E-06			
rs2271670	1	rs48991	ANXA5	S	0.004	9.61E-08	2.73	-0.001	7.85E-01	9.99	0.006	2.85E-01	0.002	5.44E-01	0.000	8.45E-01	0.004	1.13E-06	(0.001)	1.13E-06			
rs23929474	1	rs48991	ANXA5	S	0.004	9.61E-08	2.73	-0.001	7.85E-01	9.99	0.006	2.85E-01	0.002	5.44E-01	0.000	8.45E-01	0.004	1.13E-06	(0.001)	1.13E-06			
rs1979549	61	rs542926	TM6SF2	S	0.008	6.54E-08	4.01	0.003	1.99E-04	2.46	0.010	1.42E-01	0.004	5.94E-01	0.014	9.91E-01	0.009	5.92E-10	(0.002)	5.92E-10			
rs738409	61	rs738409	PNPZ3	S	0.014	8.31E-06	4.6	0.014	1.27E-04	2.69	0.004	5.44E-01	0.015	4.83E-01	0.013	7.12E-03	0.009	3.14E-52	(0.001)	3.14E-52			
rs4434730	61	rs738409	PNPZ3	S	0.014	8.31E-06	4.6	0.014	1.27E-04	2.69	0.004	5.44E-01	0.015	4.83E-01	0.013	7.12E-03	0.009	3.14E-52	(0.001)	3.14E-52			
rs1761472	61	rs1761472	SAM650	S	0.011	1.22E-22	0.008	6.03E-02	2.46	0.001	9.35E-01	0.016	2.64E-01	0.010	3.40E-04	0.011	1.91E-25	(0.001)	1.91E-25				
rs44395451	61	rs44395451	PDRB2	S	0.006	1.31E-13	0.003	4.12E-01	2.69	0.006	2.95E-01	0.009	6.17E-01	0.008	7.34E-03	0.006	3.62E-15	(0.001)	3.62E-15				

\* P<1.43×10<sup>-3</sup>のボンフェロー二有意性閾値を満たすP値を示す。

\*\*再現メタ分析は3つの再現コホート:GHS 肥満外科手術コホート、Dallas Heart Study、および Penn Medicine Biobank を含む。

\*\*\*結合メタ分析はディスカバリー コホートと3つの再現コホート:GHS ディスカバリー コホート、GHS 肥満外科手術コホート、Dallas Heart Study、および Penn Medicine Biobank を含む。

省略形:AAF、代替対立遺伝子頻度:Alt、代替対立遺伝子:AST、アスパラギンアミノトランスフェラーゼ:AST、アスパラギンアミノトランスフェラーゼ:Ref、参照対立遺伝子:SE、標準誤差:ann、注釈:miss、ミセンス:syn、同義:spl、スライムシフト:inf、フレームシフト:fs、フレームシフト:stop、停止獲得:fs、フレームシフト:inf、インフレームインデル。

## 【0408】

HSD17B13は、同じ遺伝子ファミリーのメンバーであるHSD17B11の30k b上流にあり、両遺伝子は、欧州人では単一の大きいハプロタイプブロック内にある。本発明者らは、ディスカバリー コホート(図5Aおよび5B; 最も有意なディスカバリー P値は、ALTについて1.36×10<sup>-1</sup>であり、ASTについては4.32×10<sup>-2</sup>である)またはディスカバリー コホートおよび3つの再現コホートの結合メタ分析(最も有意なP値は、それぞれ、ALTおよびASTについて、6.25×10<sup>-3</sup>および1.17×10<sup>-5</sup>である)において、HSD17B11におけるコードまたはスプライスバリエントと、トランスアミナーゼレベルとのいかなる関連も観察しなかった。さらに、

rs72613567と、HSD17B11におけるバリアントとの連鎖不均衡は、本発明者らのディスカバリー群を大まかに含む欧州系米国人、およびまた、Dallas Heart Studyに提示されたヒスパニック系およびアフリカ系米国人を含む、全ての祖先群にわたって中程度であった（全ての祖先群におけるHSD17B11中の全ての確認されたバリアントに関して  $r^2 < 0.4$ ；データは示さない）。まとめると、これらの知見は、HSD17B13が、トランスアミナーゼレベルと十中八九、機能的に関連するゲノム領域中の遺伝子であることを示唆する。

#### 【0409】

次に、本発明者らは、ALTまたはASTレベルと関連するバリアントが慢性肝疾患とも関連するかどうかを確立しようとした。ディスカバリークホートにおいて、本発明者らは、EHR診断コードを使用して、アルコール性および非アルコール性（非ウイルス性）肝疾患、ならびに以下の疾患後遺症：アルコール性肝硬変、非アルコール性肝硬変、および肝細胞癌（HCC）の症例を広く定義した。一般対照群（「肝疾患なし」）を、いかなる型の肝疾患に関する診断コードも有しない個体と定義した（表1）。本発明者らは、試験した13のバリアントおよび2つの広い慢性肝疾患カテゴリー（アルコール性および非アルコール性）を占める  $P < 0.05 / 24$  ( $P < 2.08 \times 10^{-3}$ ) のポンフェローニ有意性閾値を使用して、慢性肝疾患との関連についてディスカバリーおよび再現クホートに由来する12個のトランスアミナーゼ関連バリアントを試験した（表4）。全体として、本発明者らは、5個の遺伝子（HSD17B13、SERPINA1、TM6SF2、PNPLA3、およびSAMM50）中の6個のバリアントと、慢性肝疾患表現型との有意な関連を見出した。SERPINA1、TM6SF2、PNPLA3、およびSAMM50の関連は、以前に報告された関連を確認する。GPT、GOT1、ERLIN1、およびSLC39A12におけるバリアントは、いかなる肝疾患表現型とも有意に関連しなかった。本明細書で報告される肝疾患とのHSD17B13の関連は新規であり、潜在的に保護的な遺伝子バリアントが初めて記載される。

#### 【0410】

#### 【表4】

表4.ディスカバリークホートにおける12のエクソームワイドな有意かつ再現性の単一ヌクレオチドバリアントと肝疾患表現型との関連

CHR:BP:Ref:Alt	遺伝子	rsID	アルコール性肝疾患		アルコール性肝硬変		非アルコール性肝疾患		非アルコール性肝硬変		肝細胞癌	
			OR (95% CI)	P値	OR (95% CI)	P値	OR (95% CI)	P値	OR (95% CI)	P値	OR (95% CI)	P値
4:88231392:T:TA	HSD17B13	rs72613567	0.62 (0.48-0.81)	*1.82E-04	0.56 (0.41-0.78)	*3.35E-04	0.84 (0.78-0.91)	*1.31E-05	0.74 (0.62-0.88)	*4.48E-04 (0.45-1.00)	0.67	4.66E-02
8:145730161:C:T	GPT	rs201815297	3.83 (1.05-13.94)	8.88E-02	6.33 (1.71-23.43)	2.88E-02	0.23 (0.04-1.14)	1.86E-02	1.25 (0.24-6.38)	7.98E-01	3.66 (0.70-19.01)	2.01E-01
8:145732114:G:C	GPT	rs141505249	0.77 (0.06-10.73)	8.43E-01	1.13 (0.08-15.39)	9.30E-01	1.02 (0.49-2.11)	9.70E-01	0.36 (0.02-5.37)	3.82E-01	1.84 (0.15-23.25)	6.88E-01
8:145732180:G:C	GPT	rs147998249	0.73 (0.05-11.76)	8.17E-01	1.07 (0.07-17.16)	9.60E-01	1.03 (0.49-2.17)	9.30E-01	0.34 (0.02-5.59)	3.67E-01	1.74 (0.11-27.05)	7.21E-01
10:18242311:A:G	SLC39A12	rs10764176	0.85 (0.68-1.07)	1.64E-01	0.92 (0.70-1.22)	5.80E-01	0.92 (0.86-0.99)	3.43E-02	1.03 (0.88-1.21)	7.15E-01	1.29 (0.93-1.79)	1.37E-01
10:101157378:CGTT:C	GOT1		4.60 (0.25-86.41)	3.93E-01	7.11 (0.38-133.19)	3.00E-01	2.37 (0.61-9.27)	2.50E-01	8.27 (1.44-47.49)	5.92E-02	9.81 (0.52-183.54)	2.43E-01
10:101165533:G:C	GOT1	rs374966349	2.20 (0.13-37.68)	6.24E-01	3.47 (0.20-59.04)	4.70E-01	1.63 (0.53-4.96)	4.20E-01	1.17 (0.07-20.09)	9.13E-01	5.37 (0.32-91.12)	3.55E-01
14:94844947:C:T	SERPINA1	rs28929474	2.49 (1.49-4.17)	2.30E-03	3.35 (1.93-5.83)	*3.01E-04	1.50 (1.21-1.87)	*5.29E-04 (2.11-4.24)	2.99 (0.74-4.67)	*9.08E-08	1.86	2.40E-01
19:19379549:C:T	TM6SF2	rs58542926	1.47 (1.06-2.04)	2.76E-02	1.35 (0.89-2.04)	1.80E-01	1.36 (1.21-1.52)	*2.42E-07 (1.31-2.05)	1.64 (1.44-7.49)	*6.04E-05	1.93 (1.22-3.04)	1.08E-02
22:44324727:C:G	PNPLA3	rs738409	1.76 (1.43-2.18)	*4.98E-07	2.07 (1.60-2.67)	*1.08E-07	1.65 (1.54-1.78)	*1.31E-41 (1.76-2.38)	2.05 (1.70E-19)	2.20 (1.60-3.02)	*5.59E-06	
22:44324730:C:T	PNPLA3	rs738408	1.77 (1.43-2.18)	*4.70E-07	2.07 (1.61-2.67)	*1.03E-07	1.65 (1.54-1.78)	*1.42E-41 (1.77-2.38)	2.05 (1.45E-19)	2.20 (1.60-3.03)	*5.41E-06	
22:44368122:A:G	SAMM50	rs3761472	1.90 (1.52-2.38)	*1.36E-07	2.28 (1.75-2.98)	*1.83E-08	1.52 (1.41-1.65)	*7.33E-24 (1.58-2.19)	1.86 (1.81E-12)	1.66 (1.16-2.39)	1.05E-02	

\* $P < 2.08 \times 10^{-3}$  のポンフェローニ有意性閾値を満たす P 値を示す。

#### 【0411】

HSD17B13 rs72613567の変異（TA）対立遺伝子は、評価された慢性肝疾患表現型のいずれかを有する参加者と比較して、対照においてより高頻度で観察された（図2Aおよび表5）。年齢、年齢<sup>2</sup>、性別、BMI、および祖先に関する調整の後、本発明者らは、TA対立遺伝子あたり、38%低いアルコール性肝疾患のオッズ（オッズ比 [OR] 0.62；95%信頼区間 [CI] 0.48 ~ 0.81、 $P = 1.8 \times 10^{-3}$ ）

10

20

30

40

50

4) および 16% 低い非アルコール性(非ウイルス性)肝疾患のオッズ(OR 0.84、95%CI 0.78~0.91、P = 1.3 × 10 - 5)を観察した。肝硬変を有する症例に限定した場合、TA対立遺伝子は、44% 低いアルコール性肝硬変のオッズ(OR 0.56、95%CI 0.41~0.78、P = 3.4 × 10 - 4)および 26% 低い非アルコール性肝硬変のオッズ(OR 0.74、95%CI 0.62~0.88、P = 4.5 × 10 - 4)と関連していた。TA対立遺伝子は、対立遺伝子あたり 33% 低いHCCのオッズ(OR 0.67、95%CI 0.45~1.00、P = 4.7 × 10 - 2)と名目上関連していた。非調整遺伝子型ORは、コドミナント効果を示唆した; 例えば、アルコール性肝硬変について、ORは、ヘテロ接合体T/TA保因者については 0.59 (95%CI 0.40~0.86) であり、ホモ接合体TA/TA保因者については 0.26 (95%CI 0.08~0.82) であり、非アルコール性肝硬変について、ORは、ヘテロ接合体保因者については 0.75 (95%CI 0.61~0.93) であり、ホモ接合体保因者については 0.55 (95%CI 0.34~0.91) であった。

#### 【0412】

かくして、ディスカバリーコホートにおいて、HSD17B13 rs72613567 の変異(TA)対立遺伝子は、一貫した対立遺伝子用量依存的様式で、評価された全てのEHR由来慢性肝疾患表現型のより低いオッズと関連していた(図2A): アルコール性肝疾患の全カテゴリー、ヘテロ接合体オッズ比(ORhet) [95%信頼区間] 0.58 [0.42~0.79]、ホモ接合体OR(ORhom) 0.46 [0.23~0.94]、対立遺伝子OR(ORallel1ic) 0.62 [0.48~0.81]、P = 1.82 × 10 - 4; 非アルコール性肝疾患の全カテゴリー、ORhet 0.84 [0.76~0.92]、ORhom 0.73 [0.59~0.89]、ORallel1ic 0.84 [0.78~0.91]、P = 1.31 × 10 - 5。TA対立遺伝子はまた、最も進行した形態のこれらの慢性肝疾患(EHR由来診断コードによって定義される)、すなわち、アルコール性および非アルコール性肝硬変ならびにHCCのより低いオッズとも関連していた。TA対立遺伝子は、それぞれ、ヘテロ接合体およびホモ接合体のアルコール性肝硬変の 42% および 73% 低いオッズ(ORhet 0.59 [0.40~0.86]、ORhom 0.26 [0.08~0.82]、ORallel1ic 0.56 [0.41~0.78]、P = 3.35 × 10 - 4)、それぞれ、ヘテロ接合体およびホモ接合体の非アルコール性肝硬変の 26% および 49% 低いオッズ(ORhet 0.75 [0.61~0.93]、ORhom 0.55 [0.34~0.91]、ORallel1ic 0.74 [0.62~0.88]、P = 4.48 × 10 - 4)と関連していた。TA対立遺伝子はまた、HCCのより低いオッズとも名目上関連していた。

#### 【0413】

次に、本発明者らは、アフリカ系米国人、欧州系米国人、ならびにヒスパニック系米国人の成人および小児を含む、多民族Dallas Liver Study(DLS)およびDallas Pediatric Liver Study(DPLS)において、これらの知見を確認し、拡張しようとした(表1B)。DLSでは、TA対立遺伝子は、対立遺伝子用量依存的様式で任意の肝疾患のより低いオッズと関連していた(ORhet 0.74 [0.57~0.97]、ORhom 0.41 [0.21~0.83]、ORallel1ic 0.70 [0.5~0.88]、P = 1.77 × 10 - 3、図8)。同様の対立遺伝子用量依存的効果は、進行した、肝硬変型のアルコール性(ORallel1ic 0.72 [0.53~0.99]、P = 4.37 × 10 - 2)および非アルコール性(ORallel1ic 0.65 [0.40~1.07]、P = 8.96 × 10 - 2)肝疾患との保護的関連を含む、EHR由来肝疾患サブタイプにわたって観察された。自己報告された民族性によってグループ分けされた個体のサブセット分析において、肝疾患との関連は、特に、このサブ集団における高率の肝疾患のため、ヒスパニック系米国人において依然として有意であった(n = 326 の症例および 722 の対照、ORallel1ic 0.51 [0.35~0.74]、P = 3.98 × 10 - 4); 統計的有意性を達成しな

10

20

30

40

50

かった、同様の数的傾向は、D L S のアフリカ系米国人 (n = 33 の症例および 2,291 の対照、OR 1.11 [0.74 [0.25 ~ 2.47]、P = 0.67] および欧州系米国人 (n = 158 の症例および 1,266 の対照、OR 1.11 [0.87 [0.65 ~ 1.15]、P = 0.32] サブセットにおいても指摘された。ヒスパニック系米国人の小児肝疾患患者および肥満対照の別々の研究である DPLS においては (表 1B)、TA 対立遺伝子は、肝疾患のより低いオッズとも関連していた (OR 1.11 [0.59 [0.36 ~ 0.97]、P = 3.6 × 10 - 2)。かくして、HSD17B13 rs72613567 : TA 対立遺伝子は、3 つの独立した集団における成人および小児における、肝硬変を含む複数の形態の慢性肝疾患のオッズの低下と関連していた。

10

#### 【0414】

N A F L D は、有意な炎症の証拠がない脂肪肝 (組織病理学検査では「単純脂肪肝」と指定される) から、より臨床的に影響のある徵候 (小葉炎症、肝細胞肥大化、および/または線維症の組織病理学的証拠がある、「非アルコール性脂肪性肝炎」(N A S H) と指定される) までの広範囲の疾患を記述するものである。HSD17B13 TA 対立遺伝子と、組織学的に定義された N A F L D および N A S H との関係を理解するために、本発明者らは、G H S 肥満外科手術コホートに由来する肝臓生検試料を有する 2,391 人の全エクソーム配列決定された個体において rs72613567 の関連の試験を実施した。これらの個体のうち、脂肪症、脂肪性肝炎、または線維症の証拠がない (「正常」) のは 555 人 (23%) であり、単純脂肪肝を有するのは 830 人 (35%) であり、N A S H (すなわち、小葉の炎症、肝細胞肥大化、または線維症の証拠) を有するのは 1006 人 (42%) であった。HSD17B13 TA 対立遺伝子は、正常な肝臓と比較して、単純脂肪肝 (OR 1.11、95% CI 0.94 ~ 1.32、P = 0.21) または N A S H (OR 0.86、95% CI 0.72 ~ 1.02、P = 0.09) と有意に関連しなかった (図 2B および表 5)。遺伝子型によって正常な肝臓、単純脂肪肝、および N A S H の有病率を比較した場合、それぞれの TA 対立遺伝子に関して、正常な肝臓の有病率は、遺伝子型では異なると考えられる (それぞれ、T / T、T / T A、および T A / T A 保因者について、23%、24%、および 23%、割合における傾向に関するカイ二乗検定による P = 0.5) が、N A S H の有病率は低下し (それぞれ、T / T、T / T A、および T A / T A 保因者について、45%、40%、および 31%、P = 1.6 × 10 - 4)、単純脂肪肝の有病率は増加する (それぞれ、T / T、T / T A、および T A / T A 保因者について、33%、35%、および 47%、P = 1.1 × 10 - 3) ことが観察された (図 9)。脂肪症を有する個体のうち、TA 対立遺伝子は、対立遺伝子用量依存的様式で、単純脂肪肝と比較して、統計的に有意に低い N A S H のオッズと関連していた (OR 0.77、95% CI 0.66 ~ 0.90、P = 6.5 × 10 - 4) が、N A F L D の、N A S H および線維症のより進行した段階への進行を媒介する際の HSD17B13 の役割を示唆している。遺伝子型関連の結果は、コドミナント効果と一致していた; N A S H 対単純脂肪肝の比較において、OR は、ヘテロ接合体 T / T A 保因者については 0.84 (95% CI 0.69 ~ 1.02) であり、ホモ接合体 T A / T A 保因者については 0.48 (95% CI 0.34 ~ 0.68) であった。

20

#### 【0415】

30

40

50

【表5】

表5. *HSD17B13 rs72613567* は、ディスカバリーコホートにおいてアルコール性および非アルコール性肝疾患の表現型のリスクの低下と関連し、肥満外科手術コホートにおいて非アルコール性脂肪性肝疾患から非アルコール性脂肪性肝炎および線維症への進行のリスクの低下と関連する

症例	対照						P値						
	定義	N	REF/REF	REF/ALT	ALT/ALT	N	REF/REF	REF/ALT	ALT/ALT	AAF	Hom OR (95% CI)	対立遺伝子あたり OR (95% CI)	
アルコール性肝疾患	197	133	56	8							0.58 (0.42-0.79)	0.46 (0.23-0.94)	0.62 (0.48-0.81) 1.82E-04
アルコール性肝硬変	130	89	38	3							0.59 (0.40-0.86)	0.26 (0.08-0.82)	0.56 (0.41-0.78) 3.35E-04
非アルコール性肝疾患	1930	1131	692	107	肝疾患なし	30,522	16413	11969	2140	0.64 (0.76-0.92)	0.73 (0.59-0.89)	0.84 (0.78-0.91)	1.31E-05
非アルコール性肝硬変	381	235	129	17							0.75 (0.61-0.93)	0.74 (0.34-0.91)	0.74 (0.62-0.88) 4.48E-04
肝細胞癌	76	49	24	3							0.67 (0.41-1.10)	0.47 (0.15-1.51)	0.67 (0.45-1.00) 4.66E-02
单纯脂肪肝	830	421	321	88	正常	555	288	224	43	0.98 (0.78-1.23)	1.39 (0.94-2.08)	1.11 (0.94-1.32)	2.11E-01
NASH	1006	578	370	58							0.52 (0.66-1.02)	0.57 (0.44-1.02)	0.86 (0.72-1.02) 8.53E-02
NASH	1006	578	370	58	单纯脂肪肝	830	421	321	88	0.64 (0.69-1.02)	0.48 (0.34-0.68)	0.77 (0.66-0.90)	6.47E-04

## 【0416】

本発明者らは次に、*HSD17B13 TA* 対立遺伝子が、この遺伝子の公知の転写産物および新規転写産物の発現にどのように影響するかを理解しようとした。本発明者らは、RNA配列決定を使用して、*HSD17B13 rs72613567* スプライスバリアンテの22のホモ接合体参照 (T / T)、30のヘテロ接合体 (T / TA)、および17のホモ接合体代替物 (TA / TA) 保因者に由来する組織学的に正常な肝臓試料中で*HSD17B13 mRNA* 発現を評価した (図3)。2つの公知の*HSD17B13* 転写産物 A および B に加えて、2つの新規転写産物が同定された：エクソン6を欠く転写産物 C、および早期タンパク質トランケーションをもたらす、エクソン6の3'末端でのGヌクレオ

チドの挿入を特徴とする転写産物D。新規転写産物を、RT-PCRによって検証し、D転写産物をロングリードcDNA配列決定によってさらに検証した。これらの転写産物の発現レベルは、HSD17B13 rs72613567遺伝子型によって変化した；転写産物AおよびBのレベルは低下したが、転写産物CおよびDのレベルは、T/T Aヘテロ接合体およびT A/T Aホモ接合体において対立遺伝子用量依存的様式で増加した（図3）。300アミノ酸のタンパク質をコードする転写産物Aは、T/T Aホモ接合体中のT/Tにおいて優勢な転写産物であった（図3A）が、早期にトランケートされるタンパク質をコードする転写産物Dは、T A/T Aホモ接合体において優勢な転写産物であった（図3D）。これらの発現パターンは、HSD17B13アイソフォームの発現を決定する際のHSD17B13 rs72613567の機能的役割を示唆する。非常に低い発現レベルを示す4つのさらなる転写産物（E～H）も同定された（図6A～6D）。全ての同定されたHSD17B13アイソフォームのタンパク質配列アラインメントを、図7A～7Bに示す。

