

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 2 年 2 月 20 日 (2020.2.20)

【公表番号】特表 2019-507579 (P2019-507579A)

【公表日】平成 31 年 3 月 22 日 (2019.3.22)

【年通号数】公開・登録公報 2019-011

【出願番号】特願 2018-521542 (P2018-521542)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 21/04 (2006.01)

A 6 1 K 35/545 (2015.01)

A 6 1 K 35/33 (2015.01)

A 6 1 K 35/34 (2015.01)

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/077 (2010.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/11 Z N A Z

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 21/04

A 6 1 K 35/545

A 6 1 K 35/33

A 6 1 K 35/34

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/077

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 1 月 9 日 (2020.1.9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト細胞内のジストロフィン遺伝子を、ゲノム編集により編集するための方法において使用するための、1 または複数のデオキシリボ核酸 (DNA) エンドヌクレアーゼまたは 1 または複数の DNA エンドヌクレアーゼをコードする 1 または複数のポリヌクレオチドを含む組成物であって、前記方法は、前記ヒト細胞へと、1 または複数のデオキシリボ核酸 (DNA) エンドヌクレアーゼを導入するステップであって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、1 または複数の一本鎖切断 (SSB) または二本鎖切断 (DSB) であって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、1 もしくは複数のエクソン、または異常なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な欠失、挿入、または置きかえをもたらす、ジストロフィンのリーディングフレームの修復、お

よびジストロフィンタンパク質の活性の修復をもたらす S S B または D S B を生じさせるステップを含む、組成物。

【請求項 2】

前記ヒト細胞が、筋細胞または筋前駆細胞である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) を伴う患者を処置するための、P a x 7 + 筋始原細胞を含む組成物であって、前記 P a x 7 + 筋始原細胞は、

- i) D M D 患者特異的な誘導多能性幹細胞 (i P S C) を創出するステップと；
- i i) 前記 i P S C のジストロフィン遺伝子内またはその近傍で編集するステップと；
- i i i) ゲノム編集された i P S C を、P a x 7 + 筋始原細胞へと分化させるステップ

と

を含む方法によって産生され、

前記組成物は、前記患者へと植え込まれることを特徴とする、組成物。

【請求項 4】

前記創出するステップが、

a) 体細胞を、前記患者から単離することと；

b) 多能性関連遺伝子のセットを、前記体細胞へと導入することであって、前記体細胞が多能性幹細胞となるように誘導することと

を含む、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記体細胞が、線維芽細胞である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記多能性関連遺伝子のセットが、O C T 4、S O X 2、K L F 4、L i n 2 8、N A N O G、および c M Y C からなる群から選択される遺伝子のうちの 1 または複数である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記編集するステップが、前記 i P S C へと、1 または複数のデオキシリボ核酸 (D N A) エンドヌクレアーゼを導入することであって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、1 または複数の一本鎖切断 (S S B) または二本鎖切断 (D S B) であって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、1 もしくは複数のエクソン、または異常なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な欠失、挿入、または置きかえをもたらす、ジストロフィンのリーディングフレームの修復、およびジストロフィンタンパク質の活性の修復をもたらす S S B または D S B を生じさせることを含む、請求項 3 から 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記分化させるステップが、前記ゲノム編集された i P S C を、P a x 7 + 筋始原細胞へと分化させるように、以下：前記ゲノム編集された i P S C を、低分子薬物を含む特異的培地処方物と接触させること；トランス遺伝子の過剰発現；または血清枯渇のうちの 1 または複数を含む、請求項 3 から 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記組成物が、所望の筋肉への局所注射により、前記患者へと植え込まれることを特徴とする、請求項 3 から 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) を伴う患者を処置するための i n v i v o 方法において使用するための、ジストロフィン遺伝子を編集するための材料を含む組成物であって、前記方法は、前記患者の細胞内のジストロフィン遺伝子を編集するステップを含む、組成物。

【請求項 11】

前記編集するステップが、前記患者の前記細胞へと、1 または複数のデオキシリボ核酸 (D N A) エンドヌクレアーゼを導入することであって、前記ジストロフィン遺伝子内ま

たはその近傍に、1または複数の一本鎖切断（SSB）または二本鎖切断（DSB）であって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、1もしくは複数のエクソン、または異常なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な欠失、挿入、または置きかえをもたらし、ジストロフィンのリーディングフレームの修復、およびジストロフィンタンパク質の活性の修復をもたらすSSBまたはDSBを生じさせることを含む、請求項10に記載の組成物。

【請求項12】

前記細胞が、筋細胞または筋前駆細胞である、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

前記1または複数のDNAエンドヌクレアーゼが、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9（また、Csn1およびCsx12としても公知である）、Cas100、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、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、もしくはCpf1エンドヌクレアーゼ；これらの相同体、これらの天然に存在する分子の組換え体、これらのコドン最適化体、またはこれらの修飾形、およびこれらの組合せである、請求項1、7、または11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項14】

前記方法は、前記細胞へと、前記1または複数のDNAエンドヌクレアーゼをコードする、1または複数のポリヌクレオチドを導入するステップを含む、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

前記方法は、前記細胞へと、前記1または複数のDNAエンドヌクレアーゼをコードする、1または複数のリボ核酸（RNA）を導入するステップを含む、請求項13に記載の組成物。

【請求項16】

前記1もしくは複数のポリヌクレオチド、または1もしくは複数のRNAが、1もしくは複数の修飾ポリヌクレオチド、または1もしくは複数の修飾RNAである、請求項14または15に記載の組成物。

【請求項17】

前記1または複数のDNAエンドヌクレアーゼが、1または複数のタンパク質またはポリペプチドである、請求項13に記載の組成物。

【請求項18】

前記方法は、前記細胞へと、1または複数のガイドリボ核酸（gRNA）を導入するステップをさらに含む、請求項1から17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項19】

前記1または複数のgRNAが、単一分子ガイドRNA（sgRNA）である、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

前記1もしくは複数のgRNA、または1もしくは複数のsgRNAが、1もしくは複数の修飾gRNA、または1もしくは複数の修飾sgRNAである、請求項18または19に記載の組成物。

【請求項21】

前記1または複数のDNAエンドヌクレアーゼが、1もしくは複数のgRNA、または1もしくは複数のsgRNAとあらかじめ複合体化されている、請求項18から20のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項22】

前記方法は、前記細胞へと、野生型ジストロフィンの遺伝子またはcDNAの少なくとも

も一部分を含むポリヌクレオチドドナー鋳型を導入するステップをさらに含む、請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 23】

前記野生型ジストロフィンの遺伝子または cDNA の前記少なくとも一部分が、エクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5、エクソン 6、エクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 10、エクソン 11、エクソン 12、エクソン 13、エクソン 14、エクソン 15、エクソン 16、エクソン 17、エクソン 18、エクソン 19、エクソン 20、エクソン 21、エクソン 22、エクソン 23、エクソン 24、エクソン 25、エクソン 26、エクソン 27、エクソン 28、エクソン 29、エクソン 30、エクソン 31、エクソン 32、エクソン 33、エクソン 34、エクソン 35、エクソン 36、エクソン 37、エクソン 38、エクソン 39、エクソン 40、エクソン 41、エクソン 42、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 47、エクソン 48、エクソン 49、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、エクソン 54、エクソン 55、エクソン 56、エクソン 57、エクソン 58、エクソン 59、エクソン 60、エクソン 61、エクソン 62、エクソン 63、エクソン 64、エクソン 65、エクソン 66、エクソン 67、エクソン 68、エクソン 69、エクソン 70、エクソン 71、エクソン 72、エクソン 73、エクソン 74、エクソン 75、エクソン 76、エクソン 77、エクソン 78、エクソン 79、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくは cDNA 全体の少なくとも一部を含む、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記野生型ジストロフィンの遺伝子または cDNA の前記少なくとも一部分が、エクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5、エクソン 6、エクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 10、エクソン 11、エクソン 12、エクソン 13、エクソン 14、エクソン 15、エクソン 16、エクソン 17、エクソン 18、エクソン 19、エクソン 20、エクソン 21、エクソン 22、エクソン 23、エクソン 24、エクソン 25、エクソン 26、エクソン 27、エクソン 28、エクソン 29、エクソン 30、エクソン 31、エクソン 32、エクソン 33、エクソン 34、エクソン 35、エクソン 36、エクソン 37、エクソン 38、エクソン 39、エクソン 40、エクソン 41、エクソン 42、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 47、エクソン 48、エクソン 49、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、エクソン 54、エクソン 55、エクソン 56、エクソン 57、エクソン 58、エクソン 59、エクソン 60、エクソン 61、エクソン 62、エクソン 63、エクソン 64、エクソン 65、エクソン 66、エクソン 67、エクソン 68、エクソン 69、エクソン 70、エクソン 71、エクソン 72、エクソン 73、エクソン 74、エクソン 75、エクソン 76、エクソン 77、エクソン 78、エクソン 79、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくは cDNA 全体を含む、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記ドナー鋳型が、一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドである、請求項 22 から 24 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 26】