#### 【0417】

HSD17B13は、ヒト肝細胞中の脂肪滴関連タンパク質として以前に記載された（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Suら（2014年）Proc Natl Acad Sci USA 111巻：11437～11442頁）。本発明者らは、HSD17B13の公知および新規のアイソフォームA～Dを発現するレンチウイルスを安定に形質導入された無期限ヒト肝臓細胞株（HePG2ヘパトーマ細胞）中でタンパク質アイソフォームの発現および局在化を評価した。HSD17B13アイソフォームAは、未処理の細胞およびオレイン酸で処理された細胞中の脂肪滴に局在化した。アイソフォームAは、BODIPY標識された脂肪滴を取り囲む膜上で主に検出され、脂肪滴コートタンパク質であるペリリピン（PLIN）と共に局在化した。同様の細胞内局在化は、脂肪滴表面でHSD17B13アイソフォームDについても観察された；しかしながら、脂肪滴はオレイン酸処理後により大きいように見えた。対照的に、アイソフォームBとCは、小胞体マーカーであるカルネキシンと共に局在化した。

#### 【0418】

まとめると、DiscovEHR研究集団に由来する49,188人の個体に由来するEHRおよび肝臓生検データと関連付けられたエクソーム配列データを使用して、ならびにALTおよびAST測定値を有する9,883人のさらなる個体に由来するエクソーム配列データのフォローアップ研究において、本発明者らは、HSD17B13におけるスプライスバリエント、トランスアミナーゼレベル、および慢性肝疾患表現型の間の新しい関連を発見した。本発明者らの研究では、HSD17B13バリエントは、非アルコール性およびアルコール性肝疾患、ならびに肝硬変のリスクを低下させた。これは、本発明者らの知る限り、慢性肝疾患表現型との保護的関連を示すエクソンバリエントの初めての報告である。HSD17B13TA対立遺伝子は、単純脂肪肝と関連していなかったが、脂肪症を有する個体における組織病理学的脂肪性肝炎のリスクを低下させ、これは、慢性肝疾患のより臨床的に進行した段階への進行におけるHSD17B13の役割を示唆している。EHR診断コードならびに肝疾患の組織病理学的定義を使用して特徴付けられた、いくつかの異なる肝疾患カテゴリーにわたる4つの独立コホート（GHSディスカバリー、GH S肥満外科手術、DLS、およびDPLS）における保護的関連の一貫性は、関連の驚くべき対立遺伝子用量依存性と一緒にになって、報告されたHSD17B13バリエントが、慢性肝疾患のより臨床的に進行した段階への進行から保護するという見解を支持する。観察された対立遺伝子用量依存性はまた、HSD17B13機能のより大規模な調節が、疾患のリスクおよび進行に対するより大規模な効果をもたらし得ることを示している。

#### 【0419】

他の17ベータヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼファミリーメンバーは、性ステロイドおよび脂肪酸代謝に関与することが公知である（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、MoellerおよびAdamski（2009年）Mol Cell Endocrinol 301巻：7～19頁）が、HSD17B13の機能に関して公知であるこ

10

20

30

40

50

とはわずかである。HSD17B13は、主に肝臓中で発現され（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Liuら（2007年）Acta Biochim Pol 54巻：213～218頁）、そこでそれは脂肪性肝疾患の発症におけるHSD17B13の役割と一致して、脂肪滴に局在化する（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Suら（2014年）Proc Natl Acad Sci USA 111巻：11437～11442頁）。本発明者らのデータは、HSD17B13の過剰発現が、マウス肝臓における脂質生成を増加させ、培養肝細胞中の脂肪滴の数およびサイズを増加させたという最近の知見（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Suら（2014年）Proc Natl Acad Sci USA 111巻：11437～11442頁）と一致している。2つの以前の研究もまた、HSD17B13タンパク質の肝臓発現が、脂肪肝を有する患者において増加していることを示した（それぞれ、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Suら（2014年）Proc Natl Acad Sci USA 111巻：11437～11442頁およびKampfら（2014年）FASEB J 28巻：2901～2914頁）。肝疾患の高いリスクと関連すると報告されているバリエントを含む2個の遺伝子 - PNPLA3およびTM6SF2もまた、肝細胞の脂質代謝における生理学的役割を有する。本発明者らが本明細書で記載するHSD17B13におけるバリエントは、肝疾患のための初めての保護的バリエントであり、他の領域における新しい治療薬への道を案内してきた遺伝子バリエントと同様、慢性肝疾患を標的とする新しい治療戦略への手段を提供することができる。

## 【0420】

全体として、本発明者らのデータは、新規治療薬としてのHSD17B13が、ヒトにおける慢性肝疾患のリスクを低減させることを標的とすることを支持する。重要なことに、本発明者らのデータは、HSD17B13の標的化が、NAFLDから、有意な疾病率および死亡率と関連し、現在は有効な処置がない、後期段階のNASH、線維症、および肝硬変への進行を低減させることができたことを示している。

## 【0421】

## 方法

研究の参加者。ヒト遺伝学研究を、Regeneron Genetics Centerと、Geisinger Health System (GHS)とのDiscovEHR共同研究の一部として行った。研究は、GHS Institutional Review Boardによって認可された。2つのDiscovEHR研究集団（ディスカバリーコホートおよび肥満外科手術コホート）は、MYCODE（登録商標）Community Health Initiative of GHSに由来する18歳以上の年齢の最初の50,726人の同意した参加者が起源であった（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Deweyら（2016年）Science 354巻（6319頁）doi:10.1126/science.aaf6814）。GHSディスカバリーコホートは、肥満外科手術コホートに募集された全ての人を除く、2007年～2016年に外来初期診療および専門クリニックから募集した46,544人の欧州系の個体からなっていた。GHS肥満外科手術コホートは、肥満外科手術を勧められた2,644人の欧州系の個体からなっていた。

## 【0422】

再現研究は、Dallas Heart Studyに由来する1,357人の欧州系の個体およびPenn Medicine Biobankに由来する8,527人の欧州系の個体を含んでいた。Dallas Heart Studyは、30～65歳のDallas Countyの居住者の確率ベース集団のコホート研究である（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Victorら（2004年）Am J Cardiol 93巻：1473～1480頁）。Penn Medicine Biobankは、University of Pennsylvania Health Systemから募集され、生体標本の保存、EHRデータへのアクセス、および再接触への承諾について同意した参加者を含む。

10

20

30

40

50

## 【0423】

慢性肝疾患との関連の再現研究は、Dallas Liver Study (DLS) に由来する 517 人の個体および Dallas Pediatric Liver Study (DPLS) に由来する 447 人の個体を含んでいた。DLS は、非ウイルス病因の肝疾患を有する患者の生体バンクである。募集は 2015 年 1 月に始まって、現在進行中である。参加者を、UT Southwestern and Parkland Health and Hospital System、Dallas の肝臓クリニックから募集した。生体バンクは、UT Southwestern Institutional Review Board によって認可された。参加者は、インフォームドコンセント文書を提供した。参加者は、民族 / 人種背景、病歴、ライフスタイル因子、ならびに肝疾患および他の疾患の家族歴に関する問診票を完了した。さらなる臨床情報を、訓練された技術者によってカルテから抽出した。本発明者らは、本研究の時点で利用可能な DNA を有する全てのアフリカ系米国人、欧州系米国人、およびヒスパニック系米国人の患者を含有させた (n = 517)。DPLS は、UT Southwestern and Parkland Health and Hospital System、Dallas の小児肝臓クリニックから、および Children's Medical Center、Dallas の肥満クリニックから募集した子供の生体バンクである。生体バンクは、UT Southwestern Institutional Review Board によって認可された。参加者の法的保護者は、インフォームドコンセント文書を提供した。臨床情報を、訓練された技術者によってカルテから抽出した。95 % を超える患者がヒスパニック系米国人であったため、本発明者らは、本研究においてヒスパニック系米国人の患者および対照のみを含有させた (n = 203 人の患者および 244 人の対照)。

10

20

30

40

## 【0424】

試料の調製および配列決定。試料の調製および全エクソーム配列決定を、以前に記載されたように (あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Dewey ら (2016 年) Science 354 卷 (6319 頁) doi:10.1126/science.aaf6814)、Regeneron Genetics Center で実施した。簡単に述べると、エクソームの捕捉を、製造業者の推奨プロトコール (Roche NimbleGen) に従って NimbleGen プローブを使用して実施した。捕捉された DNA を PCR 増幅し、qRT-PCR (Kapa Biosystems) によって定量した。多重化された試料を、Illumina v4 HiSeq 2500 上での 75 bp のペアエンド配列決定を使用して、試料の 96 % において 85 % を超える標的塩基の 20 倍を超えるハプロイドリード深さ (標的塩基の約 80 倍の平均ハプロイドリード深さ) を提供するのに十分なカバレッジ深さまで配列決定した。それぞれの Illumina HiSeq 2500 実行に由来する生の配列データを、配列リードアラインメントおよびバリエントの同定のために、DNAexus プラットフォーム (Reid ら (2014 年) BMC Bioinformatics 15 卷、30 頁 doi:10.1186/1471-2105-15-30) にアップロードした。簡単に述べると、生の配列データを、BCF ファイルから、試料特異的 FASTQ ファイルに変換し、BWA-mem を含むヒト参照ビルト GRCh37.p13 とアラインメントした (あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Li および Durbin (2009 年) Bioinformatics 25 卷: 1754 ~ 1760 頁)。単一ヌクレオチドバリエント (SNV) および挿入 / 欠失 (インデル) 配列バリエントを、Genome Analysis Toolkit (あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、McKenna ら (2010 年) Genome Res 20 卷: 1297 ~ 1303 頁) を使用して同定した。

## 【0425】

Dallas Liver Study および Pediatric Liver Study における rs72613567 の標的ジェノタイピング。HSD17B13 rs72613567 を、Dallas Liver Study および Dallas Pediatric Liver Study において T A Q M A N (登録商標) アッセイによって、

50

ならびにDallas Heart Studyにおいてエクソーム配列決定によってジェノタイピングした。TAQMAN（登録商標）コールを、各遺伝子型を有する5人の個体のSanger配列決定によって検証した。

【0426】

ディスカバリーコホートにおける臨床測定値および慢性肝疾患の定義。ALTおよびASTに関する臨床検査値を、GHSディスカバリーコホートおよび肥満外科手術コホートに由来する参加者のEHRから抽出した。ALTおよびASTの中央値を、2つまたはそれよりも多い測定値を有する全ての参加者について算出し、10g10変換して、関連分析の前に分布を正規化した。

【0427】

国際疾病分類、第9版（ICD-9）の疾患コードを、EHRから抽出し、非ウイルス性、非アルコール性（ICD-9 571.40、571.41、571.49、571.5、571.8、571.9）またはアルコール性（ICD-9 571.0、571.1、571.2、571.3）肝疾患症例定義のための臨床疾患カテゴリーに折り置んだ。単一の診断コードに基づくさらなる症例定義は、アルコール性肝硬変（ICD-9 571.2）、非アルコール性肝硬変（ICD-9 571.5）、およびHCC（ICD-9 155.0）を含んでいた。これらの症例定義のために、肝疾患を含まない共通対照群を、症例基準がないか、または任意の型の肝疾患を示す単一エンカウンターもしくは問題一覧診断コードがない参加者と定義した。

【0428】

肥満外科手術コホートにおける肝臓組織病理学的表現型の定義。GHS肥満外科手術コホートは、欧州子孫の2,644人の個体と共に、これらの個体の2,391人から入手可能な術中肝臓生検標本からなっていた。肝臓生検標本を、日常的な組織学的分析のためにホルマリン固定し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、以前に記載のように、線維症の評価のためにマッソンのトリクロム染色を行った（あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Gerhardら（2011年）Patient Saf Surg 5巻、1頁、doi:10.1186/1754-9493-5-1）。以前に確立された基準を使用する肝臓病理学者によって、組織学的診断を決定した（あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Bruntら（1999年）Am J Gastroenterol 94巻：2467～2474頁）。組織学的診断を使用して、以下の表現型：1）正常：脂肪症、NASHまたは線維症の証拠なし；2）単純脂肪症：NASHまたは線維症の証拠がない脂肪症（等級に關係なく）；3）NASH／線維症：小葉炎症もしくは肝細胞肥大の任意の存在（等級に關係なく）、または線維症の任意の存在（ステージに關係なく）；4）線維症：線維症の任意の存在（ステージに關係なく）を定義した。

【0429】

肝臓酵素のエクソームワイド関連分析。GHSディスカバリーコホートにおいて、本発明者らは、トランスアミナーゼレベルとの関連について、1%未満の欠測データ率、1.0 × 10 - 6 より大きいハーディー - ワインベルク平衡 p 値、および 0.1 % を超えるマイナー対立遺伝子頻度を示す 502, 219 の二対立遺伝子バリアントを試験した。10g10変換されたALTおよびAST中央値を、年齢、年齢<sup>2</sup>、性別、BMI、および祖先の最初の4つの主成分について調整した。研究参加者間の関連性を説明するために、本発明者らはまた、無作為効果共変量として遺伝的関連性マトリックスを適合させる。主成分と遺伝的関連性マトリックスとの両方を、近似連鎖平衡中の、0.1 % を超えるマイナー対立遺伝子頻度を有する 39, 858 の非MHCマーカーから構築した。本発明者らは、GCTAパッケージに実装された線形混合モデル（あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Yangら（2011年）Am J Hum Genet 88巻：76～82頁）を使用して、残存形質と単一ヌクレオチドバリアントとの関連について試験した。試験は、エクソームワイド分位点 - 分位点プロットおよびゲノム対照ラムダ値によって示されたように、良好に較正された（図1）。

【0430】

10

20

30

40

50

肝臓酵素関連の再現メタ分析。本発明者らは、3つの別々の欧州祖先コホート：G H S 肥満外科手術コホート、Dallas Heart Study、およびPenn Medicine Biobank（上記）におけるG H S ディスカバリーコホートにおいて関連を再現しようと試みた。G H S 肥満外科手術コホートにおける、およびPenn Medicine Biobankに由来するA L T およびA S T 測定値を、 $\log_{10}$  変換し、年齢、年齢<sup>2</sup>、性別、B M I、および祖先の最初に4つの主成分について調整した。Penn Medicine Biobankに由来するA L T およびA S T 測定値を、 $\log_{10}$  変換し、年齢、年齢<sup>2</sup>、性別、B M I、および祖先の最初に4つの主成分について調整した。遺伝的関連性マトリックスを、無作為効果共変量として含有させ、分析を、G C T A における線形混合モデルを使用して実施した。Dallas Heart studyにおいて、 $\log_{10}$  変換されたA L T およびA S T 測定値を、年齢、年齢<sup>2</sup>、性別、および祖先の最初の10の主成分について調整し、分析を、P L I N K に実装された線形回帰を使用して実施した。3つの再現コホートに関する要約統計量を、M E T A L（再現メタ分析）（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、W illerら（2010年）Bioinformatics 26巻：2190～2191頁）を使用してメタ分析した。ディスカバリーコホートおよび3つの再現コホートに関する要約統計量を、同様にメタ分析した（結合メタ分析）。

#### 【0431】

慢性肝疾患表現型に関する関連分析。本発明者らは、上記のように、G H S ディスカバリーコホートから定義されたバイナリー肝疾患表現型との関連について、肝臓酵素E x W A S に由来する9つの有意かつ再現された单一ヌクレオチドバリアントを分析した。本発明者らは、試験した13個のバリアントおよび2つの広い慢性肝疾患カテゴリー（アルコール性および非アルコール性）を説明するために、 $P < 0.05 / 26$  ( $P < 1.92 \times 10^{-3}$ ) のボンフェローニの有意性閾値を使用した。H S D 1 7 B 1 3 バリアントを、上記のように、G H S 肥満外科手術コホートに由来する組織病理学的に定義された肝臓表現型との関連についてさらに試験した。オッズ比を、年齢、年齢<sup>2</sup>、性別、B M I、および祖先の最初の4つの主成分について調整した後、ロジスティック回帰のF i r t hの罰則付き尤度法を使用して見積もった。調整されていない遺伝子型オッズ比も、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 について見積もった。

#### 【0432】

D L S における肝疾患のオッズ比を、年齢、年齢<sup>2</sup>、性別、B M I、および自己報告された民族性について調整された、ロジスティック回帰によって見積もった。利用可能なr s 7 2 6 1 3 5 6 7 遺伝子型を有するDallas Heart Studyに由来する参加者を、正常対照（n = 4, 279）として使用した。D P L S におけるオッズ比を、ロジスティック回帰によって見積もった。

#### 【0433】

ソフトウェア。遺伝子関連分析を、G C T A ソフトウェア、バージョン1.25.0（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Yangら（2011年）Am J Hum Genet 88巻：76～82頁）、およびP L I N K、バージョン1.9.0を使用して実施した。分位点-分位点およびマンハッタンプロットを、Rソフトウェア、バージョン3.2.1（R Project for Statistical Computing）を使用して実施した。領域関連プロットを、L o c u s Z o o m を使用して生成した（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Pr uimら（2010年）Bioinformatics 26巻：2336～2337頁）。

#### 【0434】

R N A 配列決定研究。A g i l e n t R N A N a n o B i o a n a l y z e r チップ上で総R N A を泳動することによって、R N A の品質および濃度を評価した；全試料は、8より大きいR N A インテグリティーナンバー（R I N ）を有していた。ポリアデニル化されたR N A 転写産物を、オリゴ（d T ）25ビーズ（Thermo Fisher Scientific）を用いる2ラウンドの富化を使用して単離した。R N A c l e a n X

10

20

30

40

50

Pビーズ (Beckman Coulter) を用いて試料を精製および濃縮し、約140塩基対まで熱断片化した。ランダムヘキサマーを使用する SuperScript II 1 逆転写酵素 (Thermo Fisher Scientific) を用いて第1鎖合成を完了した；第2鎖合成中にdTTPをdUTPと置き換えた。ウラシルDNA-グリコシラーゼステップを追加したエクソームに関して上記された本発明者らの標準的なDNAライブラリー調製法に従って、試料をプロセッシングして、鎖特異的配列決定ライブラリーを生成した。試料をプールし、 Illumina v4 HiSeq 2500 上での75 bp のペアエンド配列決定を使用して配列決定した。

#### 【0435】

新規HSD17B13転写産物の同定。2つのミスマッチを許容する ARRAYSTUDIO (登録商標) ソフトウェア (OMICSOFT (登録商標)、Cary、NC) を使用して、リードを Human . B38 にマッピングした。2つの手法を使用して、新規HSD17B13転写産物を同定した。新規エクソン結合部を、GenCode v24に基づいて発見した。De novo 転写産物アセンブリを、デフォルト設定で Trinity (v2.2.0) を使用して実行した。カスタム遺伝子モデルを構築して、HSD17B13 の新規転写産物を組み込み、転写産物の量を、カスタム遺伝子モデルとのリードアライメントによって見積もった。全ての同定されたHSD17B13アイソフォームのタンパク質配列アラインメントを、図7Aおよび7Bに示す。

#### 【0436】

新規転写産物のRT-PCR検証。ヒト肝臓試料に由来する総RNA上でのRT-PCRを、SUPERSCRIPT (商標) One-Step RT-PCR Systemを、Platinum (商標) Taq DNAポリメラーゼ (Thermofisher)と共に使用して実施した。それぞれ500 uLのRT-PCR反応物は、1×反応ミックス、500 nMのそれぞれのフォワードおよびリバースプライマー (PST516: ATGAAACATCATTCTAGAAATCCCTTC (配列番号251) およびPST517: ATCATGCATACATCTCTGGCTGGAG (配列番号252))、1 μLのRT/Platinum Taq、および75 ngのRNAを含有していた。サイクリング条件は、45 で30 min の1サイクル；94 で2 min の1サイクル；94 で20 s、53 で30 s、および72 で90 sの40サイクル；72 で5 min の1サイクル；次いで、10 で保持であった。生成物を、QIAquick PCR精製キット (QIAGEN) を使用して精製し、プライマー-DE002 (ATCAGAACTTCAAGGCCCTTGG (配列番号253)) を使用する直接Sanger配列決定のために提出した。BおよびC転写産物を同定するために、RT-PCR生成物を、SYBR GOLD SYBR (登録商標) Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermofisher) で染色された2%アガロースゲル上で泳動し、予想分子量のバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使用して精製した後、TOPO (登録商標) TA Cloning Kit (Thermofisher) を用いるクローニングにかけた。TOPOクローンの配列決定を、M13FおよびM13R配列決定プライマーを使用して実施した。配列分析を、Sequencer DNA分析ソフトウェア (Gene Codes Corporation) を使用して実施した。

#### 【0437】

新規転写産物のPacBio検証。完全長HSD17B13転写産物を、最初のエクソン (GCAGAGCCATGAAACATCATCC (配列番号254)) および最後のエクソン (TCTTGATGTTAGTGGGAGTCGGATT (配列番号255)) 中の遺伝子特異的プライマーを使用する、Platinum Taq High Fidelityを含む SuperScript III One-step RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて50 ngの総RNAから直接増幅させて、約2.2 kbのアンプリコン (最大予測サイズの転写産物) を生成した。アンプリコンを、Agilent Bioanalyzer上で検証した。PacB

10

20

30

40

50

io 互換性バーコードアダプターを、アンプリコンにライゲートし、**PacBio PB** ビーズ (Pacific Biosciences) を用いて清浄化した。ライプラリーを等量でプールし、**PacBio RSI** プラットフォーム上で 180 min、1 個の S M R T セル上で配列決定した。データを、**PacBio smrt analysis v2.3 tool labelz mw** を使用して脱多重化した後、**ConsensusTools Amplicon Analysis** を用いて分析した。得られるアンプリコンを、**HSD17B13 RefSeq** 遺伝子と比較して、アイソフォームおよび遺伝子型状態を決定した。

#### 【0438】

**HSD17B13** アイソフォームの細胞内局在化。**HepG2** 細胞を、10% ウシ胎仔血清を添加した **Eagle** の最少必須培地で培養した。**HSD17B13** 転写産物 A、B、C および D を、**Myco-DDK** 骨格レンチウイルス構築物中にサブクローニングし、レンチウイルスを生成した。**HepG2** 細胞に、様々な **HSD17B13** 転写産物を担持するレンチウイルスを感染させた。それぞれの **HSD17B13** 転写産物を発現する安定な細胞株を、完全培養培地で 2 週間、1~3 mg / ml の **ゲネチシン G - 418** 硫酸塩を用いて選択した。選択された **HepG2** 細胞を、200 μM のオレイン酸で一晩、処理したか、または処理せず、次いで、固定した。**HSD17B13** アイソフォームを、マウス抗 **Myco** 抗体で標識した。脂肪滴を、**BODIPY FL** 色素 (**Sigma**) で標識した。脂質コートタンパク質および小胞体を、それぞれ、ウサギ抗 **PLIN** 抗体 (**Sigma**) およびウサギ抗カルネキシン抗体 (**Cell Signaling Technology**) で標識した。免疫蛍光のための二次抗体は、**Alexa Fluor 488** 口抗ウサギ IgG および **Alexa Fluor 594** 口抗マウス IgG (**Jackson Immuno Research**) であった。