前記方法が、前記細胞へと、1 または複数のガイドリボ核酸 (gRNA) を導入するステップをさらに含み、前記 1 または複数の DNA エンドヌクレアーゼが、5' ローカスにおける第 1 の SSB または DSB による切断、および 3' ローカスにおける第 2 の SSB または DSB による切断である 1 対の一本鎖切断 (SSB) または二本鎖切断 (DSB) であって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍の前記 5' ローカスと前記 3' ローカスとの間に、1 もしくは複数のエクソン、または異常なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な欠失または置きかえをもたらし、前記ジストロフィンのリーディングフレームの修復、および前記ジストロフィンタンパク質の活性の修復

をもたらす S S B または D S B を生じさせる 1 または複数の C a s 9 または C p f 1 エンドヌクレアーゼである、請求項 1、7、または 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 27】

1 つの g R N A が、1 対の S S B または D S B を創出する、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

1 つの g R N A が、前記 5' ローカス、前記 3' ローカス、または前記 5' ローカスと 3' ローカスとの間のセグメントと相補的であるスパーサー配列を含む、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 29】

第 1 の g R N A および第 2 の g R N A を含み、前記第 1 の g R N A が、前記 5' ローカスのセグメントと相補的であるスパーサー配列を含み、前記第 2 の g R N A が、前記 3' ローカスのセグメントと相補的であるスパーサー配列を含む、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記 1 または複数の g R N A が、1 または複数の単一分子ガイド R N A (s g R N A) である、請求項 26 から 29 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 31】

前記 1 もしくは複数の g R N A、または 1 もしくは複数の s g R N A が、1 もしくは複数の修飾 g R N A、または 1 もしくは複数の修飾 s g R N A である、請求項 26 から 30 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 32】

前記 1 または複数の D N A エンドヌクレアーゼが、1 もしくは複数の g R N A、または 1 もしくは複数の s g R N A とあらかじめ複合体化されている、請求項 26 から 31 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 33】

前記 5' ローカスと前記 3' ローカスとの間に染色体 D N A の欠失が存在する、請求項 26 から 32 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 34】

前記欠失が、単一エクソンの欠失である、請求項 26 から 33 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 35】

前記単一エクソンの欠失が、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、またはエクソン 53 の欠失である、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 36】

前記 5' ローカスが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、およびエクソン 53 からなる群から選択される単一エクソンの 5' 境界部に対して近位である、請求項 34 から 35 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 37】

前記 3' ローカスが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、およびエクソン 53 からなる群から選択される単一エクソンの 3' 境界部に対して近位である、請求項 34 から 36 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 38】

前記 5' ローカスが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、およびエクソン 53 からなる群から選択される単一エクソンの 5' 境界部に対して近位であり、前記 3' ローカスが、これらの前記 3' 境界部に対して近位である、請求項 34 から 37 のいずれか

一項に記載の組成物。

【請求項 39】

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンの周囲のスプライドナーおよびアクセプターを含む、請求項 36 から 38 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 40】

前記欠失が、マルチエクソンの欠失である、請求項 26 から 33 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 41】

前記マルチエクソンの欠失が、エクソン 45 ~ 53 またはエクソン 45 ~ 55 の欠失である、請求項 40 に記載の組成物。

【請求項 42】

前記 5' ローカスが、エクソン 45 ~ 53 およびエクソン 45 ~ 55 からなる群から選択される複数のエクソンの 5' 境界部に対して近位である、請求項 40 から 41 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 43】

前記 3' ローカスが、エクソン 45 ~ 53 およびエクソン 45 ~ 55 からなる群から選択される複数のエクソンの 3' 境界部に対して近位である、請求項 40 から 42 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 44】

前記 5' ローカスが、エクソン 45 ~ 53 およびエクソン 45 ~ 55 からなる群から選択される複数のエクソンの 5' 境界部に対して近位であり、3' ローカスが、これらの 3' 境界部に対して近位である、請求項 40 から 43 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 45】

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンの周囲のスプライドナーおよびアクセプターを含む、請求項 42 から 44 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 46】

前記 5' ローカスと前記 3' ローカスとの間に染色体 DNA の置きかえが存在する、請求項 26 から 32 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 47】

前記置きかえが、単一エクソンの置きかえである、請求項 26 から 32 または 46 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 48】

前記単一エクソンの置きかえが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、またはエクソン 70 の置きかえである、請求項 26 から 32 または 46 から 47 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 49】

前記 5' ローカスが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、またはエクソン 70 からなる群から選択される単一エクソンの 5' 境界部に対して近位である、請求項 47 から 48 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 50】

前記 3' ローカスが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、またはエクソン 70 からなる群から選択される単一エクソンの 3' 境界部に対して近位である、請求項 47 から 49 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 51】

前記 5' ローカスが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、またはエクソン 70 からなる群から選択される単一エクソンの 5' 境界部に対して近位であ

り、3'ローカスが、これらの3'境界部に対して近位である、請求項47から50のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項52】

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンまたは隣接エクソンの周囲のスプライドナーおよびアクセプターを含む、請求項49から51のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項53】

前記置きかえが、マルチエクソンの置きかえである、請求項26から32または46のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項54】

前記マルチエクソンの置きかえが、エクソン45～53またはエクソン45～55の置きかえである、請求項53に記載の組成物。

【請求項55】

前記5'ローカスが、エクソン45～53およびエクソン45～55からなる群から選択される複数のエクソンの5'境界部に対して近位である、請求項53から54のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項56】

前記3'ローカスが、エクソン45～53およびエクソン45～55からなる群から選択される複数のエクソンの3'境界部に対して近位である、請求項53から55のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項57】

前記5'ローカスが、エクソン45～53およびエクソン45～55からなる群から選択される複数のエクソンの5'境界部に対して近位であり、3'ローカスが、これらの3'境界部に対して近位である、請求項53から56のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項58】

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンの周囲のスプライドナーおよびアクセプターを含む、請求項55から57のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項59】

前記方法が、前記細胞へと、野生型ジストロフィンの遺伝子またはcDNAの少なくとも一部分を含むポリヌクレオチドドナー鋳型を導入するステップをさらに含み、前記置きかえが、相同性により導かれる修復(HDR)によるものである、請求項46から58のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項60】

前記野生型ジストロフィンの遺伝子またはcDNAの前記少なくとも一部分が、エクソン1、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン10、エクソン11、エクソン12、エクソン13、エクソン14、エクソン15、エクソン16、エクソン17、エクソン18、エクソン19、エクソン20、エクソン21、エクソン22、エクソン23、エクソン24、エクソン25、エクソン26、エクソン27、エクソン28、エクソン29、エクソン30、エクソン31、エクソン32、エクソン33、エクソン34、エクソン35、エクソン36、エクソン37、エクソン38、エクソン39、エクソン40、エクソン41、エクソン42、エクソン43、エクソン44、エクソン45、エクソン46、エクソン47、エクソン48、エクソン49、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53、エクソン54、エクソン55、エクソン56、エクソン57、エクソン58、エクソン59、エクソン60、エクソン61、エクソン62、エクソン63、エクソン64、エクソン65、エクソン66、エクソン67、エクソン68、エクソン69、エクソン70、エクソン71、エクソン72、エクソン73、エクソン74、エクソン75、エクソン76、エクソン77、エクソン78、エクソン79、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくはcDNA全体の少なくとも一部を含む、請求項59に記載の組成物。