#### 【0439】

##### (実施例 2)

##### **HSD17B13 mRNA** および **HSD17B13** タンパク質発現に対する **rs72613567 : TA** の効果

遺伝子の公知および新規の転写産物の発現に対する **HSD17B13 rs72613567 : TA** 対立遺伝子の効果を検査した。RNA 配列決定を使用して、**HSD17B13 rs72613567** スプライスバリエントの 22 の T / T ホモ接合体、30 の T / TA ヘテロ接合体、および 17 の TA / TA ホモ接合体保因者に由来する組織学的に正常な肝臓試料中の **HSD17B13 mRNA** 発現を評価した。2 つの公知の **HSD17B13** 転写産物 A および B に加えて、2 つの新規転写産物が同定された：エクソン 6 を欠く転写産物 C、およびタンパク質の早期トランケーションをもたらすと予測される、エクソン 6 の 3' 末端にグアニンヌクレオチドの挿入を含有する転写産物 D。これらの転写産物を、**RT-PCR** および **Sanger** 配列決定によって検証した（データは示さない）。また、転写産物 D を、ロングリード cDNA 配列決定を使用して検証した。これらの転写産物の発現レベルは、**HSD17B13 rs72613567** 遺伝子型によって変化した；それぞれの **TA** 対立遺伝子について、転写産物 A のレベルは減少したが、転写産物 D のレベルは対立遺伝子用量依存的様式で増加した（図 3A、3D および 10B を参照されたい）。完全長 300 アミノ酸タンパク質をコードする転写産物 A は、T / T ホモ接合体における優勢な転写産物であったが、早期にトランケートされたタンパク質をコードする転写産物 D は、TA / TA ホモ接合体における優勢な転写産物であった。ヒト肝臓生検組織において、トランケートされたアイソフォーム D タンパク質は、ヘテロ接合体および TA / TA ホモ接合体に最小限に存在し、アイソフォーム A タンパク質の存在量は、対立遺伝子用量依存的様式で減少した（図 10B および 10C を参照されたい）。これらのデータは、ヒト肝臓における発現が実質的に減少したトランケートされた形態のタンパク質の合成をもたらす、**HSD17B13 rs72613567** 選択的 mRNA スプライシングと一致している。

#### 【0440】

10

20

30

40

50

図 10 A ~ 10 E を参照すると、新規 H S D 1 7 B 1 3 転写産物の発現、細胞内局在化、および酵素活性が示される。H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 スプライスバリアントのホモ接合体参照 (T / T) 、ヘテロ接合体 (T / T A) 、およびホモ接合体代替物 (T A / T A) 保因者における H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A および D の発現を、図 3 A および 3 D に示す。遺伝子モデルにおけるコード領域は、縞模様の囲みで示され、非翻訳領域は、黒色の囲みで示される。転写産物 D 中の星印は、タンパク質の早期トランケーションをもたらす、エクソン 6 の 3' 末端での r s 7 2 6 1 3 5 6 7 に由来する G の挿入を示す。m R N A 発現は、F P K M 単位 (マッピングされたリード 1 0 0 万あたりの転写産物キロベースあたりの断片数) で表示される。H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A および D を過剰発現する H e p G 2 細胞に由来するウェスタンプロットは、H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D が、H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A と比較して低い分子量を有するトランケートされたタンパク質に翻訳されたことを示す (図 10 A を参照されたい)。同様の結果が、新鮮な凍結されたヒト肝臓および H E K 2 9 3 細胞試料に由来する H S D 1 7 B 1 3 のウェスタンプロットについても観察された (図 10 B を参照されたい)。ヒト肝臓試料は、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 スプライスバリアントのホモ接合体参照 (T / T) 、ヘテロ接合体 (T / T A) 、およびホモ接合体代替物 (T A / T A) 保因者に由来するものであった。細胞試料は、非タグ付き H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A および D を過剰発現する H E K 2 9 3 細胞に由来するものであった。H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D は、H S D 1 7 B 1 3 I s o A よりも低い分子量を有するトランケートされたタンパク質 I s o D に翻訳された。H S D 1 7 B 1 3 I s o D タンパク質レベルは、ヒト肝臓 (左) と細胞 (右) 試料の両方に由来する I s o A タンパク質レベルよりも低かった (図 10 C を参照されたい)。アクチンに対して正規化されたタンパク質レベルを、図 10 C 中の棒カラムに示す; \*\* P < 0.001, \* P < 0.05。H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム A と D は両方とも、脂肪滴を示す B O D I P Y および H S D 1 7 B 1 3 局在化を示す抗 M y c で標識された H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A または D を安定に過剰発現する H e p G 2 中の脂肪滴膜上に局在化された (データは示さない)。17 - ベータエストラジオール (エストラジオール) 、ロイコトリエン B 4 (L T B 4) 、および 13 - ヒドロキシオクタデカジエン酸 (13 (S) - H O D E ) に対する H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム A および D の酵素活性も評価した (図 10 D を参照されたい)。H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D は、アイソフォーム A に関する対応する値の 10 % 未満の酵素活性を示した。H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D は、H E K 2 9 3 細胞中で過剰発現された場合、培養培地中で測定された場合にエストラジオール (基質) のエストロン (生成物) への変換をあまり示さなかつたが、過剰発現された H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム A は、ロバストな変換を示した (図 10 E を参照されたい)。

#### 【 0 4 4 1 】

H S D 1 7 B 1 3 は、主に肝臓中で発現され (あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Liuら、Acta Biochim. Pol.、2 0 0 7 年、5 4 卷、2 1 3 ~ 8 頁) 、そこでそれは、脂肪性肝疾患の発症における役割と一致して、脂肪滴に局在化する (あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Suら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、2 0 1 4 年、1 1 1 卷、1 1 4 3 7 ~ 4 2 頁)。H S D 1 7 B 1 3 の発現およびその局在化を、H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A および D を発現するレンチウイルスを安定に形質導入した不死化ヒト肝臓細胞株において評価した。H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム A は、B O D I P Y で標識された脂肪滴を取り囲む膜上で主に検出された (データは示さない)。同様の細胞内局在化が、脂肪滴表面で H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D についても観察された (図 10 D を参照されたい)。

#### 【 0 4 4 2 】

r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A に起因する H S D 1 7 B 1 3 タンパク質の早期トランケーションの機能的結果を理解するために、アイソフォーム A および D の酵素活性を、組換えタンパク質を使用して *i n v i t r o* で評価した。3 0 0 を超える推定基質を検査し、そのうち、エストラジオール、ロイコトリエン B 4 、および 13 - ヒドロキシオクタデカジ

10

20

30

40

50

エン酸は、H S D 1 7 B 1 3 によって酵素的に変換され、ヒドロキシルのケトン基への酸化をもたらした。H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム D は、3 つの基質に向かう大きく低下した活性を示した（図 1 0 D を参照されたい）。

【 0 4 4 3 】

G F P 対照と比較して、H S D 1 7 B 1 3 - 転写産物 A を過剰発現する細胞は、細胞培養培地中の中より低濃度のエストラジオールならびにより高濃度のエストロンを有していたが、これは、エストラジオールに対する酵素活性を示唆している（図 1 0 E を参照されたい）。H S D 1 7 B 1 3 - 転写産物 D を過剰発現する細胞は、エストロン / エストラジオールの G F P 対照細胞に対する同様の比を有していたが、これは、H S D 1 7 B 1 3 転写産物 D が有意な機能喪失を有することを示唆している。質量分析により、消費されたエストラジオールと比較してエストロンの低い蓄積の原因となる、エストロンのヒドロキシエストロンおよび他の生成物への急速な変換が示された。

10

【 0 4 4 4 】

大規模エクソーム配列決定により、H S D 1 7 B 1 3 中のスプライスバリエントと、血清トランスアミナーゼレベルの低下との新しい関連、ならびに進行した肝硬変型の肝疾患およびH C C を含む、非アルコール型とアルコール型の肝疾患のリスクの低下との新しい関連が同定された。本発明者らの知る限り、これは、肝疾患との保護的関連を有するタンパク質を変化させるバリエントの初めての報告である。H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A 対立遺伝子は、単純脂肪肝と関連していなかったが、N A S H への進行のリスクを低下させた。いくつかの異なる肝疾患カテゴリーおよび民族性にわたる4つの独立したコホート（D i s c o v E H R、D i s c o v E H R における独立した肥満外科手術コホート、D L S 、およびD P L S ）における用量依存的保護的関連の一貫性は、報告されたH S D 1 7 B 1 3 バリエントが、慢性肝疾患のより臨床的に進行した段階への進行から保護するという見解を支持する。観察された対立遺伝子用量依存性はまた、H S D 1 7 B 1 3 機能のより大規模な調節が、疾患のリスクおよび進行に対するより大規模な効果をもたらし得ることを示している。

20

【 0 4 4 5 】

本明細書に記載の関連性の知見は、B M I が上昇した欧洲系およびヒスパニック系米国人における観察に基づくものであった。H S D 1 7 B 1 3 は、H S D 1 7 B 1 3 との高い配列類似性を有するが、より広い組織分布を有する同じ遺伝子ファミリーのメンバーであるH S D 1 7 B 1 1 とごく近い。全体として、本明細書で提示されるデータは、H S D 1 7 B 1 3 がヒトにおける脂肪性肝疾患の防止および処置のための潜在的な治療標的であるという立場を支持する。本明細書で提示されるデータは、H S D 1 7 B 1 3 の標的化が、脂肪症から、有意な疾病率および死亡率と関連し、現在、有効な処置が存在しない後期段階のN A S H 、線維症、および肝硬変への肝疾患の進行を低減させることができることを示している。

30

【 0 4 4 6 】

（実施例 3 ）

1 7 ベータ - ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 1 3 バリエントは慢性肝疾患に対して保護する

40

慢性肝疾患に寄与する遺伝的因子を同定するために、本発明者らは、D i s c o v E H R ヒト遺伝学研究における 4 6 , 5 4 4 人の参加者に由来するエクソーム配列データおよび電子カルテを利用した。本発明者らは、慢性肝疾患と関連し得る候補を指名するために、肝損傷の確立されたバイオマーカー（血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（A L T ）およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（A S T ））と関連する遺伝子バリエントを同定した。続いて、3 つのさらなるコホート（1 2 , 5 2 7 人の個体）において再現する候補バリエントを、D i s c o v E H R および 2 つの独立したコホート（合計 3 7 , 8 9 2 人の個体）における慢性肝疾患の臨床診断との関連について評価した。本発明者らはまた、独立した肥満外科手術コホート（n = 2 , 3 9 1 のヒト肝臓試料）における肝疾患の組織病理学的重症度との関連を検査した。

50

## 【0447】

肝臓脂肪滴タンパク質17 - ベータヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ13をコードする、HSD17B13におけるスプライスバリアント(rs72613567:TA)は、ALT( $P = 4.2 \times 10^{-12}$ )およびAST( $P = 6.2 \times 10^{-10}$ )レベルの低下と再現的に関連していた。DiscovEHRにおいて、このバリアントは、対立遺伝子用量依存的様式で、アルコール性および非アルコール性肝疾患のリスクの低下(それぞれのrs72613567:TA対立遺伝子について、それぞれ、38%、95%信頼区間(CI)19%~52%;および16%、95%CI9%~22%)ならびに肝硬変のリスクの低下(それぞれのrs72613567:TA対立遺伝子について、それぞれ、44%、95%CI22~59%;および26%、95%CI12%~38%)と関連していた;関連は、2つの独立したコホートにおいて確認された。rs72613567:TAは、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の組織学的特徴の重症度の低下(脂肪性肝疾患を有する個体のうち、それぞれのrs72613567:TA対立遺伝子について、23%の低下、95%CI10%~34%)と関連していた。rs72613567:TAは、ステロイド基質に対する酵素活性が低下した不安定でトランケートされたタンパク質をもたらす。

10

## 【0448】

HSD17B13における機能喪失バリアントは、アルコール性および非アルコール性肝疾患のリスクの低下、ならびに脂肪症からNASHへの進行と関連していた。

20

## 【0449】

研究設計および参加者

ヒト遺伝学研究を、Regeneron Genetics CenterとGeisinger Health System(GHS)とのDiscovEHR共同研究の一部として行った。2つのDiscovEHR研究集団(ディスカバリーコホートと肥満外科手術コホート)は、MyCode(登録商標)Community Health Initiative of GHSに由来する18歳以上の年齢の最初の50,726人の同意した参加者が起源であった。GHSディスカバリーコホートは、肥満外科手術コホートに募集された全ての人を除く、2007年~2016年に外来初期診療および専門クリニックから募集した46,544人の欧州系の個体からなっていた。GHS肥満外科手術コホートは、肥満外科手術を勧められた2,644人の欧州系の個体からなっていた。

30

## 【0450】

肝臓トランスアミナーゼとの関連の再現研究は、Dallas Heart Studyに由来する1,357人の欧州系の個体およびPenn Medicine Biobankに由来する8,527人の欧州系の個体を含んでいた。Dallas Heart Studyは、30~65歳のDallas Countyの居住者の確率ベース集団のコホート研究である(あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Victorら、Am. J. Cardiol.、2004年、93巻:1473~1480頁)。Penn Medicine Biobankは、University of Pennsylvania Health Systemから募集され、生体標本の保存、EHRデータへのアクセス、および再接触への承諾について同意した参加者を含む。

40

## 【0451】

慢性肝疾患との関連の再現研究は、Dallas Liver Study(DLS)に由来する517人の個体およびDallas Pediatric Liver Study(DPLS)に由来する447人の個体を含んでいた。DLSは、非ウイルス病因の肝疾患を有する患者の生体バンクである。募集は2015年1月に始まって、現在進行中である。参加者を、UT Southwestern and Parkland Health and Hospital System、Dallasの肝臓クリニックから募集した。参加者は、民族/人種背景、病歴、ライフスタイル因子、ならびに肝疾患および他の疾患の家族歴に関する問診票を完了した。さらなる臨床情報を、訓練された技術者によってカルテから抽出した。本発明者らは、Dallas Heart Studyに由来する

50

対照と共に、本研究の時点で利用可能なDNAを有する全てのアフリカ系米国人、欧州系米国人、およびヒスパニック系米国人の患者を含有させた( $n = 517$ )。DPLSは、UT Southwestern and Parkland Health and Hospital System、Dallasの小児肝臓クリニックから、およびChildren's Medical Center、Dallasの肥満クリニックから募集したヒスパニック系の子供の生体バンクである。臨床情報を、訓練された技術者によってカルテから抽出した。95%を超える患者がヒスパニック系米国人であったため、本発明者らは、本研究においてヒスパニック系米国人の患者および対照のみを含有させた( $n = 205$ 人の患者および234人の対照)。

## 【0452】

10

## ディスカバリーコホートにおける臨床測定値および慢性肝疾患の定義

ALTおよびASTの臨床検査測定値を、GHSディスカバリーコホートおよび肥満外科手術コホートに由来する参加者のEHRから抽出した。ALTおよびASTの中央値を、2つまたはそれより多い測定値を有する全ての参加者について算出し、log10変換して、関連分析の前に分布を正規化した。

## 【0453】

国際疾病分類、第9版(ICD-9)の疾患診断コードを、EHRから抽出し、非ウイルス性、非アルコール性(ICD-9 571.40、571.41、571.49、571.5、571.8、571.9)またはアルコール性(ICD-9 571.0、571.1、571.2、571.3)肝疾患症例定義のための臨床疾患カテゴリーに折り畳んだ。単一の診断コードに基づくさらなる症例定義は、アルコール性肝硬変(ICD-9 571.2)、非アルコール性肝硬変(ICD-9 571.5)、およびHCC(ICD-9 155.0)を含んでいた。これらの症例定義のために、肝疾患を含まない共通対照群(「肝疾患なし」)を、症例基準がないか、または任意の型の肝疾患を示す単一エンカウンターもしくは問題一覧診断コードがない参加者と定義した。

20

## 【0454】

## 肥満外科手術コホートにおける肝臓組織病理学的表現型の定義

GHS肥満外科手術コホートは、欧州子孫の2,644人の個体からなっていた。肝臓のくさび状生検を、これらの個体の2,391人から肥満外科手術中に取得した。生検を、肝圧排または胃に対する外科手術の前に肝錐状間膜の左に10cm、一貫して得た。生検を切片に分割し、一次切片を肝臓組織学的分析のために臨床病理学者に送達し(日常的な組織学的分析のために10%中性緩衝化ホルマリン中で固定し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、線維症の評価のためにマッソンのトリクロムで染色した)、残りの切片を研究生体バンク内に保存した(RNALaterおよび/または液体窒素中で凍結した)。肝臓の組織学的分析を、経験のある病理学者によって行い、続いて、以下のように、NASH Clinical Research Networkスコアリングシステム(あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kleinerら、Hepatology、2005年、41巻、1313~21頁)を使用して第2の経験のある病理学者によって再検討した:脂肪症等級0(5%未満の実質性病変)、1(5~33%未満)、2(34~66%未満)、および3(67%を超える);小葉炎症等級0(病巣なし)、等級1(軽度、200×視野あたり2個未満の病巣)、等級2(中等度、200×視野あたり2~4個の病巣)、等級3(重度、200×視野あたり4個を超える病巣);線維症ステージ0(なし)、ステージ1(類洞周囲または門脈周囲の線維症)、ステージ2(類洞周囲および門脈周囲の線維症)、ステージ3(架橋線維症)、およびステージ4(肝硬変)。これらの組織学的診断を使用して、以下の表現型:1)正常:脂肪症、NASHまたは線維症の証拠なし;2)単純脂肪肝:NASHまたは線維症の証拠がない脂肪症(等級に関係なく);3)NASH:小葉炎症もしくは肝細胞肥大の任意の存在(等級に関係なく)、または線維症の任意の存在(ステージに関係なく);4)線維症:線維症の任意の存在(ステージに関係なく)を定義した。

30

## 【0455】

40

50

### 試料の調製、配列決定、およびジェノタイピング

DiscovEHR研究、Dallas Heart Study、およびPenn Medicine Biobankにおける参加者のためのDNA試料調製および全エクソーム配列決定を、Regeneron Geneticsで実施した（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Deweyら、Science In Press、2016年）。HSD17B13 rs72613567を、Dallas Liver StudyおよびDallas Pediatric Liver StudyにおいてTaqmanアッセイによってジェノタイピングした（および各遺伝子型の5人の個体においてSanger配列決定によって検証した）。

#### 【0456】

特に、エクソーム捕捉を、製造業者の推奨プロトコール（Roche NimbleGen）に従ってNimbleGenプローブを使用して実施した。捕捉されたDNAを、PCR増幅し、qRT-PCR（Kapa Biosystems）によって定量した。多重化された試料を、Illumina v4 HiSeq 2500上の75bpのペアエンド配列決定を使用して、試料の96%において85%を超える標的塩基の20倍を超えるハプロイドリード深さ（標的塩基の約80倍の平均ハプロイドリード深さ）を提供するのに十分なカバレッジ深さまで配列決定した。それぞれのIllumina HiSeq 2500実行に由来する生の配列データを、配列リードアラインメントおよびバリアントの同定のために、DNAexusプラットフォーム（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Reidら、BMC Bioinformatics、2014年、15巻、30頁）にアップロードした。簡単に述べると、生の配列データを、BCLファイルから、試料特異的FASTQファイルに変換し、BWA-memを含むヒト参照ビルドGRCh37.p13とアラインメントした（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Liら、Bioinformatics、2009年、25巻、1754~60頁）。単一ヌクレオチドバリアント（SNV）および挿入/欠失（インデル）配列バリアントを、Genome Analysis Toolkit（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、McKennaら、Genome Res.、2010年、20巻、1297~303頁）を使用して同定した。

#### 【0457】

### 肝臓酵素および慢性肝疾患表現型のエクソームワイド関連分析

本発明者らは、線形混合モデルを使用して、トランスアミナーゼレベルとの関連について、1%未満の欠測データ率、 $1.0 \times 10^{-6}$ より大きいハーディー-ワインベルク平衡P値、および0.1%を超えるマイナー対立遺伝子頻度を示す502,219の二対立遺伝子バリアントを試験した。GHSディスカバリークホートにおけるトランスアミナーゼとのエクソームワイドな有意な関連を有するバリアントについて（ $p < 1 \times 10^{-7}$ ）、本発明者らは、上記の欧州祖先再現研究において、関連分析およびメタ分析を実施した。本発明者らは、再現された関連を定義するために試験したバリアント数によって決定されたポンフェローニの有意性閾値を使用した。ディスカバリー研究および再現研究のメタ分析も実施した。本文中で報告される全てのP値は、対立遺伝子モデルに対応する。

#### 【0458】

本発明者らは続いて、慢性肝疾患表現型との関連についてトランスアミナーゼ関連単一ヌクレオチドバリアントを試験した。本発明者らは、関連の有意性を決定するために試験したバリアントおよび広い慢性肝疾患カテゴリーの数によって決定されるポンフェローニの有意性閾値を使用した。本発明者らはさらに、GHS肥満外科手術コホートに由来する組織病理学的に定義された肝臓表現型との関連について再現された新規バリアントを試験した。本発明者らはまた、405の量的臨床測定値および3,168の臨床診断を用いて、再現された新規バリアントの関連のフェノムワイド研究を実施した。

#### 【0459】

特に、本発明者らは、トランスアミナーゼレベルとの関連について、1%未満の欠測データ率、 $1.0 \times 10^{-6}$ より大きいハーディー-ワインベルク平衡P値、および0.1%

10

20

30

40

50

を超えるマイナー対立遺伝子頻度を示す 502, 219 の二対立遺伝子バリアントを試験した。log10 変換された ALT および AST 中央値を、年齢、年齢2、性別、BMI、および祖先の最初の 4 つの主成分について調整した。研究参加者間の関連性を説明するために、本発明者らはまた、無作為効果共変量として遺伝的関連性マトリックスを適合させる。主成分と遺伝的関連性マトリックスとの両方を、近似連鎖平衡中の、0.1% を超えるマイナー対立遺伝子頻度を有する 39, 858 の非MHC マーカーから構築した。本発明者らは、GCTA パッケージに実装された線形混合モデル（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Yangら、Am J. Hum. Genet.、2011 年、88巻、76～82頁）を使用して、残存形質と単一ヌクレオチドバリアントとの関連について試験した。本文中で報告される全ての P 値は、対立遺伝子モデルに対応する。

10

#### 【0460】

本発明者らは、3 つの別々の欧州祖先コホート：GHS 肥満外科手術コホート、Dallas Heart Study、および Penn Medicine Biobank（上記のもの）における GHS ディスカバリーコホートにおいて関連を再現することを試みた。GHS 肥満外科手術コホートおよび Penn Medicine Biobank に由来する ALT および AST 測定値を、log10 変換し、年齢、年齢2、性別、BMI、および祖先の最初の 4 つの主成分について調整した。遺伝的関連性マトリックスを、無作為効果共変量として含有させ、分析を GCTA における線形混合モデルを使用して実施した。Dallas Heart Study では、log10 変換された ALT および AST 測定値を、年齢、年齢2、性別、BMI、および祖先の最初の 10 の主成分について調整し、分析を、PLINK に実装された線形回帰を使用して実施した。3 つの再現コホートに関する要約統計量を、METAL（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Wallerら、Bioinformatics、2010 年、26巻、2190～1 頁）を使用してメタ分析した（再現メタ分析）。ディスカバリーコホートおよび 3 つの再現コホートに関する要約統計量を、同様にメタ分析した（結合メタ分析）。