【請求項 6 1】

前記野生型ジストロフィンの遺伝子または c D N A の前記少なくとも一部分が、エクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5、エクソン 6、エクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 10、エクソン 11、エクソン 12、エクソン 13、エクソン 14、エクソン 15、エクソン 16、エクソン 17、エクソン 18、エクソン 19、エクソン 20、エクソン 21、エクソン 22、エクソン 23、エクソン 24、エクソン 25、エクソン 26、エクソン 27、エクソン 28、エクソン 29、エクソン 30、エクソン 31、エクソン 32、エクソン 33、エクソン 34、エクソン 35、エクソン 36、エクソン 37、エクソン 38、エクソン 39、エクソン 40、エクソン 41、エクソン 42、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 47、エクソン 48、エクソン 49、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、エクソン 54、エクソン 55、エクソン 56、エクソン 57、エクソン 58、エクソン 59、エクソン 60、エクソン 61、エクソン 62、エクソン 63、エクソン 64、エクソン 65、エクソン 66、エクソン 67、エクソン 68、エクソン 69、エクソン 70、エクソン 71、エクソン 72、エクソン 73、エクソン 74、エクソン 75、エクソン 76、エクソン 77、エクソン 78、エクソン 79、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくは c D N A 全体を含む、請求項 5 9 に記載の組成物。

【請求項 6 2】

前記方法が、前記細胞へと、1つのガイドリボ核酸 (g R N A) と、野生型ジストロフィンの遺伝子の少なくとも一部分を含むポリヌクレオチドドナー鋳型とを導入するステップをさらに含み、前記 1 または複数の D N A エンドヌクレアーゼが、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍のローカスに、前記ポリヌクレオチドドナー鋳型に由来する新たな配列の、前記ローカスにおける染色体 D N A への挿入を容易とする 1 つの一本鎖切断 (S S B) または二本鎖切断 (D S B) であって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、1もしくは複数のエクソン、または異常なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な挿入または矯正をもたらす、前記ジストロフィンのリーディングフレームの修復、および前記ジストロフィントタンパク質の活性の修復をもたらす S S B または D S B を生じさせる 1 または複数の C a s 9 または C p f 1 エンドヌクレアーゼであり、前記 g R N A が、前記ローカスのセグメントと相補的であるスパーサー配列を含む、請求項 1、7、または 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6 3】

前記方法が、前記細胞へと、1または複数のガイドリボ核酸 (g R N A) と、野生型ジストロフィンの遺伝子の少なくとも一部分を含むポリヌクレオチドドナー鋳型とを導入するステップをさらに含み、前記 1 または複数の D N A エンドヌクレアーゼが、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、前記ポリヌクレオチドドナー鋳型に由来する新たな配列の、5'ローカスと3'ローカスとの間における染色体 D N A への挿入を容易とする、前記 5'ローカスにおける第 1 の切断、および前記 3'ローカスにおける第 2 の切断である 1 対の一本鎖切断 (S S B) または二本鎖切断 (D S B) であって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍の前記 5'ローカスと前記 3'ローカスとの間に、1もしくは複数のエクソン、または異常なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な挿入または矯正をもたらす、前記ジストロフィンのリーディングフレームの修復、および前記ジストロフィントタンパク質の活性の修復をもたらす S S B または D S B を生じさせる 1 または複数の C a s 9 または C p f 1 エンドヌクレアーゼである、請求項 1、7、または 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6 4】

1 つの g R N A が、1 対の S S B または D S B を創出する、請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 6 5】

1 つの g R N A が、前記 5'ローカス、前記 3'ローカス、または前記 5'ローカスと

前記 3'ローカスとの間のセグメントと相補的であるスパーサー配列を含む、請求項 63 に記載の組成物。

【請求項 66】

第 1 の gRNA および第 2 の gRNA を含み、前記第 1 の gRNA が、前記 5'ローカスのセグメントと相補的であるスパーサー配列を含み、前記第 2 の gRNA が、前記 3'ローカスのセグメントと相補的であるスパーサー配列を含む、請求項 63 に記載の組成物。