20

#### 【0461】

##### 慢性肝疾患表現型に関する関連分析

本発明者らは、上記のように、GHS ディスカバリーコホートから定義された慢性肝疾患表現型との関連について、肝臓酵素 EXWAS に由来する 13 の有意かつ再現された単一ヌクレオチドバリアントを分析した。本発明者らは、試験した 13 個のバリアントおよび 2 つの広い慢性肝疾患カテゴリー（アルコール性および非アルコール性）を説明するために、 $P < 0.05 / 26$  ( $P < 1.92 \times 10^{-3}$ ) のポンフェローニの有意性閾値を使用した。HSD17B13 rs72613567 バリアントを、上記のように、GHS 肥満外科手術コホートに由来する組織病理学的に定義された肝臓表現型との関連についてさらに試験した。オッズ比を、年齢、年齢2、性別、BMI、および祖先の最初の 4 つの主成分について調整した後、ロジスティック回帰の Firth の罰則付き尤度法を使用して見積もった。遺伝子型オッズ比を、同じ共変量を使用して HSD17B13 rs72613567 について見積もった。

30

#### 【0462】

DLS における肝疾患のオッズ比を、年齢、年齢2、性別、体格指数、および自己報告された民族について調整された、ロジスティック回帰によって見積もった。利用可能な rs72613567 遺伝子型を有する Dallas Heart Study に由来する参加者を、正常対照 ( $n = 4,279$ ) として使用した。DPLS におけるオッズ比を、ロジスティック回帰によって見積もった。

40

#### 【0463】

##### HSD17B13 rs72613567 のフェノムワイド関連研究

本発明者らは、HSD17B13 rs72613567 と、405 の量的 EHR 由来身体計測値、バイタルサイン、検査値、心電図、心エコー図、および骨密度測定値、ならびにまた、3,168 の EHR 由来臨床診断との関連のフェノムワイド研究を実施した。連続外来患者測定値を有する個体に関する検査中央値を、個体内中央値に由来する 3 を超え

50

る標準偏差であったおそらく偽の値の除去後に算出した；最大値と最小値も算出した。次いで、本発明者らは、年齢、年齢<sup>2</sup>、性別、および祖先の最初の10の主成分について調整した後、全ての検査形質について残存形質を算出し、関連分析の前に適切な変換を適用した。ICD-9に基づく診断コードを、Dennyら（それぞれ、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Dennyら、Nature Biotechnology、2013年、31巻、1102～10頁およびDennyら、Bioinformatics、2010年、26巻、1205～10頁）によって提唱された改変型のグループ分けを使用して、階層的臨床疾患群および対応する対照に折り畳んだ。ICD-9に基づく診断には、以下の1つまたは複数：診断コードの問題リスト登録または別のカレンダー日に2つの別々の臨床エンカウンターについて入れられたエンカウンター診断コードが必要であった。

10

#### 【0464】

変換された量的臨床測定値残存物との関連の分析を、線形回帰を使用して実施し、臨床診断との関連の分析を、年齢、年齢<sup>2</sup>、性別、および最初の4つの主成分について調整されたロジスティック回帰を使用して実施した。対立遺伝子を、加法（参照対立遺伝子ホモ接合体については0、ヘテロ接合体については1、および代替対立遺伝子ホモ接合体については2）および後退モデル（参照対立遺伝子ホモ接合体およびヘテロ接合体については0、代替対立遺伝子ホモ接合体については1）の両方を使用してコード化した。

#### 【0465】

##### ソフトウェア

遺伝子関連分析を、GCTAソフトウェア、バージョン1.25.07およびPLINK、バージョン1.9.0を使用して実施した。分位点-分位点およびマンハッタンプロットを、Rソフトウェア、バージョン3.2.1（R Project for Statistical Computing）を使用して生成した。領域関連プロットを、LocusZoomを使用して生成した（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Pruimら、Bioinformatics、2010年、26巻、2336～7頁）。

20

#### 【0466】

##### RNA配列決定研究

Agilent RNA Nano Bioanalyzerチップ上で総RNAを泳動することによって、RNAの品質および濃度を評価した；全試料は、8より大きいRNAインテグリティーナンバー（RIN）を有していた。ポリアデニル化されたRNA転写産物を、オリゴ(dT)25ビーズ（Thermo Fisher Scientific）を用いる2ラウンドの富化を使用して単離した。RNACleanXPビーズ（Beckman Coulter）を用いて試料を精製および濃縮し、約140塩基対まで熱断片化した。ランダムヘキサマーを使用するSuperScript III逆転写酵素（Thermo Fisher Scientific）を用いて第1鎖合成を完了した；第2鎖合成中にdTTPをdUTPと置き換えた。ウラシルDNA-グリコシラーゼステップを追加したエクソームに関して上記された本発明者らの標準的なDNAライプラリー調製法に従って、試料をプロセッシングして、鎖特異的配列決定ライプラリーを生成した。

30

#### 【0467】

##### 新規HSD17B13転写産物の同定および検証

40

2つのミスマッチを許容するArray Studio（登録商標）ソフトウェア（OmicsSoft（登録商標）、Cary、NC）を使用して、リードをHuman.B38にマッピングした。2つの手法を使用して、新規HSD17B13転写産物を同定した。新規エクソン結合部を、Array Studioを使用してGenode v24に基づいて発見した。De novo転写産物アセンブリを、デフォルト設定でTrinity（v2.2.0）を使用して実行した。カスタム遺伝子モデルを構築して、HSD17B13の新規転写産物を組み込み、転写産物の量を、カスタム遺伝子モデルとのリードアライメントによって見積もった。全ての同定されたHSD17B13アイソフォームのタンパク質配列アライメントを、図7Aおよび7Bに示す。ヒト肝臓試料に由来する総RNA上でRT-PCRを、SuperScript（商標）One-Step RT-P

50

CR Systemを、Platinum(商標)Taq DNAポリメラーゼ(Thermo Fisher)と共に使用して実施した。それぞれ50 μLのRT-PCR反応物は、1×反応ミックス、500 nMのそれぞれのフォワードおよびリバースプライマー(PS T516: ATGAAACATC ATCC TAGAAATC CCTTC(配列番号251)およびPS T517: ATCATGCATACATCTCTGGCTGGAG(配列番号252))、1 μLのRT/Platinum Taq、および75 ngのRNAを含有していた。サイクリング条件は、45で30分の1サイクル；94で2分の1サイクル；94で20秒、53で30秒、および72で90秒の40サイクル；72で5分の1サイクル；次いで、10で保持であった。生成物を、QIAquick PCR精製キット(Qiagen)を使用して精製し、プライマーDE002(ATCAGAACCTCAGGCC TTGG(配列番号253))を使用する直接Sanger配列決定のために提出した。BおよびC転写産物を同定するために、RT-PCR生成物を、SYBR Gold SYBR(登録商標)Gold Nucleic Acid Gel Stain(Thermo Fisher)で染色された2%アガロースゲル上で泳動し、予想分子量のバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)を使用して精製した後、TOPO(登録商標)TA Cloning Kit(Thermo Fisher)を用いるクローニングにかけた。TOPOクローンの配列決定を、M13FおよびM13R配列決定プライマーを使用して実施した。配列分析を、Sequencer DNA分析ソフトウェア(Gene Codes Corporation)を使用して実施した。完全長HSD17B13転写産物を、最初のエクソン(GCAAAGCCATGAAACATC ATCC(配列番号254))および最後のエクソン(TCTTGATGTAGTGGGAGTCGGATT(配列番号255))中の遺伝子特異的プライマーを使用する、Platinum Taq High Fidelityを含むSuperScript III One-step RT-PCR System(Thermo Fisher Scientific)を用いて50 ngの総RNAから直接増幅させて、約2.2 kbのアンプリコン(最大予測サイズの転写産物)を生成した。アンプリコンを、Agilent Bioanalyzer上で検証した。PacBio互換性バーコードアダプターを、アンプリコンにライゲートし、PacBio PBビーズ(Pacific Biosciences)を用いて清浄化した。ライプラリーを等量でプールし、PacBio RSIIプラットフォーム上で180分間、1個のSMRTセル上で配列決定した。データを、PacBioソフトウェアsmrt analysis v2.3 tool label zmwを使用して脱多重化した後、ConsensusTools Amplicon Analysisを用いて分析した。得られるアンプリコンを、HSD17B13 RefSeq遺伝子と比較して、アイソフォームおよび遺伝子型状態を決定した。

#### 【0468】

##### HSD17B13アイソフォームの細胞内局在化

HepG2細胞を、10%ウシ胎仔血清を添加したEagleの最少必須培地で培養した。HSD17B13転写産物AおよびDを、Myo-D DK骨格レンチウイルス構築物中にサブクローニングし、レンチウイルスを生成した。HepG2細胞に、HSD17B13転写産物を担持するレンチウイルスを感染させた。それぞれのHSD17B13転写産物を発現する安定な細胞株を、完全培養培地で2週間、1~3 mg/mlのゲネチシング-418硫酸塩を用いて選択した。固定後、HSD17B13アイソフォームを、マウス抗MyoC抗体を用いて検出した。脂肪滴を、BODIPY FL色素(Sigma)で標識した。免疫蛍光のための二次抗体は、Alexa Fluor 488口バ抗ウサギIgGおよびAlexa Fluor 594口バ抗マウスIgG(Jackson Immunoresearch)であった。

#### 【0469】

ヒト肝臓組織生検試料および安定細胞株中のHSD17B3タンパク質発現の定量化ヒト肝臓および細胞ペレット試料を、プロテアーゼとホスファターゼ阻害剤の混合物(T

10

20

30

40

50

thermoFisher) の存在下で、氷冷  $1 \times$  RIPA 溶解緩衝液 (EMD Millipore) 中でホモジエナライズした。上清を収集し、BCA タンパク質アッセイ (ThermoFisher) を使用してタンパク質濃度のために使用した。ヒト組織および細胞溶解物を、SDS / PAGE ゲル (Bio-Rad) 上にロードし、分離し、PVDF 膜 (Bio-Rad) に移した。膜を、0.1% Tween 20 (Bio-Rad) を添加した  $1 \times$  TBS 中の 5% (wt/vol) ミルクで 1 時間ブロックした。膜を、HSD 17B13 (1:200, Thermo-Fisher) および B-アクチン (1:500, Cell Signaling Technology) に対して 4 時間で一晩、抗体と共にインキュベートした。結合した抗体を、HRP コンジュゲート化抗ウサギ抗体 (1:10,000, Jackson ImmunoResearch) を使用して検出し、化学発光試薬 (ThermoFisher) を使用して増強した。バンド強度を、Image J ソフトウェアを使用して定量した。 10

#### 【0470】

#### リアルタイム半定量的 PCR

RNA を、TRIzol (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して細胞から抽出した。第 1 鎖 cDNA を、Superscript III RT (Invitrogen) を使用して合成し、イントロン - スパンニングプライマーに基づく半定量的 PCR のために使用した。Quant Studio 6 Flex Real-Time PCR System を使用して、転写産物の発現レベルを測定した。HSD 17B13 と TBP のプライマーは、IDT (Integrated DNA Technologies) から注文されたものであった。相対的遺伝子発現を、Ct 法を用いて分析し、ハウスキーピング遺伝子 TBP に対して正規化された発現の倍数変化 (Ct) を提供した。 20

#### 【0471】

#### 脂肪滴の単離およびウェスタンブロッティングによる特徴付け

脂肪滴を、以前に報告されたように (それぞれ、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Brasaemle DL、Wolins NE.、Isolation of lipid droplets from cells by density gradient centrifugation、Current protocols in cell biology 2006 年; 第 3 章: ユニット 3 15 および Ding ら、Nature Protocols、2013 年、8 卷、43~51 頁)、HSD 17B13 転写産物 A (IsoA) または転写産物 D (IsoD) を安定に発現する HepG2 細胞から調製した。簡単に述べると、HSD 17B13 IsoA、IsoD を安定に発現する HepG2 細胞、または親細胞株を、1 mM のオレイン酸と共に一晩インキュベートした。脂質負荷の後、細胞を搔き取り、 $1 \times$  Halt (商標) プロテアーゼ / ホスファターゼ阻害剤 (Thermo) を添加した低張性溶解緩衝液 (20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA) 中に再懸濁し、50 バールで 8 分間、キャビテーションによって溶解した。溶解物を 1000 g / 4 で 10 分間遠心分離し、核除去後上清 (PNS) を、2 mL の最終容量および 20% の濃度まで超遠心分離管中でスクロースと混合した。次いで、1.5 mL の 5% スクロースおよび別の 1.5 mL の低張性溶解緩衝液を、溶解物の上に載せた。管を、182,000 g / 4 で 40 分間遠心分離し、脂肪滴 (LD) 層を新しい管に移した。管中の残存容量を吸引し、ペレット (総膜、TM) を 0.5 mL の低張性溶解緩衝液中に再懸濁した。PNS、LD、および TM 画分を、 $1 \times$  ラジオイムノ沈降 (RIPA) 緩衝液 (EMD) + NuPAGE (商標) LDS 試料緩衝液 (Thermo) および - メルカプトエタノールと混合し、37 度で 3 時間、超音波処理した。TM 溶解物を、2.5 倍希釈して、PNS に対して正規化した。溶解物を、4~20% の SDS-PAGE ゲル (Bio-Rad) 上で泳動し、Trans-Blot (Bio-Rad) を使用して、低蛍光 PVDF 膜上に移し、Odyssey TBS Blocking 缓衝液中で 1 時間ブロックした。膜を、以下の抗体: - HSD 17B13 (Abgent、カタログ番号 AP5729a, 1:500) ; LD マーカー: - ADRP (ProteinTech, 152-94-1-AP, 1:2500) ; LD マーカー: - TIP47 (ProteinTech 40

ch、10694 1 : 2000) ; リソソームマーカー: - LAMP1 (Novus、NBP2-25183、1 : 1000) ; 細胞質マーカー: - GAPDH (ProteinTech、60004-1-Ig、1 : 2000) ; 小胞体マーカー: - カルテイキュリン (Abcam、ab92516、1 : 1000) ; ミトコンドリアマーカー: - COX IV (Abcam、ab33985、1 : 500) ; 細胞骨格マーカー: - アクチン (Sigma、A5441、1 : 4000) と共に一晩インキュベートした。次の日、膜を、Tris緩衝化食塩水 + 0.1% Tweenで4回洗浄した後、それぞれ、1 : 5,000 および 1 : 10,000 の希釈率の IRDye (登録商標) - ウサギ (800CW) および - マウス (680RD) 二次抗体 (Li-Cor) を含有するプロッキング緩衝液と共に、室温で1時間インキュベートした。ゲルをTBS-Tで再度洗浄し、Odysseyを使用して画像化した。

#### 【0472】

##### 細胞内トリグリセリド含量の定量化

安定細胞に由来するトリグリセリド (TG) 含量を、TG定量化キット (Abcam) を使用して決定した。このアッセイでは、TGは、遊離脂肪酸およびグリセロールに変換される。次いで、グリセロールは酸化されて、定量される生成物を生成する (= 570 nmでの分光測光)。

#### 【0473】

##### 精製された組換えHSD17B13に対するステロイドおよび生物活性脂質ライブラリーの基質スクリーニング

反応を、500 μMのNAD<sup>+</sup>、5 μMの生物活性脂質または50 μMのステロイド (全て5%DMSO中の最終濃度)、および100 ngの組換えヒトHSD17B13を含有する40 μLの最終容量のアッセイ緩衝液 (0.2M Tris-HCl、pH 7.5) 中で実施した。反応物を、23℃で3時間インキュベートした後、等量のNADH-Glo Detection Reagent (Promega) を添加した。23℃で1時間インキュベートした後、相対的光単位 (RLU) を、Envision Plate Reader (Perkin Elmer) 上で測定した。生のRLU値を、以下の式: 対照のパーセント (POC) = 100 × (試料 (RLU) - 隣性CTRL平均) / (陽性CTRL平均 - 隣性CTRL平均) を使用して、陰性対照 (5%DMSO) の減算後の対照 (50 μMエストラジオール) のパーセントとして正規化した。

#### 【0474】

##### HSD17B13酵素活性のin vitroおよび細胞での特徴付け

組換えヒトHSD17B13タンパク質を、HSD17B13転写産物Aまたは転写産物Dを担持するプラスミドDNAで形質転換されたE. coli (Genscript) から精製した。HSD17B13バリアントは、C末端に10×Hisタグを含有し、Ni<sup>2+</sup>親和性精製を使用して可溶性画分から精製した。酵素活性を、NAD(P)H-Glo Detection System (Promega) を使用して、NADH産生の測定によって決定した。反応を、最終容量100 μL中の0.2M Tris-HCl、pH 7.5、0.5 mM NAD<sup>+</sup>、75 μMの基質 (Sigma) および500 ngの精製された酵素中、25℃で3時間実施した。インキュベーション後、20 μLの反応物を、20 μLのルシフェラーゼ試薬 (Promega) と混合し、室温で1時間インキュベートし、Envision Plate Reader (Perkin Elmer) 上で読み取った。

#### 【0475】

HSD17B13転写産物A、転写産物Dまたは緑色蛍光タンパク質 (GFP、対照) を過剰発現するHEK293細胞を使用して、細胞に基づくアッセイにおいてエストラジオールに対するHSD17B13の活性を精査した。エストラジオール (1 μM) をそれぞれの細胞型に供給した。48時間後、培地を収集し、エストラジオールおよびその変換された生成物であるエストロンの濃度を同定し、LC-MSによって定量した。

#### 【0476】

10

20

30

40

50

エクソンバリアントと、アスパラギン酸およびアラニンアミノトランスフェラーゼとの関連本発明者らは、DiscoveHR研究に由来する欧洲子孫の46,544人の個体（「GHSディスカバリーコホート」；表6における基本人口統計）における血清ALTまたはASTレベルとの関連について、502,219の二対立遺伝子単一遺伝子バリアントを試験した。19個の遺伝子中の合計35個のバリアントが、 $P < 1.0 \times 10^{-7}$ でALTまたはASTと関連することが見出された（図1Aおよび1B、ならびに表7）。本発明者らは、欧洲祖先の個体の3つのコホート：1) DiscoveHRに由来する肥満外科手術患者（n = 2,644）（「GHS肥満外科手術コホート」）；2) Dallas Heart Studyに由来する1,357人の個体；および3) Penn Medicine Biobankに由来する8,526人の個体において再現研究を実施した。再現コホートのメタ分析において、9個の遺伝子中の13個のバリアントが、ALTまたはASTの血清レベルと有意に関連していた（試験した35のバリアントについて、 $P < 1.43 \times 10^{-3}$ のボンフェローニの有意性閾値、表8）。これらのものは、PNP LA37、TM6SF211、SERPINA122、SAMM5023、およびERL1N124などの、トランスマニナーゼレベルの上昇と関連すると以前に報告されたバリアントを含んでいた。SERPINA1は、アルファ-1-抗トリプシンをコードし、その機能的欠損は、肝疾患を引き起す；SAMM50との関連は、PNP LA3中の変化との連鎖不均衡によって媒介され、ERL1N1は肝臓の脂肪沈着に関与している。本発明者らはまた、肝疾患と関連すると以前には報告されなかったバリアントも同定した。これらのものは、それぞれ、ALTおよびASTをコードする遺伝子であるGPTおよびGOT1、ならびに溶質運搬ファミリー39メンバー12をコードするSLC39A12中にいくつかのバリアントを含んでいた。

#### 【0477】

本発明者らはまた、17-ベータヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼファミリーの特徴付けられていないメンバーであるヒドロキシステロイド17-ベータデヒドロゲナーゼ13をコードする遺伝子であるHSD17B13におけるバリアントと、ALT（ディスカバリー $P = 4.2 \times 10^{-12}$ 、再現 $P = 1.7 \times 10^{-4}$ ）およびAST（ディスカバリー $P = 6.2 \times 10^{-10}$ 、再現 $P = 1.7 \times 10^{-4}$ 、表8）のレベルの低下との再現可能な関連を同定した。関連するバリアントであるrs72613567は、エクソン6（TA対立遺伝子）のドナースプライス部位に隣接するアデニンの挿入であり、GHSディスカバリーコホートにおいて26.0%の対立遺伝子頻度を有していた。以前に、Chambersらは、ALTレベルと関連する4q22（rs6834314）に隣接遺伝子座を同定した（あらゆる目的に關してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Chambersら、Nat. Genet.、2011年、43巻、1131～1138頁、doi:10.1038/ng.970）；rs72613567は、これまで、トランスマニナーゼレベルと関連するとは報告されていなかった。HSD17B13は、同じ遺伝子ファミリーの別のメンバーであるHSD17B11の30kb上流にある。本発明者らは、HSD17B11におけるコードまたはスプライスバリアントと、ディスカバリーコホートにおけるトランスマニナーゼレベル（図5Aおよび5B）またはディスカバリーコホートおよび3つの再現コホートの結合メタ分析におけるトランスマニナーゼレベルとのエクソームワイドな有意な関連を観察しなかった。さらに、rs72613567と、HSD17B11におけるバリアントとの連鎖不均衡は、全ての祖先群にわたって中程度であった（全ての祖先群におけるHSD17B11における全ての確認されたバリアントに関して $r^2 < 0.4$ ）。まとめると、これらの知見は、トランスマニナーゼレベルと機能的に関連する可能性が最も高いゲノム領域中の遺伝子として、HSD17B13を示唆する。

#### 【0478】

10

20

30

30

40

50

## 【表 6】

表6.ディスカバリーコホートおよび再現コホートに由来する配列決定された欧州祖先の個体の人

## 口および臨床特徴

特徴	ディスカバリーコホート (N = 46,544)	肥満外科手術 コホート (N = 2,644)	Dallas Heart Study (N = 1,357)	Penn Medicine Biobank (N = 8,526)
年齢(歳)-中央値(IQR)	62.9 (49.6 - 73.8)	52.9 (44.1 - 61.2)	46.0 (38.0 - 54.0)	68.0 (60.0 - 76.0)
女性-数(%)	26,875 (57.7)	2,119 (80.1)	724 (53.4)	3,242 (38.0)
体格指数-中央値(IQR)	29.9 (35.4 - 44.8)	47.4 (42.0 - 53.7)	28 (25-32)	30 (25-32)
トランスアミナーゼレベル(U/L)-中央値(IQR)				
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	22.0 (17.0 - 29.0)	23.0 (17.5 - 29.5)	20.0 (15.0 - 27.0)	22.0 (17.0 - 30.0)
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)	23.0 (20.0 - 27.5)	23.0 (20.0 - 27.0)	21.0 (18.0 - 25.0)	24.0 (20.0 - 30.5)
肝疾患の存在(ICD-9 コードによる)-N(%)				
アルコール性肝疾患	197 (0.4)	7 (0.3)	-	-
アルコール性肝硬変	130 (0.3)	3 (0.1)	-	-
非アルコール性、非ウイルス性肝疾患	1,938 (4.2)	1,543 (58.4)	-	-
非アルコール性肝硬変	382 (0.8)	24 (0.9)	-	-
肝細胞癌	76 (0.2)	1 (0.04)	-	-
肝疾患なし	30,628 (65.8)	1 (0.04)	-	-

## 【 0 4 7 9 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表7.ディスカバリーCホートにおいてP<1.0×10<sup>-7</sup>で血清トランスアミナーゼレベルと関連する単一ヌクレオチドバリエント

形質	CHR	BP	REF	ALT	rsID	遺伝子	注釈	AA 置換	ペータ(SE)
ALT	1	220970028	A	G	rs2642438	<i>MARCI</i>	ミスセンス	p.Thr165Ala	0.008 (0.001)
	4	88231392	T	TA	*rs72613567	<i>HSD17B13</i>	スプライストナー		-0.009 (0.001)
	8	144997604	C	A T	rs371119003	<i>PLEC</i>	ミスセンス	p.Ala2302Thr	-0.160 (0.026)
	8	145008502	G	A A T		<i>PLEC</i>	ミスセンス	p.Arg522Cys	-0.268 (0.032)
	8	145692918	G	A A A	rs35968570	<i>KIFC2</i>	ミスセンス	p.Glu174Lys	-0.033 (0.005)
	8	145730072	G	T A	rs143408057	<i>GPT</i>	ミスセンス	p.Arg83His	-0.314 (0.036)
	8	145730161	C	A T	rs201815297	<i>GPT</i>	ミスセンス	p.Ala87Val	-0.224 (0.014)
	8	145730221	G	C A	rs112574791	<i>GPT</i>	ミスセンス	p.Arg107Lys	-0.033 (0.005)
	8	145731636	T	C G	rs145155876	<i>GPT</i>	停止獲得	p.Tyr326*	-0.235 (0.031)
	8	145732114	G	C C A	rs141505249	<i>GPT</i>	ミスセンス	p.Glu430Gln	-0.224 (0.013)
	8	145732151	G	C A	rs143462595	<i>GPT</i>	ミスセンス	p.Arg442His	-0.077 (0.013)
	8	145732180	G	C C	rs147998249	<i>GPT</i>	ミスセンス	p.Val452Leu	-0.225 (0.013)
	8	145732305	G	GC		<i>GPT</i>	フレームシフト	p.Glu475fs	-0.271 (0.031)
	8	145748532	C A	T G	rs567402720	<i>LRRC24</i>	ミスセンス	p.Leu290Ser	-0.185 (0.028)
	9	117122202	C	A T	rs3748177	<i>AKNA</i>	同義	p.Glu755Glu	-0.007 (0.001)
	9	117124731	G	A A T	rs3748176	<i>AKNA</i>	ミスセンス	p.Pro624Leu	-0.007 (0.001)
	10	101595996	T	A	rs17222723	<i>ABCC2</i>	ミスセンス	p.Val1188Glu	-0.015 (0.003)
	10	101606861	G	T T	rs1137968	<i>ABCC2</i>	同義	p.Val1430Val	-0.015 (0.003)
	10	101610533	C C	A T	rs8187707	<i>ABCC2</i>	同義	p.His1496His	-0.015 (0.003)
	10	101611294	G	C A T	rs8187710	<i>ABCC2</i>	ミスセンス	p.Cys1515Tyr	-0.015 (0.003)
	10	101912064	T	C T	*rs2862954	<i>ERLIN1</i>	ミスセンス	p.Ile291Val	-0.012 (0.001)
	10	101977883	C	A T	rs2230804	<i>CHUK</i>	ミスセンス	p.Val268Ile	-0.009 (0.001)
	10	113917085	T	C A	rs2254537	<i>GPAM</i>	同義	p.Pro681Pro	-0.008 (0.001)
	10	113940329	T	C C	rs2792751	<i>GPAM</i>	ミスセンス	p.Ile43Val	-0.008 (0.001)
	14	94844947	C C	T T	*rs28929474	<i>SERPINA1</i>	ミスセンス	p.Glu366Lys	0.042 (0.005)
	19	19379549	C C	T T	*rs58542926	<i>TM6SF2</i>	ミスセンス	p.Glu167Lys	0.014 (0.002)
	22	44324727	C C	G T	*rs738409	<i>PNPLA3</i>	ミスセンス	p.Ile148Met	0.023 (0.002)
	22	44324730	A C	G T	*rs738408	<i>PNPLA3</i>	同義	p.Pro149Pro	0.023 (0.002)
	22	44342116	A C	G T	rs2294918	<i>PNPLA3</i>	ミスセンス	p.Lys434Glu	0.007 (0.001)
	22	44368122	A	C G	*rs3761472	<i>SAMM50</i>	ミスセンス	p.Asp110Gly	0.019 (0.002)
	22	44395451	T	C C	*rs1007863	<i>PARVB</i>	ミスセンス	p.Trp37Arg	0.011 (0.001)
AST	4	88231392	T	TA	*rs72613567	<i>HSD17B13</i>	スプライストナー		-0.005 (0.001)
	10	18242311	A	G	rs10764176	<i>SLC39A12</i>	ミスセンス	p.Ser36Gly	-0.006 (0.001)
	10	101157378	CGTT	C C		<i>GOT1</i>	インフレームインデル	p.Asn389del	-0.221 (0.024)
	10	101165533	G	T C C	rs374966349	<i>GOT1</i>	ミスセンス	p.Gln208Glu	0.271 (0.027)
	10	101912064	T	C T	*rs2862954	<i>ERLIN1</i>	ミスセンス	p.Ile291Val	-0.005 (0.001)
	11	22271870	A C	T T	rs7481951	<i>ANOS1</i>	ミスセンス	p.Leu322Phe	0.004 (0.001)
	14	94844947	C C	T T	*rs28929474	<i>SERPINA1</i>	ミスセンス	p.Glu366Lys	0.027 (0.003)
	19	19379549	C C	T T	*rs58542926	<i>TM6SF2</i>	ミスセンス	p.Glu167Lys	0.008 (0.002)
	22	44324727	C C	G T	*rs738409	<i>PNPLA3</i>	ミスセンス	p.Ile148Met	0.014 (0.001)
	22	44324730	C C	G T	*rs738408	<i>PNPLA3</i>	同義	p.Pro149Pro	0.014 (0.001)
	22	44368122	A	C G	*rs3761472	<i>SAMM50</i>	ミスセンス	p.Asp110Gly	0.011 (0.001)
	22	44395451	T	C C	*rs1007863	<i>PARVB</i>	ミスセンス	p.Trp37Arg	0.006 (0.001)

【 0 4 8 0 】

10

20

30

40

50

【表7-2】

表7(続き)

形質	CHR	BP	REF	ALT	P	AAF	N	N			平均 AST または ALT レベル(U/L)		
								REF/REF	REF/ALT	ALT/ALT	REF/REF	REF/ALT	ALT/ALT
ALT	1	220970028	T	A	4.67E-08	0.7067	41,414	3.515	17.262	20.637	23.88	24.52	24.92
	4	88231392	C	T	4.16E-12	0.2634	41,414	22.441	16.130	2.843	25.02	24.26	24.1
	8	144997604	G	C	1.30E-09	0.0005	41,413	41.373	40	0	24.67	18.1	NA
	8	145008502	G	G	3.26E-17	0.0003	41,414	41.387	27	0	24.67	13.8	NA
	8	145692918	G	G	1.40E-11	0.0139	41,414	40.271	1.133	10	24.67	12.07	NA
	8	145730072	T	A	3.28E-18	0.0003	41,414	41.393	21	0	24.67	12.07	NA
	8	145730161	T	A	6.28E-59	0.0018	41,414	41.270	144	0	24.7	14.68	NA
	8	145730221	G	C	4.25E-11	0.0136	41,414	40.293	1.111	10	24.71	23.09	18.35
	8	145731636	G	T	1.76E-14	0.0004	41,394	41.364	30	0	24.67	14.07	NA
	8	145732114	G	G	8.84E-64	0.0019	41,375	41.223	150	2	24.7	14.48	13.75
	8	145732151	C	A	1.18E-09	0.0021	41,406	41.232	174	0	24.68	20.87	NA
	8	145732180	C	C	8.19E-65	0.0019	41,413	41.254	159	0	24.7	14.74	NA
	8	145732305	G	GC	1.00E-18	0.0004	41,414	41.385	29	0	24.67	14.24	NA
	8	145748532	A	T	3.42E-11	0.0004	41,393	41.358	35	0	24.67	17.71	NA
	9	117122202	T	G	9.51E-09	0.5232	41,414	9.414	20.645	11.355	25.12	24.72	24.18
	9	117124731	G	T	4.31E-09	0.5230	41,412	9.427	20.634	11.351	25.12	24.73	24.17
	10	101595996	T	A	2.97E-08	0.0608	41,414	36.543	4.704	167	24.77	23.97	22.12
	10	101606861	G	G	2.71E-08	0.0608	41,414	36.543	4.704	167	24.77	23.97	22.04
	10	101610533	C	T	2.77E-08	0.0608	41,414	36.542	4.706	166	24.77	23.97	22.03
	10	101611294	C	A	2.15E-08	0.0611	41,414	36.519	4.726	169	24.77	23.97	21.99
	10	101912064	T	T	2.43E-21	0.4755	41,414	11.318	20.819	9.277	25.32	24.71	23.77
	10	101977883	C	T	1.93E-13	0.5072	41,414	10.048	20.733	10.633	25.18	24.75	24.01
	10	113917085	T	C	4.61E-10	0.7073	41,414	3.627	16.984	20.803	25	24.97	24.36
	10	113940329	T	C	2.54E-10	0.7097	41,412	3.567	16.910	20.935	25	24.98	24.35
	14	94844947	C	C	9.28E-21	0.0171	41,414	40.006	1.399	9	24.58	26.91	43.89
	19	19379549	C	T	4.76E-09	0.0759	41,413	35.388	5.780	245	24.52	25.46	26.84
	22	44324727	C	C	1.34E-50	0.2351	41,414	24.257	14.837	2.320	24.06	24.99	28.91
	22	44324730	A	C	1.11E-50	0.2349	41,414	24.273	14.824	2.317	24.06	24.98	28.92
	22	44342116	A	A	8.26E-08	0.5986	41,412	6.691	19.833	14.888	24.15	24.47	25.15
	22	44368122	G	G	8.85E-30	0.1682	41,413	28.626	11.618	1.169	24.23	25.36	28.45
	22	44395451	T	C	7.98E-16	0.3963	41,414	15.036	19.920	6.458	24.15	24.6	26.09
AST	4	88231392	T	TA	6.24E-10	0.2638	40,753	22.068	15.870	2.815	24.47	24.1	23.96
	10	18242311	A	G	1.09E-10	0.2881	40,753	20.645	16.738	3.370	24.47	24.15	23.85
	10	101157378	CG	TT	1.96E-20	0.0002	40,753	40.733	20	0	24.29	14.7	NA
	10	101165533	T	G	2.43E-24	0.0002	40,753	40.736	17	0	24.28	44.5	NA
	10	101912064	C	T	4.82E-09	0.4754	40,753	11.138	20.486	9.129	24.59	24.26	23.99
	11	22271870	C	T	9.61E-08	0.5833	40,722	7.123	19.686	13.913	24.03	24.22	24.53
	14	94844947	C	T	2.44E-20	0.0172	40,753	39.361	1.384	8	24.24	25.76	34.5
	19	19379549	C	T	6.54E-08	0.0760	40,752	34.811	5.698	243	24.21	24.74	25.43
	22	44324727	C	T	8.31E-46	0.2343	40,753	23.889	14.622	2.242	23.96	24.48	26.62
	22	44324730	A	G	8.93E-46	0.2341	40,753	23.905	14.609	2.239	23.96	24.47	26.63
	22	44368122	C	G	1.22E-22	0.1680	40,752	28.170	11.450	1.132	24.07	24.64	26.24
	22	44395451	T	C	1.31E-13	0.3961	40,753	14.761	19.678	6.314	24.02	24.23	25.1

\*ALT と AST の両方とのエクソームワイドな有意な関連を有するポリントを示す。

省略形: AAF、代替対立遺伝子頻度; Alt、代替対立遺伝子; ALT、アラニンアミノトランスフェラーゼ; AST、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ; Ref、参照対立遺伝子; SE、標準誤差。

【0481】

10

20

30

40

50

## 【表 8 - 1】

表8. 3つの別々の欧洲祖先コホート中のディスカバリーCOホートに由来する35のエクソームワイドな有意な単一ヌクレオチドバリエントの再現および結合メタ分析

形質	Chr	BP	Ref	Alt	RSID	遺伝子	Ann	AA 換換	GHS ディスカバリーCOホート		
									ペータ (SE)	P	N
ALT	1	220970028	A	G	rs2642438	<i>MARC1</i>	mis	p.Thr165Ala	0.008 (0.001)	4.67E-08	41.414
	4	88231392	T	TA	rs72613567	<i>HSD17B13</i>	sp1		-0.009 (0.001)	4.16E-12	41.414
	8	144997604	C	T	rs371119003	<i>PLEC</i>	mis	p.Ala2302Thr	-0.160 (0.026)	1.30E-09	41.413
	8	145008502	G	A		<i>PLEC</i>	mis	p.Arg522Cys	-0.268 (0.032)	3.26E-17	41.414
	8	145692918	G	A	rs35968570	<i>KIFC2</i>	mis	p.Glu174Lys	-0.033 (0.005)	1.40E-11	41.414
	8	145730072	G	A	rs143408057	<i>GPT</i>	mis	p.Arg83His	-0.314 (0.036)	3.28E-18	41.414
	8	145730161	C	T	rs201815297	<i>GPT</i>	mis	p.Ala87Val	-0.224 (0.014)	6.28E-59	41.414
	8	145730221	G	A	rs112574791	<i>GPT</i>	mis	p.Arg107Lys	-0.033 (0.005)	4.25E-11	41.414
	8	145731636	T	G	rs145155876	<i>GPT</i>	stop	p.Tyr326*	-0.235 (0.031)	1.76E-14	41.394
	8	145732114	G	C	rs141505249	<i>GPT</i>	mis	p.Glu430Gln	-0.224 (0.013)	8.84E-64	41.375
	8	145732151	G	A	rs143462595	<i>GPT</i>	mis	p.Arg442His	-0.077 (0.013)	1.18E-09	41.406
	8	145732180	G	C	rs147998249	<i>GPT</i>	mis	p.Val452Leu	-0.225 (0.013)	8.19E-65	41.413
	8	145732305	G	GC		<i>GPT</i>	fs	p.Glu475fs	-0.271 (0.031)	1.00E-18	41.414
	8	145748532	A	G	rs567402720	<i>LRRC24</i>	mis	p.Leu290Ser	-0.185 (0.028)	3.42E-11	41.393
	9	117122202	C	T	rs3748177	<i>AKNA</i>	syn	p.Glu755Glu	-0.007 (0.001)	9.51E-09	41.414
	9	117124731	G	A	rs3748176	<i>AKNA</i>	mis	p.Pro624Leu	-0.007 (0.001)	4.31E-09	41.412
	10	101595996	T	A	rs17222723	<i>ABCC2</i>	mis	p.Val1188Glu	-0.015 (0.003)	2.97E-08	41.414
	10	101606861	G	T	rs1137968	<i>ABCC2</i>	syn	p.Val1430Val	-0.015 (0.003)	2.71E-08	41.414
	10	101610533	C	T	rs8187707	<i>ABCC2</i>	syn	p.His1496His	-0.015 (0.003)	2.77E-08	41.414
	10	101611294	G	A	rs8187710	<i>ABCC2</i>	mis	p.Cys1515Tyr	-0.015 (0.003)	2.15E-08	41.414
	10	101912064	T	C	rs2862954	<i>ERLNI</i>	mis	p.Ile291Val	-0.012 (0.001)	2.43E-21	40.834
	10	101977883	C	T	rs2230804	<i>CHUK</i>	mis	p.Val268Ile	-0.009 (0.001)	1.93E-13	41.414
	10	113917085	T	A	rs2254537	<i>GPAM</i>	syn	p.Pro681Pro	-0.008 (0.001)	4.61E-10	41.414
	10	113940329	T	C	rs2792751	<i>GPAM</i>	mis	p.Ile43Val	-0.008 (0.001)	2.54E-10	41.412
	14	94844947	C	T	rs28929474	<i>SERPINA1</i>	mis	p.Glu366Lys	0.042 (0.005)	9.28E-21	41.414
	19	19379549	C	T	rs58542926	<i>TM6SF2</i>	mis	p.Glu167Lys	0.014 (0.002)	4.76E-09	41.413
	22	44324727	C	G	rs738409	<i>PNPLA3</i>	mis	p.Ile148Met	0.023 (0.002)	1.34E-50	41.414
	22	44324730	C	T	rs738408	<i>PNPLA3</i>	syn	p.Pro149Pro	0.023 (0.002)	1.11E-50	41.414

## 【 0 4 8 2 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

											GHS ディスカバリーコホート		
形質	Chr	BP	Ref	Alt	RSID	遺伝子	A_m	AA 換換	ペータ (SE)	P	N		
	22	44342116	A	G	rs2294918	<i>PNPLA3</i>	mis	p.Lys434Glu	0.007 (0.001)	8.26E-08	41,412		
	22	44368122	A	G	rs3761472	<i>SAMM50</i>	mis	p.Asp110Gly	0.019 (0.002)	8.85E-30	41,413		
	22	44395451	T	C	rs1007863	<i>PARVB</i>	mis	p.Trp37Arg	0.011 (0.001)	7.98E-16	41,414		
AST	4	88231392	T	TA	rs72613567	<i>HSD17B13</i>	spl		-0.005 (0.001)	6.24E-10	40,753		
	10	18242311	A	G	rs10764176	<i>SLC39A12</i>	mis	p.Ser36Gly	-0.006 (0.001)	1.09E-10	40,753		
	10	101157378	CGTT	C		<i>GOT1</i>	inf	p.Asn389del	-0.221 (0.024)	1.96E-20	40,753		
	10	101165533	G	C	rs374966349	<i>GOT1</i>	mis	p.Gln208Glu	0.271 (0.027)	2.43E-24	40,753		
	10	101912064	T	C	rs2862954	<i>ERLIN1</i>	mis	p.Ile291Val	-0.005 (0.001)	4.82E-09	40,753		
	11	22271870	A	T	rs7481951	<i>ANOS</i>	mis	p.Leu322Phe	0.004 (0.001)	9.61E-08	40,722		
	14	94844947	C	T	rs28929474	<i>SERPINA1</i>	mis	p.Glu366Lys	0.027 (0.003)	2.44E-20	40,753		
	19	19379549	C	T	rs58542926	<i>TM6SF2</i>	mis	p.Glu167Lys	0.008 (0.002)	6.54E-08	40,192		
	22	44324727	C	G	rs738409	<i>PNPLA3</i>	mis	p.Ile148Met	0.014 (0.001)	8.31E-46	40,753		
	22	44324730	C	T	rs738408	<i>PNPLA3</i>	syn	p.Pro149Pro	0.014 (0.001)	8.93E-46	40,753		
	22	44368122	A	G	rs3761472	<i>SAMM50</i>	mis	p.Asp110Gly	0.011 (0.001)	1.22E-22	40,752		
	22	44395451	T	C	rs1007863	<i>PARVB</i>	Mis	p.Trp37Arg	0.006 (0.001)	1.31E-13	40,753		

【0 4 8 3】

10

20

40

50

30

【表8-3】

表8(続き)

形質	Chr	BP	GHS 肥満外科手術コホート			Dallas Heart Study			U. Penn		
			ベータ(SE)	P	N	ベータ(SE)	P	N	ベータ(SE)	P	N
ALT	-	220970028	0.005 (0.005)	3.10E-01	2475	0.011 (0.008)	1.76E-01	1357	0.007 (0.004)	1.02E-01	6158
	7	88231392	-0.010 (0.005)	5.57E-02	2475	-0.016 (0.008)	6.60E-02	1357	-0.013 (0.004)	1.33E-03	6158
	8	144997604	-0.492 (0.165)	2.84E-03	2475	NA (NA)	NA	NA	-0.051 (0.072)	4.79E-01	6158
	8	145008502	-0.161 (0.165)	3.29E-01	2475	NA (NA)	NA	NA	-0.247 (0.143)	8.48E-02	6158
	8	145692918	-0.009 (0.020)	6.48E-01	2475	0.032 (0.036)	3.76E-01	1356	-0.053 (0.018)	3.72E-03	6158
	8	145730072	-0.189 (0.165)	2.50E-01	2475	NA (NA)	NA	NA	-0.298 (0.101)	3.26E-03	6158
	8	145730161	-0.341 (0.074)	3.64E-06	2475	NA (NA)	NA	NA	-0.143 (0.054)	8.50E-03	6158
	8	145730221	-0.009 (0.020)	6.45E-01	2475	0.028 (0.036)	4.37E-01	1357	-0.060 (0.018)	5.60E-04	6158
	8	145731636	-0.314 (0.165)	5.71E-02	2475	-0.317 (0.140)	2.35E-02	1356	-0.148 (0.143)	3.04E-01	6157
	8	145732114	-0.273 (0.048)	9.83E-09	2474	-0.240 (0.075)	1.36E-03	1357	-0.197 (0.041)	1.31E-06	6157
	8	145732151	-0.115 (0.058)	4.82E-02	2475	-0.106 (0.099)	2.86E-01	1356	-0.049 (0.041)	2.27E-01	6157
	8	145732180	-0.273 (0.050)	4.26E-08	2475	-0.191 (0.070)	6.58E-03	1357	-0.197 (0.041)	1.31E-06	6158
	8	145732305	-0.161 (0.165)	3.29E-01	2475	NA (NA)	NA	NA	-0.509 (0.203)	1.21E-02	6158
	8	145748532	-0.161 (0.165)	3.29E-01	2475	NA (NA)	NA	NA	-0.307 (0.143)	3.21E-02	6158
	9	117122202	-0.004 (0.005)	4.09E-01	2475	0.004 (0.008)	6.18E-01	1357	-0.007 (0.004)	5.29E-02	6158
	9	117124731	-0.004 (0.005)	3.90E-01	2475	0.003 (0.008)	7.33E-01	1356	-0.007 (0.004)	4.24E-02	6158
	10	101595996	-0.002 (0.010)	8.01E-01	2475	-0.007 (0.017)	6.88E-01	1357	-0.017 (0.007)	1.55E-02	6158
	10	101606861	-0.003 (0.010)	7.74E-01	2475	-0.008 (0.017)	6.28E-01	1357	-0.017 (0.007)	1.70E-02	6158
	10	101610533	-0.003 (0.010)	7.93E-01	2475	-0.008 (0.017)	6.28E-01	1357	-0.017 (0.007)	1.76E-02	6158
	10	101611294	-0.001 (0.010)	9.11E-01	2475	-0.010 (0.017)	5.40E-01	1357	-0.016 (0.007)	2.77E-02	6158
	10	101912064	-0.010 (0.005)	2.91E-02	2475	-0.006 (0.007)	4.02E-01	1356	-0.009 (0.004)	2.06E-02	6158
	10	101977883	-0.006 (0.005)	2.05E-01	2475	0.0001 (0.008)	9.94E-01	1357	-0.011 (0.004)	3.91E-03	6158
	10	113917085	-0.003 (0.005)	5.80E-01	2475	-0.013 (0.008)	1.15E-01	1357	-0.008 (0.004)	5.12E-02	6158
	10	113940329	-0.003 (0.005)	5.61E-01	2475	-0.013 (0.008)	1.33E-01	1357	-0.008 (0.004)	4.77E-02	6158
	14	94844947	0.035 (0.020)	7.97E-02	2475	0.034 (0.032)	2.92E-01	1357	0.054 (0.013)	1.63E-05	6158
	19	19379549	0.040 (0.010)	2.40E-05	2475	0.024 (0.014)	9.50E-02	1357	0.013 (0.008)	7.51E-02	6158
	22	44324727	0.019 (0.006)	5.54E-04	2475	0.006 (0.009)	5.43E-01	1357	0.016 (0.004)	2.05E-04	6158
	22	44324730	0.019 (0.006)	5.51E-04	2475	0.006 (0.009)	5.43E-01	1357	0.016 (0.004)	2.14E-04	6158
	22	44342116	0.001 (0.005)	7.77E-01	2475	0.005 (0.008)	5.18E-01	1357	0.005 (0.004)	2.16E-01	6158
	22	44368122	0.009 (0.006)	1.66E-01	2475	-0.001 (0.01)	9.37E-01	1357	0.018 (0.005)	4.02E-04	6158
	22	44395451	0.003 (0.005)	5.22E-01	2475	0.008 (0.008)	3.13E-01	1357	0.009 (0.004)	2.50E-02	6158
AST	7	88231392	-0.010 (0.003)	3.12E-03	2469	-0.012 (0.006)	5.32E-02	1357	-0.007 (0.004)	5.56E-02	6166
	10	18242311	-0.010 (0.003)	2.91E-03	2469	-0.003 (0.006)	5.80E-01	1357	-0.009 (0.004)	1.03E-02	6166
	10	101157378	-0.205 (0.062)	8.57E-04	2469	NA (NA)	NA	NA	-0.243 (0.088)	5.97E-03	6165
	10	101165533	NA (NA)	NA	NA	NA (NA)	NA	NA	0.339 (0.079)	1.85E-05	6166
	10	101912064	-0.004 (0.003)	1.54E-01	2469	-0.007 (0.006)	2.21E-01	1357	-0.004 (0.003)	1.94E-01	6166
	11	22271870	-0.001 (0.003)	7.85E-01	2466	0.006 (0.006)	2.85E-01	1357	-0.002 (0.003)	5.46E-01	6165
	14	94844947	0.023 (0.013)	7.79E-02	2469	0.044 (0.024)	6.98E-02	1357	0.055 (0.011)	4.01E-07	6166
	19	19379549	0.023 (0.006)	1.99E-04	2469	0.010 (0.011)	3.42E-01	1356	0.004 (0.007)	5.94E-01	6166
	22	44324727	0.014 (0.004)	1.27E-04	2469	0.004 (0.007)	5.44E-01	1357	0.015 (0.004)	4.87E-05	6166
	22	44324730	0.014 (0.004)	1.32E-04	2469	0.004 (0.007)	5.44E-01	1357	0.015 (0.004)	4.96E-05	6166
	22	44368122	0.008 (0.004)	6.03E-02	2469	-0.001 (0.008)	9.45E-01	1357	0.016 (0.004)	2.64E-04	6166
	22	44395451	0.003 (0.003)	4.12E-01	2469	0.006 (0.006)	2.95E-01	1357	0.009 (0.003)	6.17E-03	6166

10

20

30

40

50

【表 8 - 4】

表8(続き)

形質	Chr	BP	**再現メタ分析(N=3)		***結合メタ分析 (N = 4)	
			ペータ(SE)	P	ペータ(SE)	P
ALT	-	220970028	0.007 (0.003)	2.31E-02	0.008 (0.001)	3.38E-09
	+	88231392	-0.013 (0.003)	<b>*3.85E-05</b>	-0.010 (0.001)	1.17E-15
	$\infty$	144997604	-0.121 (0.066)	6.56E-02	-0.155 (0.025)	2.68E-10
	$\infty$	145008502	-0.210 (0.108)	5.23E-02	-0.264 (0.031)	5.54E-18
	$\infty$	145692918	-0.025 (0.013)	4.69E-02	-0.032 (0.005)	2.25E-12
	$\infty$	145730072	-0.268 (0.086)	1.88E-03	-0.308 (0.033)	2.79E-20
	$\infty$	145730161	-0.213 (0.044)	<b>*1.14E-06</b>	-0.223 (0.013)	4.49E-64
	$\infty$	145730221	-0.031 (0.013)	1.36E-02	-0.033 (0.005)	1.92E-12
	$\infty$	145731636	-0.256 (0.086)	2.79E-03	-0.237 (0.029)	1.94E-16
	$\infty$	145732114	-0.231 (0.029)	<b>*7.24E-16</b>	-0.225 (0.012)	6.06E-78
	$\infty$	145732151	-0.074 (0.032)	1.88E-02	-0.076 (0.012)	7.03E-11
	$\infty$	145732180	-0.221 (0.029)	<b>*1.41E-14</b>	-0.224 (0.012)	1.04E-77
	$\infty$	145732305	-0.299 (0.128)	1.93E-02	-0.273 (0.030)	6.44E-20
	$\infty$	145748532	-0.244 (0.108)	2.40E-02	-0.189 (0.027)	2.93E-12
	$\diamond$	117122202	-0.005 (0.003)	8.42E-02	-0.007 (0.001)	3.08E-09
	$\diamond$	117124731	-0.005 (0.003)	6.15E-02	-0.007 (0.001)	1.00E-09
	$\ominus$	101595996	-0.012 (0.005)	3.43E-02	-0.014 (0.002)	3.44E-09
	$\ominus$	101606861	-0.012 (0.005)	3.25E-02	-0.014 (0.002)	2.99E-09
	$\ominus$	101610533	-0.012 (0.005)	3.43E-02	-0.014 (0.002)	3.23E-09
	$\ominus$	101611294	-0.011 (0.005)	5.21E-02	-0.014 (0.002)	4.09E-09
	$\ominus$	101912064	-0.009 (0.003)	<b>*1.14E-03</b>	-0.011 (0.001)	1.76E-23
	$\ominus$	101977883	-0.008 (0.003)	4.33E-03	-0.009 (0.001)	3.59E-15
	$\ominus$	113917085	-0.007 (0.003)	2.07E-02	-0.008 (0.001)	3.28E-11
	$\ominus$	113940329	-0.007 (0.003)	2.00E-02	-0.008 (0.001)	1.77E-11
	$\pm$	94844947	0.047 (0.010)	<b>*2.82E-06</b>	0.043 (0.004)	1.59E-25
	$\pm$	19379549	0.024 (0.006)	<b>*1.37E-05</b>	0.016 (0.002)	1.15E-12
	$\pm$	44324727	0.016 (0.003)	<b>*7.45E-07</b>	0.021 (0.001)	3.55E-55

10

20

30

40

50

【表8-5】

			**再現メタ分析(N=3)		***結合メタ分析(N=4)	
形質	Chr	BP	ベータ(SE)	P	ベータ(SE)	P
AST	22	44324730	0.016 (0.003)	<b>*7.73E-07</b>	0.021 (0.001)	3.10E-55
	22	44342116	0.004 (0.003)	1.91E-01	0.006 (0.001)	6.24E-08
	22	44368122	0.012 (0.004)	<b>*7.69E-04</b>	0.018 (0.002)	1.08E-31
	22	44395451	0.007 (0.003)	1.78E-02	0.010 (0.001)	1.16E-16
	4	88231392	-0.009 (0.002)	<b>*8.38E-05</b>	-0.006 (0.001)	6.82E-13
	10	18242311	-0.009 (0.002)	<b>*1.16E-04</b>	-0.006 (0.001)	1.10E-13
	10	101157378	-0.218 (0.051)	<b>*1.66E-05</b>	-0.220 (0.022)	1.68E-24
	10	101165533	0.339 (0.079)	<b>*1.85E-05</b>	0.278 (0.025)	3.25E-28
	10	101912064	-0.005 (0.002)	2.51E-02	-0.005 (0.001)	3.68E-10
	11	22271870	0.000 (0.002)	8.43E-01	0.004 (0.001)	1.13E-06
	14	94844947	0.042 (0.008)	<b>*9.54E-08</b>	0.029 (0.003)	6.71E-26
	19	19379549	0.014 (0.004)	<b>*1.20E-03</b>	0.009 (0.002)	5.92E-10
	22	44324727	0.013 (0.002)	<b>*5.51E-08</b>	0.014 (0.001)	3.14E-52
	22	44324730	0.013 (0.002)	<b>*5.81E-08</b>	0.014 (0.001)	3.55E-52
	22	44368122	0.010 (0.003)	<b>*3.40E-04</b>	0.011 (0.001)	1.91E-25
	22	44395451	0.006 (0.002)	7.34E-03	0.006 (0.001)	3.62E-15

\*P<1.43×10<sup>-3</sup> のボンフェロー二有意性閾値を満たす P 値を示す。

\*\*再現メタ分析は 3 つの再現コホート:GHS 肥満外科手術コホート、Dallas Heart Study、および Penn Medicine Biobank を含む。

\*\*\*結合メタ分析はディスカバリーコホートと 3 つの再現コホート:GHS ディスカバリーコホート、GHS 肥満外科手術コホート、Dallas Heart Study、および Penn Medicine Biobank を含む。

省略形:AAF、代替対立遺伝子頻度:Alt、代替対立遺伝子:ALT、アラニンアミノトランスフェラーゼ:AST、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ:Ref、参照対立遺伝子:SE、標準誤差:ann、注釈:mis、ミスセンス:syn、同義:spl、スプライスドナー:stop、停止獲得:fs、フレームシフト:inf、インフレームインデル。

#### 【0484】

エクソンバリアントと、慢性肝疾患の臨床診断との関連

次に、本発明者らは、ディスカバリーコホートおよび再現コホートにおいて見出された 9 個の遺伝子中の 13 個のトランスアミナーゼ関連バリアントと、アルコール性および非アルコール性（非ウイルス性）肝疾患を含む慢性肝疾患、ならびに最も進行した形態の慢性肝疾患：アルコール性肝硬変、非アルコール性肝硬変、および肝細胞癌（HCC）との関係を分析した。試験した 13 個のバリアントに関する P < 1.92 × 10<sup>-3</sup> のボンフェロー二の有意性閾値を使用して、本発明者らは、5 個の遺伝子（HSD17B13、SERPINA1、TM6SF2、PNPLA3、およびSAMM50）における 6 個のバリ

10

20

30

40

50

アントと、慢性肝疾患表現型との間の有意な関連を見出した（表9）。S E R P I N A 1 、T M 6 S F 2 、P N P L A 3 、およびS A M M 5 0 の関連は、以前に報告された関連を確認するものである。ディスカバリーコホートにおいて、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A は、対立遺伝子用量依存的様式で、アルコール性と非アルコール性肝疾患の両方のE H R 由来カテゴリーのより低いオッズと関連していた（図2 A）：アルコール性肝疾患の全カテゴリー、ヘテロ接合体オッズ比（O R h e t ）（95%信頼区間）0 . 5 8 ( 0 . 4 2 ~ 0 . 8 0 ) 、ホモ接合体O R ( O R h o m ) 0 . 4 7 ( 0 . 2 3 ~ 0 . 9 7 ) 、対立遺伝子O R ( O R a l l e l i c ) 0 . 6 2 ( 0 . 4 8 ~ 0 . 8 1 ) 、P = 1 . 8 × 1 0 - 4 ；非アルコール性肝疾患の全カテゴリー、O R h e t 0 . 8 3 ( 0 . 7 5 ~ 0 . 9 2 ) 、O R h o m 0 . 7 0 ( 0 . 5 7 ~ 0 . 8 7 ) 、O R a l l e l i c 0 . 8 4 ( 0 . 7 8 ~ 0 . 9 1 ) 、P = 1 . 3 × 1 0 - 5 。H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A はまた、アルコール性および非アルコール性肝硬変のより低いオッズとも関連し、ヘテロ接合体およびホモ接合体について、それぞれ、アルコール性肝硬変の4 2 %および7 3 %低いオッズ（O R h e t 0 . 5 8 ( 0 . 3 9 ~ 0 . 8 6 ) 、O R h o m 0 . 2 7 ( 0 . 0 9 ~ 0 . 8 5 ) 、O R a l l e l i c 0 . 5 6 ( 0 . 4 1 ~ 0 . 7 8 ) 、P = 3 . 4 × 1 0 - 4 ）であり、ヘテロ接合体およびホモ接合体について、それぞれ、非アルコール性肝硬変の2 6 %および4 9 %低いオッズ（O R h e t 0 . 7 4 ( 0 . 6 0 ~ 0 . 9 3 ) 、O R h o m 0 . 5 1 ( 0 . 3 1 ~ 0 . 8 5 ) 、O R a l l e l i c 0 . 7 4 ( 0 . 6 2 ~ 0 . 8 8 ) 、P = 4 . 5 × 1 0 - 4 ）であった。H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A はまた、H C C のより低いオッズと名目上関連していた。

## 【0485】

本発明者らは、多民族のD a l l a s L i v e r S t u d y ( D L S ) およびD a l l a s P e d i a t r i c L i v e r S t u d y ( D P L S 、表10) におけるこれらの知見を確認し、拡張しようとした。D L Sにおいて、T A 対立遺伝子は、対立遺伝子用量依存的様式で任意の肝疾患のより低いオッズと関連していた（O R h e t 0 . 7 4 ( 0 . 5 7 ~ 0 . 9 7 ) 、O R h o m 0 . 4 1 ( 0 . 2 1 ~ 0 . 8 3 ) 、O R a l l e l i c 0 . 7 0 ( 0 . 5 ~ 0 . 8 8 ) 、P = 1 . 8 × 1 0 - 3 、図8）。同様の効果は、進行した、肝硬変型のアルコール性（O R a l l e l i c 0 . 7 2 ( 0 . 5 3 ~ 0 . 9 9 ) 、P = 4 . 4 × 1 0 - 2 ）および非アルコール性（O R a l l e l i c 0 . 6 5 ( 0 . 4 0 ~ 1 . 0 7 ) 、P = 9 . 0 × 1 0 - 2 ）肝疾患との保護的関連を含む、E H R 由来肝疾患サブタイプにわたって観察された。自己報告された民族によってグループ分けされた個体のサブセット分析において、肝疾患との関連は、ヒスパニック系米国人において有意であった（n = 3 2 6 の症例および7 2 2 の対照、O R a l l e l i c 0 . 5 1 ( 0 . 3 5 ~ 0 . 7 4 ) 、P = 4 . 0 × 1 0 - 4 ）；統計的有意性を達成しなかった、同様の数的傾向は、D L S のアフリカ系米国人（n = 3 3 の症例および2 , 2 9 1 の対照、O R a l l e l i c 0 . 7 4 ( 0 . 2 5 ~ 2 . 4 7 ) 、P = 0 . 6 7 ）および欧州系米国人（n = 1 5 8 の症例および1 , 2 6 6 の対照、O R a l l e l i c 0 . 8 7 ( 0 . 6 5 ~ 1 . 1 5 ) 、P = 0 . 3 2 ）のサブセットにおいても見られた。ヒスパニック系米国人の小児肝疾患患者および肥満対照の別の研究である、D P L Sにおいては、T A 対立遺伝子はまた、肝疾患のより低いオッズと関連していた（O R a l l e l i c 0 . 6 1 ( 0 . 3 7 ~ 0 . 9 9 ) 、P = 4 . 6 × 1 0 - 2 ）。かくして、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A は、3つの独立した集団中の成人および小児において、肝硬変を含む複数の形態の慢性肝疾患のオッズの低下と関連していた。

## 【0486】

10

20

30

40

50

【表9-1】

表9.ディスカバリーコホートにおける12のエクソームワイドな有意かつ再現性の単一ヌクレオチドバリアントと肝疾患表現型との関連

CHR:BP:Ref:Alt	遺伝子	rsID	アルコール性肝疾患		アルコール性肝硬変	
			OR (95% CI)	P 値	OR (95% CI)	P 値
4:88231392:T:TA	<i>HSD17B13</i>	rs72613567	0.62 (0.48-0.81)	*1.82E-04	0.56 (0.41-0.78)	*3.35E-04
8:145730161:C:T	<i>GPT</i>	rs201815297	3.83 (1.05-13.94)	8.88E-02	6.33 (1.71-23.43)	2.88E-02
8:145732114:G:C	<i>GPT</i>	rs141505249	0.77 (0.06-10.73)	8.43E-01	1.13 (0.08-15.39)	9.30E-01
8:145732180:G:C	<i>GPT</i>	rs147998249	0.73 (0.05-11.76)	8.17E-01	1.07 (0.07-17.16)	9.60E-01
10:18242311:A:G	<i>SLC39A12</i>	rs10764176	0.85 (0.68-1.07)	1.64E-01	0.92 (0.70-1.22)	5.80E-01
10:101157378:CGTT:C	<i>GOT1</i>		4.60 (0.25-86.41)	3.93E-01	7.11 (0.38-133.19)	3.00E-01
10:101165533:G:C	<i>GOT1</i>	rs374966349	2.20 (0.13-37.68)	6.24E-01	3.47 (0.20-59.04)	4.70E-01
14:94844947:C:T	<i>SERPINA1</i>	rs28929474	2.49 (1.49-4.17)	2.30E-03	3.35 (1.93-5.83)	*3.01E-04
19:19379549:C:T	<i>TM6SF2</i>	rs58542926	1.47 (1.06-2.04)	2.76E-02	1.35 (0.89-2.04)	1.80E-01
22:44324727:C:G	<i>PNPLA3</i>	rs738409	1.76 (1.43-2.18)	*4.98E-07	2.07 (1.60-2.67)	*1.08E-07
22:44324730:C:T	<i>PNPLA3</i>	rs738408	1.77 (1.43-2.18)	*4.70E-07	2.07 (1.61-2.67)	*1.03E-07
22:44368122:A:G	<i>SAMM50</i>	rs3761472	1.90 (1.52-2.38)	*1.36E-07	2.28 (1.75-2.98)	*1.83E-08

\*P<2.08×10<sup>-3</sup> のボンフェローニ有意性閾値を満たす P 値を示す。

【0487】

10

20

30

40

50

【表9-2】

表9(続き)

CHR:BP:Ref:Alt	遺伝子	rsID	非アルコール性肝疾患		非アルコール性肝硬変		肝細胞癌	
			OR (95% CI)	P 値	OR (95% CI)	P 値	OR (95% CI)	P 値
4:88231392:T:TA	<i>HSD17B13</i>	rs72613567	0.84 (0.78-0.91)	*1.31E-05	0.74 (0.62-0.88)	*4.48E-04	0.67 (0.45-1.00)	4.66E-02
8:145730161:C:T	<i>GPT</i>	rs201815297	0.23 (0.04-1.14)	1.86E-02	1.25 (0.24-6.38)	7.98E-01	3.66 (0.70-19.01)	2.01E-01
8:145732114:G:C	<i>GPT</i>	rs141505249	1.02 (0.49-2.11)	9.70E-01	0.36 (0.02-5.37)	3.82E-01	1.84 (0.15-23.25)	6.88E-01
8:145732180:G:C	<i>GPT</i>	rs147998249	1.03 (0.49-2.17)	9.30E-01	0.34 (0.02-5.59)	3.67E-01	1.74 (0.11-27.05)	7.21E-01
10:18242311:A:G	<i>SLC39A12</i>	rs10764176	0.92 (0.86-0.99)	3.43E-02	1.03 (0.88-1.21)	7.15E-01	1.29 (0.93-1.79)	1.37E-01
10:101157378:CGTT:C	<i>GOT1</i>		2.37 (0.61-9.27)	2.50E-01	8.27 (1.44-47.49)	5.92E-02	9.81 (0.52-183.54)	2.43E-01
10:101165533:G:C	<i>GOT1</i>	rs374966349	1.63 (0.53-4.96)	4.20E-01	1.17 (0.07-20.09)	9.13E-01	5.37 (0.32-91.12)	3.55E-01
14:94844947:C:T	<i>SERPINA1</i>	rs28929474	1.50 (1.21-1.87)	*5.29E-04	2.99 (2.11-4.24)	*9.08E-08	1.86 (0.74-4.67)	2.40E-01
19:19379549:C:T	<i>TM6SF2</i>	rs58542926	1.36 (1.21-1.52)	*2.42E-07	1.64 (1.31-2.05)	*6.04E-05	1.93 (1.22-3.04)	1.08E-02
22:44324727:C:G	<i>PNPLA3</i>	rs738409	1.65 (1.54-1.78)	*1.31E-41	2.05 (1.76-2.38)	*1.70E-19	2.20 (1.60-3.02)	*5.59E-06
22:44324730:C:T	<i>PNPLA3</i>	rs738408	1.65 (1.54-1.78)	*1.42E-41	2.05 (1.77-2.38)	*1.45E-19	2.20 (1.60-3.03)	*5.41E-06
22:44368122:A:G	<i>SAMM50</i>	rs3761472	1.52 (1.41-1.65)	*7.33E-24	1.86 (1.58-2.19)	*1.81E-12	1.66 (1.16-2.39)	1.05E-02

【0488】

10

20

30

40

50

## 【表10】

表10. Dallas Liver StudyおよびPediatric Liver Studyに由来するジェノタイピングされた多民族症例および対照の人口および臨床特徴

特徴	Dallas Liver Study 症例 (N = 517)	Dallas Liver Study 対照 (N = 4,279)	Dallas Pediatric Liver Study 症例 (N = 203)	Dallas Pediatric Liver Study 対照 (N = 244)
年齢(歳)-中央値(IQR)	55 (48 - 60)	44 (36 - 53)	12 (10 - 15)	12 (11 - 14)
女性-数(%)	277 (54)	2,494 (58)	65 (32)	126 (52)
体格指数-中央値(IQR)	30 (27 - 35)	30 (26 - 35)	30 (27 - 34)	31 (28 - 35)
自己報告された民族性				
アフリカ系米国人	33 (6)	2,291 (54)	-	-
欧州系米国人	158 (31)	1,266 (30)	-	-
ヒスパニック系米国人	326 (63)	722 (17)	203 (100)	244 (100)
肝疾患の存在(ICD-9 コードによる)-N(%)				
アルコール性肝疾患	223 (43)	-	-	-
アルコール性肝硬変	215 (42)	-	-	-
非アルコール性、非ウイルス性肝疾患	212 (20)	-	-	-
非アルコール性肝硬変	100 (19)	-	-	-
肝細胞癌	44 (9)	-	-	-
肝疾患なし	-	4,279 (100)	-	-244 (100)

## 【0489】

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A と肝臓病理との関連

N A F L D は、有意な炎症の証拠がない肝臓脂肪蓄積（単純脂肪肝）から、より臨床的に影響のあるN A S Hまでの疾患スペクトラムを記載する。H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A と、E H R 由来肝疾患診断コードとの関連を確認するために、および脂肪症からN A S Hへの組織病理学的進行との関連をさらに理解するために、本発明者らは、G H S 肥満外科手術コホートにおける関連の試験を実施した。肥満外科手術の時点で肝臓生検によって評価された全エクソーム配列決定された2,391人の個体のこのコホートにおいて、合計555人（23%）の個体が脂肪症、脂肪性肝炎、または線維症の証拠がなく（「正常」）、830人（35%）が単純脂肪肝を有し、1006人（42%）がN A S H を有していた。遺伝子型によって正常な肝臓、単純脂肪肝、およびN A S H の有病率を比較する場合、それぞれのT A 対立遺伝子に関して、正常な肝臓の有病率は遺伝子型によって異なると考えられる（T / T、T / T A、およびT A / T A 保因者について、それぞれ、23%、24%、および23%、割合における傾向に関するカイ二乗検定によるP = 0.5）が、N A S H の有病率は減少し（T / T、T / T A、およびT A / T A 保因者について、それぞれ、45%、40%、および31%、P = 1.6 × 10 - 4）、単純脂肪肝の有病率は増加する（T / T、T / T A、およびT A / T A 保因者について、それぞれ、33%、35%、および47%、P = 1.1 × 10 - 3）ことが観察された（図9）。脂肪症を有する個体のうち、T A 対立遺伝子は、対立遺伝子用量依存的様式で、単純脂肪肝と比較して、N A S H と線維症の両方の統計的に有意に低いオッズと関連していた（N A S H については、O R a l l e l i c 0.77 (0.66 ~ 0.90)、P = 6.5 × 10 - 4；線維症については、O R a l l e l i c 0.74 (0.62 ~ 0.88)、P = 4.15 × 10 - 4；図2B）。要するに、これらのデータは、単純脂肪肝から、より進行した段階のN A S H および線維症へのN A F L D の進行を媒介する際のH S D 1 7 B 1 3 の役割を示唆する。

## 【0490】

H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A と、臨床量的形質および診断との関連

10

20

30

40

50

H S D 1 7 B 1 3 スプライスバリエントの臨床結果をより包括的に検査するために、本発明者らは、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A と、4 0 5 の量的 E H R 由来身体計測値、バイタルサイン、検査値、心電図、心エコー図、および骨密度測定値、ならびにまた、3 , 1 6 8 の E H R 由来臨床診断との関連のフェノムワイド研究を実施した。それぞれ、量的臨床測定値および臨床診断との関連に関する  $1 . 2 3 \times 1 0 - 4$  および  $1 . 5 8 \times 1 0 - 5$  のポンフェローニの有意性閾値を使用して、本発明者らは、肝臓トランスアミナーゼとの関連に加えて、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A 対立遺伝子と、より高い血小板数との統計的に有意な関連を同定した（表 11）。慢性肝疾患以外の臨床診断との統計的に有意な関連はなかった（OR (95% CI) = 0 . 8 8 (0 . 8 4 ~ 0 . 9 3) ; P = 9 . 1 4  $\times 1 0 - 6$  ; A A F = 0 . 2 6 3 ; N 合計症例数 = 4 0 3 1 、T / T = 2 3 3 1 、T / T A = 1 4 4 9 、T A / T A = 2 5 1 ; N 合計対照数 = 3 5 7 0 1 、T / T = 1 9 2 3 8 、T / T A = 1 3 9 8 4 、T A / T A = 2 4 7 9 ）。

【0 4 9 1】

【表 11】

表11. HSD17B13 rs72613567:TAと量的臨床測定値との関連のフェノムワイド研究

表現型	効果	SE	P	AAF	N			
					合計	T/T	T/TA	TA/TA
アラニンアミノトランスフェラーゼ中央値:調整(残存 log)	-0.009	0.001	<b><i>1.74E-12</i></b>	0.264	44038	23868	17115	3055
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ中央値:調整(残存 log)	-0.006	0.001	<b><i>2.75E-11</i></b>	0.264	43370	23493	16851	3026
アラニンアミノトランスフェラーゼ最大値:調整(残存 log)	-0.013	0.002	<b><i>1.39E-09</i></b>	0.264	43905	23797	17065	3043
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ最大値:調整(残存 log)	-0.010	0.002	<b><i>8.73E-09</i></b>	0.264	42733	23145	16609	2979
血小板中央値:調整(残存 log)	0.004	0.001	<b><i>1.44E-08</i></b>	0.264	46182	25020	17944	3218
アラニンアミノトランスフェラーゼ最小値:調整(残存 log)	-0.008	0.002	<b><i>2.47E-07</i></b>	0.264	44029	23864	17111	3054
血小板最小値:調整(残存)	1.919	0.443	<b><i>1.47E-05</i></b>	0.264	46181	25020	17943	3218
血小板最大値:調整(残存 log)	0.004	0.001	<b><i>3.03E-05</i></b>	0.264	46165	25014	17936	3215
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ最小値:調整(残存 log)	-0.004	0.001	<b><i>5.00E-05</i></b>	0.264	43327	23471	16831	3025

太字かつ斜体は、 $P < 1.23 \times 10^{-4}$  のポンフェローニ有意性閾値を満たす P 値を示す。

省略形:AAF、代替対立遺伝子頻度;SE、標準誤差。

【0 4 9 2】

H S D 1 7 B 1 3 m R N A および H S D 1 7 B 1 3 タンパク質発現に対する H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A の効果

本発明者らは次に、遺伝子の公知および新規の転写産物の発現に対する H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 : T A 対立遺伝子の効果を検査した。本発明者らは、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 スプライスバリエントの 2 2 の T / T ホモ接合体、3 0 の T / T A ヘテロ接合体、および 1 7 の T A / T A ホモ接合体保因者に由来する組織学的に正常な肝臓試料における H S D 1 7 B 1 3 m R N A 発現を評価するために、R N A 配列決定を使用した。2 つの公知の H S D 1 7 B 1 3 転写産物 A および B に加えて、2 つの新規転写産物が同定された：エクソン 6 を欠く転写産物 C 、およびタンパク質の早期トランケーションをもたらすと予測される、エクソン 6 の 3' 末端にグアニンヌクレオチドの挿入を含有する転写産物 D 。4 つのさらなる転写産物 (E ~ H ) は、非常に低レベルで発現された（図 3 A ~ 3 D および 6 A ~ 6 D ）。転写産物を、R T - P C R および S a n g e r 配列決定によって検証した。また、転写産物 D を、ロングリード c D N A 配列決定を使用して検証した。全ての同定された H S D 1 7 B 1 3 アイソフォーム (A ~ H ) のタンパク質配列アラインメントを、図 7 A および 7 B に示す。これらの転写産物の発現レベルは、H S D 1 7 B 1 3 r s 7 2 6 1 3 5 6 7 遺伝子型に応じて変化した：それぞれの T A 対立遺伝子について、対立遺伝子用量依存的様式で、転写産物 A および B のレベルは減少したが、転写産物 C および D のレベルは増加した（図 3 A ~ 3 D ）。完全長 3 0 0 アミノ酸タンパク質をコードする転写産物 A は、T / T ホモ接合体における優勢な転写産物であったが、早期にトランケートされるタンパク質をコードする転写産物 D は、T A / T A ホモ接合体における優勢な転写産物であった（図 7 A および 7 B ）。

10

20

30

40

50

合体における優勢な転写産物であった。ヒト肝臓生検組織中で、トランケートされたアイソフォームDタンパク質は、ヘテロ接合体およびT A / T A ホモ接合体中に最小限に存在し、アイソフォームAタンパク質の存在量は、対立遺伝子用量依存的様式で減少した（図10Bおよび10C）。HEK293細胞中でのアイソフォームAおよびDの異種発現は、mRNA発現と比較してアイソフォームDの存在量の減少を示したが、これは、アイソフォームAと比較した場合、アイソフォームDの不安定性を示唆している（図11A～11C）。これらのデータは、ヒト肝臓における発現の実質的な減少と共に、トランケート型のタンパク質の合成をもたらす、HSD17B13 rs72613567の選択的mRNAスプライシングと一致している。

## 【0493】

10

## ヒト肝臓細胞中でのHSD17B13の発現

HSD17B13は、主に肝臓中で発現され（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Liuら、Acta Biochim. Pol.、2007年、54巻、213～218頁）、そこでそれは脂肪性肝疾患の発症における役割と一致して、脂肪滴に局在化する（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Suら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、2014年、111巻、11437～11442頁、doi:10.1073/pnas.1410741111）。本発明者らは、HSD17B13転写産物AまたはDを発現するレンチウイルスを安定に形質導入した不死化ヒト肝臓細胞株におけるHSD17B13の発現およびその局在化を評価した。HSD17B13アイソフォームAは、BODIPYで標識された脂肪滴を取り囲む膜上で主に検出された（データは示さない）。同様の細胞内局在化が、脂肪滴表面でHSD17B13アイソフォームDについても観察された（データは示さない、および図12）。細胞内トリグリセリド含量の差異は、GFP対照またはHSD17B13アイソフォームAまたはDを過剰発現する細胞株のオレイン酸処理について観察されなかった（図13A～13D）。

20

## 【0494】

## in vitroおよび細胞モデルにおけるHSD17B13活性に対するrs72613567:TAの効果

rs72613567:TAに起因するHSD17B13タンパク質の早期トランケーションの機能的結果を理解するために、本発明者らは、組換えタンパク質およびコファクターとしてのニコチニアミドアデノシンジヌクレオチドを使用して、in vitroでアイソフォームAおよびDの酵素活性を評価した。本発明者らは、265のユニークな推定基質を試験し、ステロイド基質およびHSD17B13の酵素基質としての生物活性脂質（例えば、ロイコトリエンB4）を同定した。本発明者らは、ヒドロキシルのケトン基への酸化をもたらす、エストラジオールの酵素的変換に対するHSD17B13の酵素活性のその後の特徴付けに焦点を当てた（図14中のV<sub>max</sub>およびK<sub>m</sub>値）。HSD17B13アイソフォームDは、HSD17B13アイソフォームAと比較した場合、in vitro（図10D）および細胞に基づく酵素変換アッセイ（図10E）でエストラジオールに向かう大きく低下した活性を示した。

30

## 【0495】

大規模エクソーム配列決定をEHR由来臨床表現型と関連させることにより、本発明者らは、HSD17B13におけるスプライスバリアントと、血清トランスアミナーゼレベルの低下、ならびに非アルコール型およびアルコール型の肝疾患のリスクの低下との新規関連を同定した。これらの関連は、4つの独立したコホートにおいて、また、進行した肝硬変型の肝疾患およびHCCを含む、いくつかの異なる肝疾患カテゴリーにわたって、一貫して観察された。HSD17B13 rs72613567:TA対立遺伝子は、単純脂肪肝とは関連しなかったが、NASHおよび線維症のリスクの低下と関連していたが、このバリアント対立遺伝子が、より臨床的に進行した段階の慢性肝疾患への進行から保護することを示唆している。フェノムワイド関連研究において、HSD17B13 rs72613567:TAは、慢性肝疾患以外の臨床診断または測定値と有意に関連せず、臨床測定値（肝臓トランスアミナーゼおよび血小板数）と関連していたが、バリアント対立遺

40

50

伝子の臨床効果が慢性肝疾患に特異的であり得ることを示唆している。

【0496】

他のヒドロキシステロイド17-ベータデヒドロゲナーゼファミリーメンバーは、性ステロイドおよび脂肪酸代謝に関与する（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Moeller、Mol. Cell. Endocrinol.、2009年、301巻、7~19頁、doi:10.1016/j.mce.2008.10.040）が、HSD17B13の機能に関し公知であることはわずかである。HSD17B13の過剰発現は、マウス肝臓における脂質生成を増加させ、培養肝細胞中の脂肪滴の数およびサイズを増加させることが以前に示された（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Suら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、2014年、111巻、11437~11442頁、doi:10.1073/pnas.1410741111）。2つの以前の研究もまた、HSD17B13タンパク質の肝臓発現が、脂肪肝を有する患者において増加することを示した（それぞれ、あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Suら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、2014年、111巻、11437~11442頁、doi:10.1073/pnas.1410741111およびKampfら、FASEB J.、2014年、28巻、2901~2914頁、doi:10.1096/fj.14-250555）。本発明者らのデータは、両方のHSD17B13アイソフォームが、脂肪滴膜上で発現されるが、細胞内中性脂肪含量をモジュレートするとは考えられないことを示唆し、この知見は、ヒトにおけるHSD17B13 rs72613567 : TAと、単純脂肪肝との関連の欠如を反映する。HSD17B13の生理学的基質は公知ではないが、酵素的研究は、HSD17B13 rs72613567 : TA対立遺伝子によってコードされるHSD17B13アイソフォームがエストラジオールに対して触媒的に欠陥があることを示している。この時点で、試験した基質のいずれかが肝疾患にとって重要であるかどうかは明らかではないが、HSD17B13が脂質媒介性炎症に以前は関与していたいくつかの生物活性脂質種（例えば、ロイコトリエンB4）に対する酵素活性を有することは興味深い（あらゆる目的に関してその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Liら、Nature Medicine、2015年、21巻、239~247頁、doi:10.1038/nm.3800）。

【0497】

このHSD17B13バリアントは、他の領域における新しい治療薬への道を案内してきた遺伝子バリアントと同様、慢性肝疾患を標的とする新しい治療戦略への手段を提供することができる。本発明者らのデータは、HSD17B13が、脂肪症から、有意な疾患率および死亡率と関連し、現在は有効な処置がない、後期段階のNASH、線維症、および肝硬変への肝疾患の進行をモジュレートすることを示している。

【0498】

（実施例4）

ex vivoおよびin vivoでのCRISPR/Cas9を使用したマウスHsd17b13遺伝子座の改変

CRISPR/Cas9系を使用してHsd17b13を標的化するための概念実証として、マウスHsd17b13遺伝子座のエクソン1領域またはエクソン6/7領域のいずれかを標的とするマウスHsd17b13ガイドRNAを試験した。ガイドRNA標的配列を、表12に提供する。配列番号259~268に対応するガイドRNA DNA標的化セグメントは、それぞれ、配列番号1643~1652に記載され、チミンの代わりにウラシルを含むことを除いて、配列番号259~268と同一である。マウスHsd17b13（ヒドロキシステロイド（17-ベータ）デヒドロゲナーゼ13）のNCBI遺伝子IDは、243168（配列番号269）である。マウスゲノム遺伝子座は、第5染色体、NC\_000071.6（103955442..103977388、補体）上にある。

【0499】

10

20

30

40

50

## 【表 1 2】

表 12.マウスについてのガイド RNA 標的配列

Hsd17b13 の領域	#	ガイド RNA 標的配列	配列番号					
			gRNA 標的 配列	crRNA	sgRNA v1	sgRNA v2	sgRNA v3	sgRNA v4
エクソン 1	1	GGCAGACCGTTCTCATCACG	259	490	720	950	1180	1410
	2	CTTACCACTGACTCCAGGT	260	491	721	951	1181	1411
	3	GTCACAGATTCCCTCTCCG	261	492	722	952	1182	1412
	4	AGATGATGACGCCACCAGA	262	493	723	953	1183	1413
	5	GGAGAAGGAAATCTGTGACC	263	494	724	954	1184	1414
エクソン 6/7	1	TGCGAGGAACCTTACTTTCC	264	495	725	955	1185	1415
	2	AGAGAAATATTGATATAGGA	265	496	726	956	1186	1416
	3	TATCAATATTCTCTGATCC	266	497	727	957	1187	1417
	4	ATCGCTTTAAGGCACGCTC	267	498	728	958	1188	1418
	5	TATACGACTGATCGCTTTA	268	499	729	959	1189	1419

## 【0500】

ガイド RNA を、ハイブリッド野生型マウス ( 75 % C 57BL / 6NTac 25% 129S6 / SVEvTac ) から単離された初代マウス肝細胞中、*ex vivo* で最初に試験した。マウス由来肝臓を、1 × PenStrep を含有する 50 mL の肝臓かん流培地、次いで、50 mL の肝臓消化培地 ( HBSS、100 mM CaCl<sub>2</sub>、500 mM HEPES、コラゲナーゼ ) でかん流した。一度、肝臓が消化されたと考えられたら、それらを、1 × PenStrep および L - グルタミンを含有する洗浄培地中に入れる。肝臓を引き裂いて、穏やかな振とうにより肝臓から肝細胞を遊離させた。一度、細胞が遊離したら、それらを 70 μm のメッシュフィルターの中に通し、4 で 4 分間、50 g でスピンした。ペレットを、洗浄緩衝液で 2 回洗浄した。次いで、ペレットを 20 mL の 38 ~ 40 % Percoll 中に再懸濁し、4 で 10 min、200 g でスピンした。ペレットを 2 回洗浄し、プレーティング培地 ( ウィリアム E 培地、1 × PenStrep、1 × L - グルタミン、5 % FBS ) 中に再懸濁した。細胞を、24 ウェルのコラーゲン被覆組織培養プレート中に、ウェルあたり 300,000 個の細胞でプレーティングした。細胞を 6 ~ 18 h 結合させた後、プレーティング培地を、FBS を含まない培地と交換した。使用した試薬を、表 13 に示す。

## 【0501】

## 【表 13】

表 13. 初代肝細胞の単離のための試薬

材料	カタログ番号
肝臓かん流培地	Gibco [17701-038]
HBSS (1x)	Gibco [14175-079]
肝細胞洗浄培地	Gibco [17704-024]
ウィリアム E 培地	Gibco [A12176-01]
Penstrep (100x)	Gibco [15140163]
L-グルタミン(200mM)	Gibco [25030081]
FBS 添加物	Gibco [A13450]
HEPES	Gibco [15630080]
コラーゲン	Gibco [A1048301]
酢酸	Sigma [A6283]
リベラーゼ TM	Roche [TM05401119001]
初代肝細胞解凍およびプレーティング添加物	Gibco [CM3000]
初代肝細胞維持添加物	Gibco [CM4000]
Percoll	GE [17-0891-01]

## 【0502】

Cas9 およびマウス Hsd17b13 gRNA を含有するリボ核タンパク質複合体 (

10

20

30

40

50

R N P ) を、新鮮に単離された初代マウス肝細胞に添加した。初代マウス肝細胞中での *e x v i v o* 実験のために、別々の c r R N A および t r a c r R N A を有するモジュラーガイド R N A を使用した。c r R N A の配列番号を表 1 2 に記載し、t r a c r R N A の配列を配列番号 1 4 2 2 に記載する。それぞれの C a s 9 / g R N A R N P 複合体を、C R I S P R M A X (商標) を使用して 2 n M の最終濃度でトランスフェクトした。48 h 後、D N A 溶解物を細胞から調製し、次世代配列決定を、試験したそれぞれのガイド R N A について実施して、予測される切断部位にわたる挿入 / 欠失 (インデル) 頻度を決定した。

#### 【 0 5 0 3 】

図 1 5 は、エクソン 1 領域を標的とする 5 つのガイド R N A のそれぞれおよびエクソン 6 / 7 領域を標的とする 5 つのガイド R N A のそれぞれを含む、初代マウス肝細胞中のそれぞれのガイド R N A を用いたマウス H s d 1 7 b 1 3 遺伝子中での編集レベル (インデルを含むリード %) を示す。編集効率は、次世代配列決定によって決定される、溶解した細胞のプールに由来する P C R 反応中の配列リードの総数にわたって観察される挿入または欠失の総数を指す。ほぼ全てのガイド R N A が、少なくとも 2 0 % の編集効率を示した。

#### 【 0 5 0 4 】

次に、5 つのマウス H s d 1 7 b 1 3 ガイド R N A を、ゲノム的に組み込まれた C a s 9 遺伝子を有するマウス (C a s 9 - r e a d y マウス) において *i n v i v o* で試験した。マウスにおける *i n v i v o* 実験のために、キメラ単一ガイド R N A を使用した。それぞれのガイド R N A に関する D N A 標的化配列は、チミンを置き換えるウラシルを含む、表 1 2 に記載のガイド R N A 標的配列と等価である。それぞれの単一ガイド R N A は、配列番号 1 4 2 0 に記載の g R N A 足場の上流 (5' 側) に D N A - 標的配列を含んでいた。s g R N A の配列番号を、表 1 2 に記載する (s g R N A v 1 のカラム)。異なるガイド R N A 足場を使用する他の s g R N A 变化は、表 1 2 に含まれるが、試験しなかった。それぞれのガイド R N A について、1 群あたり 3 匹の雄の C a s 9 - r e a d y マウスに投与した。ガイド R N A を、尾静脈注射によって s g R N A 発現カセットを担持するアデノ随伴ウイルス (A A V 8) により導入した (1 0 0 μ L の P B S 中、マウスあたり 1 E 1 1)。C a s 9 を発現しない野生型マウスに、陰性対照として 5 つ全部のガイド R N A を投与した。注射の 3 週間後、動物を安樂死させ、肝臓および他の組織と共に血清を収穫した。組織を D N A 溶解物にプロセッシングした後、N G S 配列決定によって分析した。

#### 【 0 5 0 5 】

図 1 6 に示されるように、N G S 配列決定は、5 つ全部のガイド R N A について肝臓における有意な編集を示した (それぞれについて、少なくとも 2 0 % の編集率)。編集効率は、溶解した細胞のプールに由来する P C R 反応中の配列リードの総数にわたって観察された挿入または欠失の総数を指す。他の組織では、最小レベルまたは統計的に有意でないレベルの遺伝子編集が観察された (データは示さない)。

#### 【 0 5 0 6 】

肝臓酵素 A L T、A S T、トリグリセリド、総コレステロール、H D L、L D L、非エステル化脂肪酸 (N E F A)、およびアルブミンに関する血清化学分析により、様々な処置群間の差がわずかであることが示された (データは示さない)。

#### 【 0 5 0 7 】

等質量の肝臓由来 R N A を R T - q P C R によって評価することにより、H s d 1 7 b 1 3 発現を評価した。q P C R 反応にカウントされないように、ゲノム D N A は分解された。R N A を逆転写した後、C a s 9 に特異的なアッセイを使用して、C a s 9 転写産物を検出した。それぞれ個々の H s d 1 7 b 1 3 ガイド R N A は、H s d 1 7 b 1 3 m R N A 発現の少なくとも 5 0 % の除去を示した。図 1 7 A を参照されたい。対照的に、非標的 H S D ファミリーメンバーの発現においては、有意な減少は観察されなかった。図 1 7 B を参照されたい。

10

20

30

40

50

【図面】  
【図 1 A】

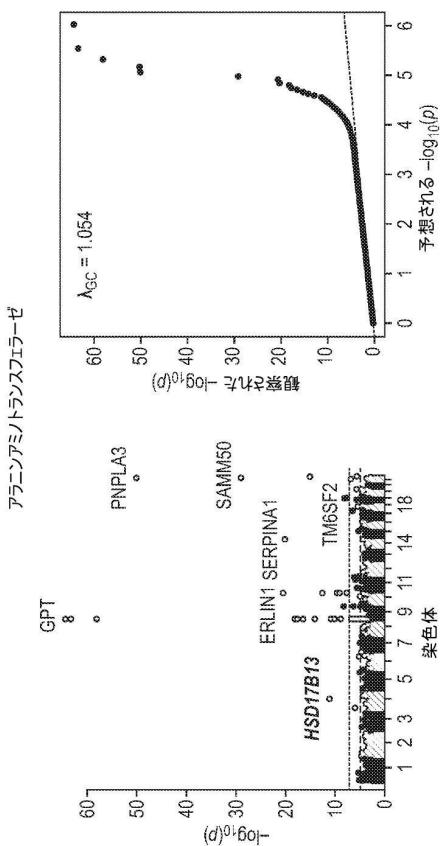


FIG. 1A

【図 1 B】

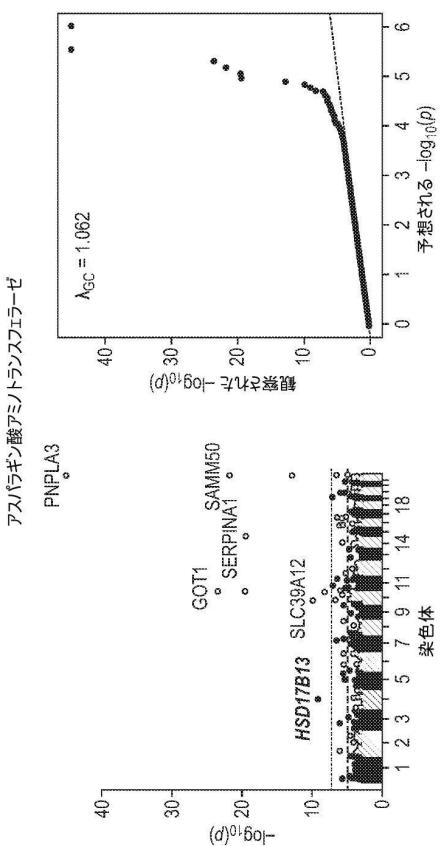


FIG. 1B

【図 2 A】

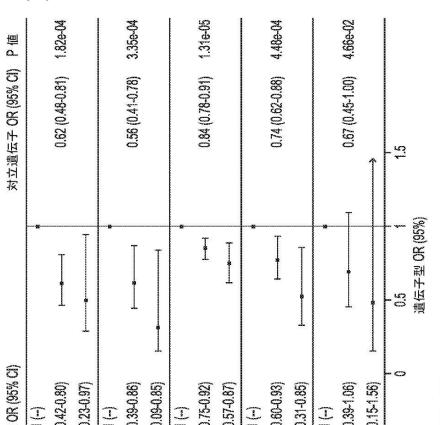


FIG. 2A

【図 2 B】

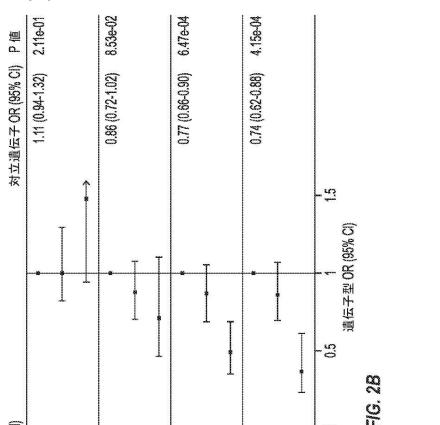
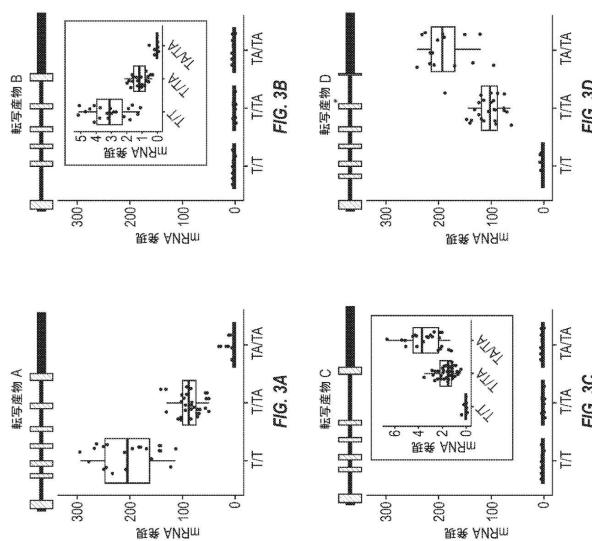


FIG. 2B

【図3】



【図4】

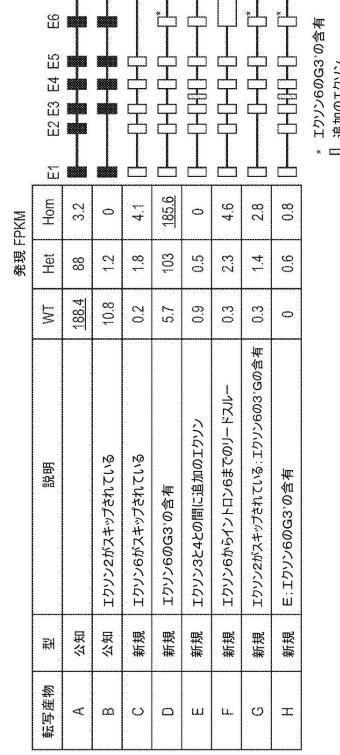
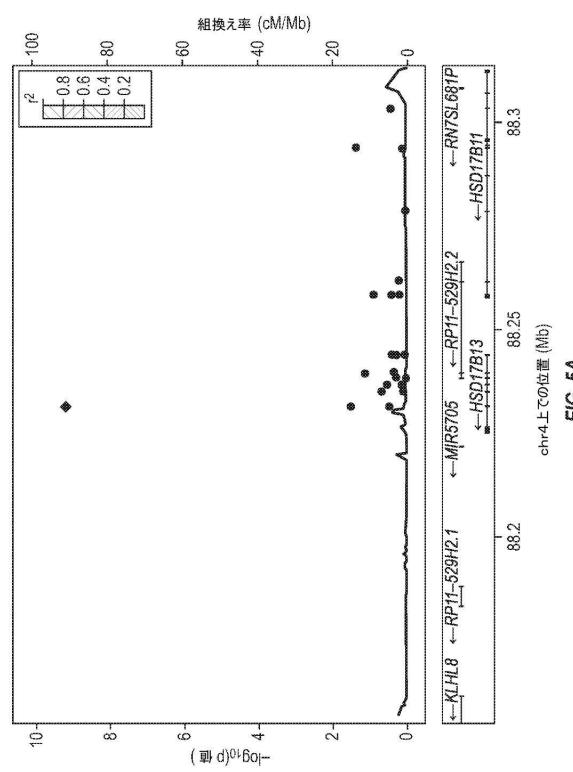
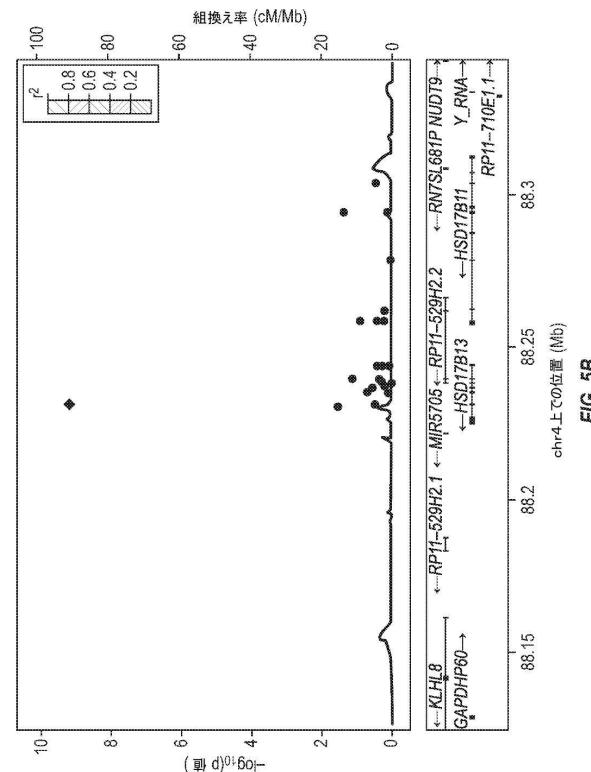


FIG. 4

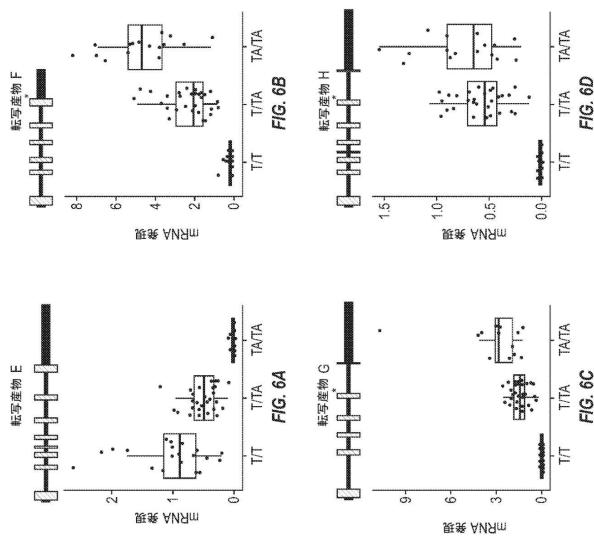
【図5 A】



【図5 B】



【図 6】



【図 7 A】

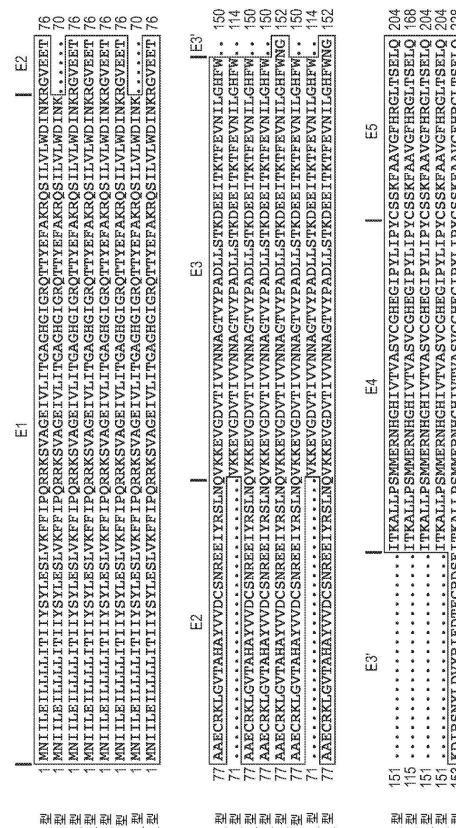


FIG. 7A

【図 7 B】

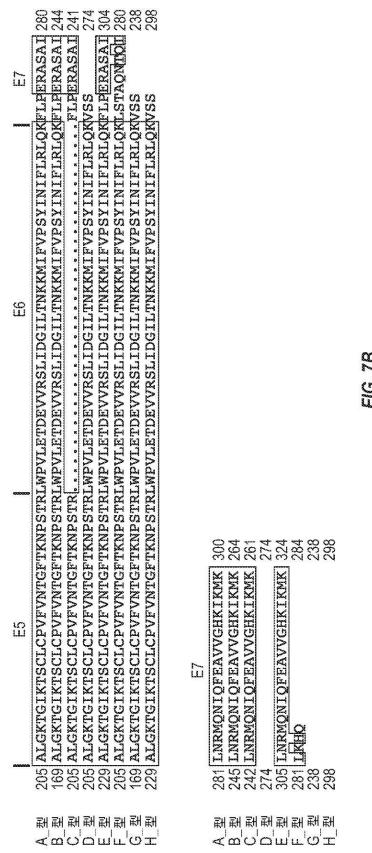


FIG. 7B

【図 8】

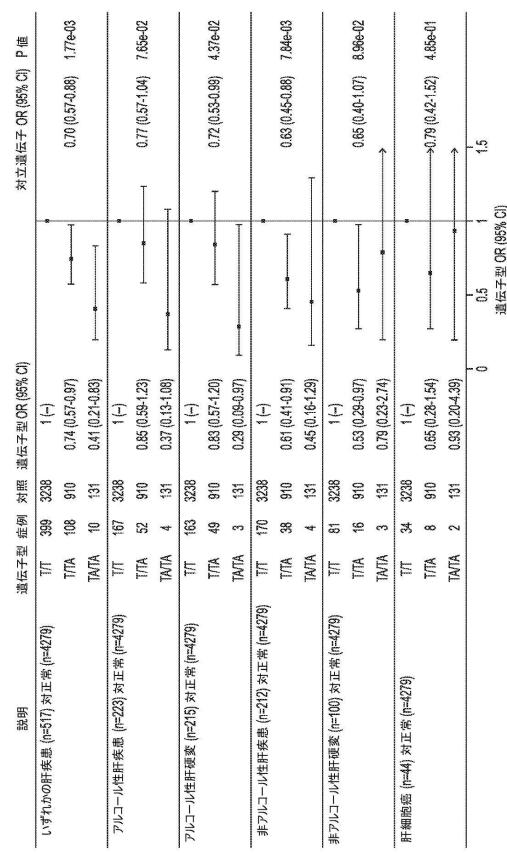


FIG. 8

【図 9】

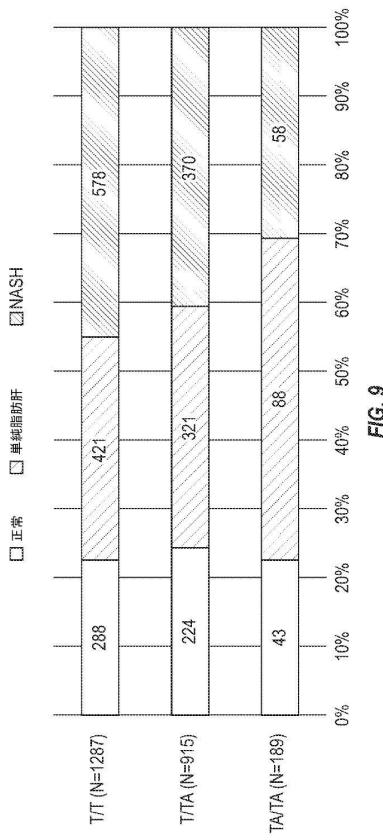


FIG. 9

【図 10 A B C】

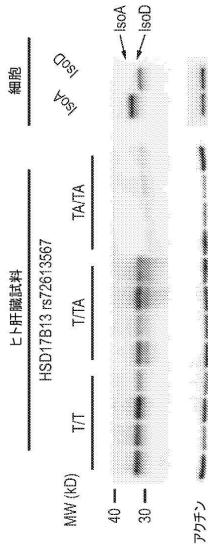


FIG. 10B

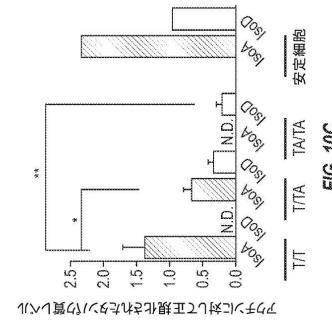


FIG. 10C

【図 10 D E】

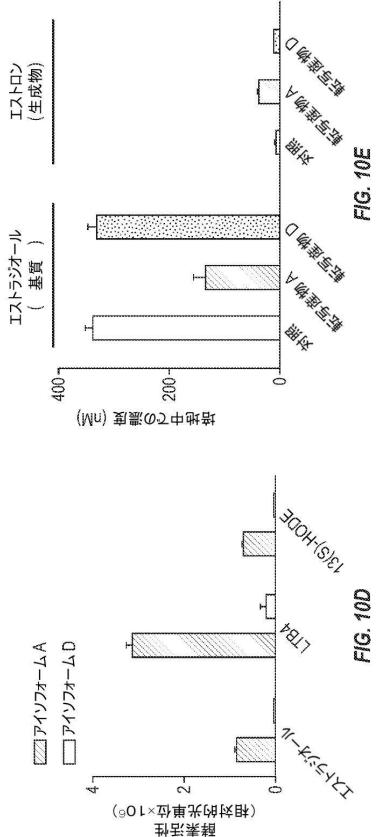


FIG. 10E

FIG. 10D

【図 11】

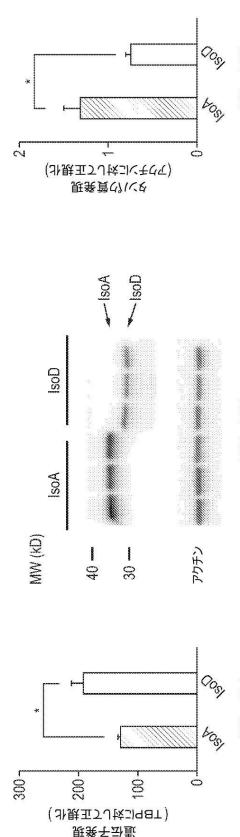
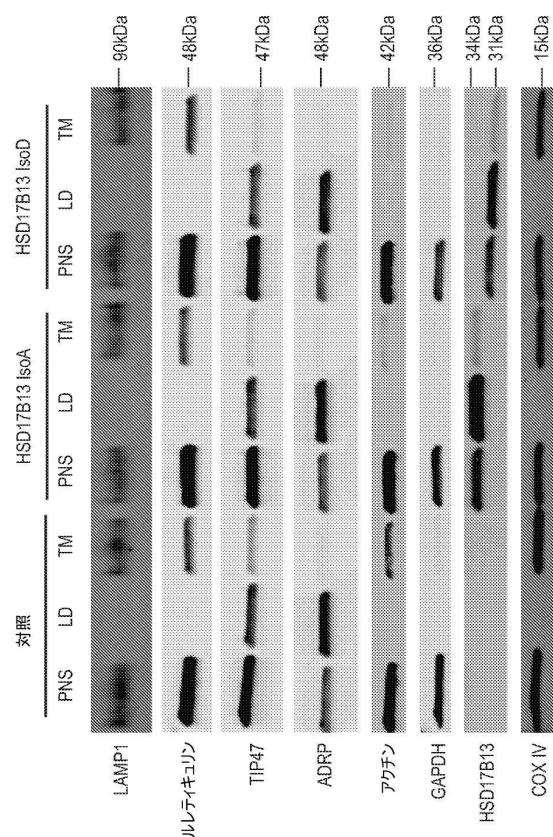


FIG. 11C

FIG. 11B

FIG. 11A

【図 1 2】



【図 1 3】

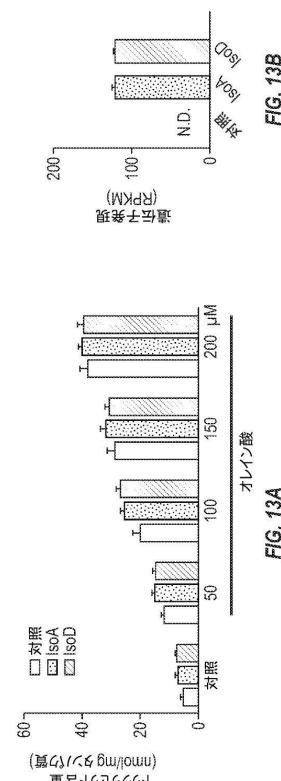


FIG. 12

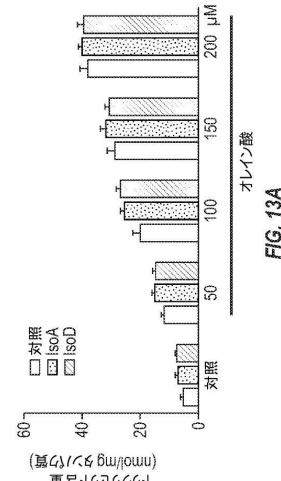


FIG. 13B

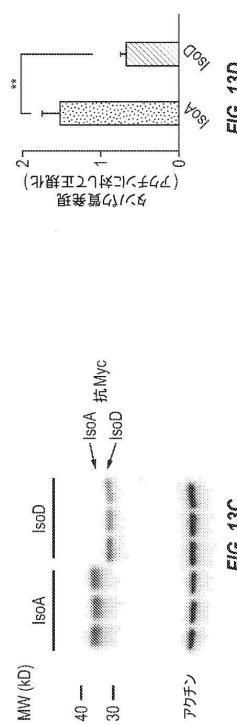


FIG. 13D

10

20

30

40

50

【図 1 4】

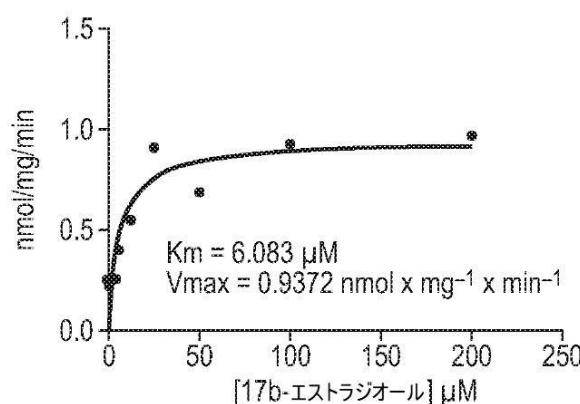


FIG. 14

【図 1 5】

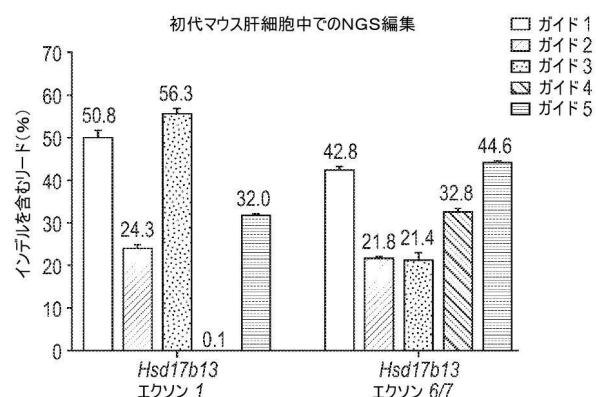


FIG. 15

10

20

30

40

50

【図 16】

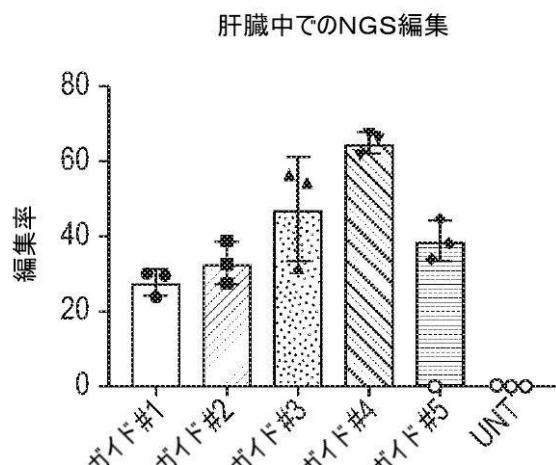


FIG. 16

【図 17】

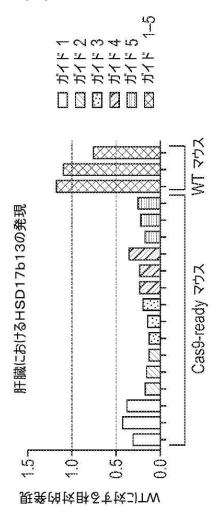


FIG. 17A

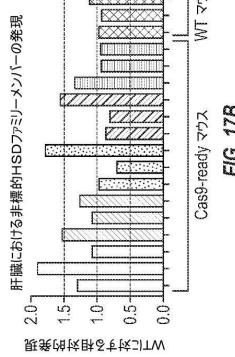


FIG. 17B

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)
A 6 1 P	1/16 (2006.01)
C 1 2 N	15/53 (2006.01)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)
A 6 1 K	35/76
A 6 1 P	1/16
C 1 2 N	15/53
C 1 2 N	5/10

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/581,918

(32)優先日 平成29年11月6日(2017.11.6)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## 早期審査対象出願

## 前置審査

ド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ゴッテスマン, オムリ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 リー, アレクサンダー

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 チェン, シーピン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 シン, ユーロン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ペファニス, エヴァンゲロス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ハートフォード, スザンヌ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 グロマダ, ジェスパー

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 デューイ, フレデリック イー.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 パラス, アリス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 シュルダイナー, アラン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591-6707, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 PNAS, 2014, 111(31):11437-11442

Endocr J., 2014, 61(7):683-689

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

C 1 2 N

A 6 1 K

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q