【請求項 67】

前記 1 または複数の gRNA が、1 または複数の単一分子ガイド RNA (sgRNA) である、請求項 62 または 63 に記載の組成物。

【請求項 68】

前記 1 もしくは複数の gRNA、または 1 もしくは複数の sgRNA が、1 もしくは複数の修飾 gRNA、または 1 もしくは複数の修飾 sgRNA である、請求項 62 から 63 または 67 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 69】

前記 1 または複数の DNA エンドヌクレアーゼが、1 もしくは複数の gRNA、または 1 もしくは複数の sgRNA とあらかじめ複合体化されている、請求項 62 から 63 または 67 から 68 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 70】

前記挿入が、単一エクソンの挿入である、請求項 62 から 69 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 71】

前記単一エクソンの挿入が、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、またはエクソン 70 の挿入である、請求項 70 に記載の組成物。

【請求項 72】

前記ローカス、5'ローカスまたは 3'ローカスが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、およびエクソン 70 からなる群から選択される単一エクソンの境界部に対して近位である、請求項 70 から 71 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 73】

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンまたは隣接エクソンの周囲のスプライスドナーおよびアクセプターを含む、請求項 72 に記載の組成物。

【請求項 74】

前記挿入が、マルチエクソンの挿入である、請求項 62 から 69 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 75】

前記マルチエクソンの挿入が、エクソン 45 ~ 53 またはエクソン 45 ~ 55 の挿入である、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 76】

前記ローカス、5'ローカスまたは 3'ローカスが、エクソン 45 ~ 53 またはエクソン 45 ~ 55 からなる群から選択されるマルチエクソンの境界部に対して近位である、請求項 74 から 75 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 77】

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンの周囲のスプライスドナーおよびアクセプターを含む、請求項 76 に記載の組成物。

【請求項 78】

前記野生型ジストロフィンの遺伝子または cDNA の少なくとも一部分が、エクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5、エクソン 6、エクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 10、エクソン 11、エクソン 12、エクソン 13、エクソ

ン 1 4、エクソン 1 5、エクソン 1 6、エクソン 1 7、エクソン 1 8、エクソン 1 9、エクソン 2 0、エクソン 2 1、エクソン 2 2、エクソン 2 3、エクソン 2 4、エクソン 2 5、エクソン 2 6、エクソン 2 7、エクソン 2 8、エクソン 2 9、エクソン 3 0、エクソン 3 1、エクソン 3 2、エクソン 3 3、エクソン 3 4、エクソン 3 5、エクソン 3 6、エクソン 3 7、エクソン 3 8、エクソン 3 9、エクソン 4 0、エクソン 4 1、エクソン 4 2、エクソン 4 3、エクソン 4 4、エクソン 4 5、エクソン 4 6、エクソン 4 7、エクソン 4 8、エクソン 4 9、エクソン 5 0、エクソン 5 1、エクソン 5 2、エクソン 5 3、エクソン 5 4、エクソン 5 5、エクソン 5 6、エクソン 5 7、エクソン 5 8、エクソン 5 9、エクソン 6 0、エクソン 6 1、エクソン 6 2、エクソン 6 3、エクソン 6 4、エクソン 6 5、エクソン 6 6、エクソン 6 7、エクソン 6 8、エクソン 6 9、エクソン 7 0、エクソン 7 1、エクソン 7 2、エクソン 7 3、エクソン 7 4、エクソン 7 5、エクソン 7 6、エクソン 7 7、エクソン 7 8、エクソン 7 9、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくは c D N A 全体の少なくとも一部を含む、請求項 6 2 または 6 3 に記載の組成物。

【請求項 7 9】

前記野生型ジストロフィンの遺伝子または c D N A の少なくとも一部分が、エクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5、エクソン 6、エクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 1 0、エクソン 1 1、エクソン 1 2、エクソン 1 3、エクソン 1 4、エクソン 1 5、エクソン 1 6、エクソン 1 7、エクソン 1 8、エクソン 1 9、エクソン 2 0、エクソン 2 1、エクソン 2 2、エクソン 2 3、エクソン 2 4、エクソン 2 5、エクソン 2 6、エクソン 2 7、エクソン 2 8、エクソン 2 9、エクソン 3 0、エクソン 3 1、エクソン 3 2、エクソン 3 3、エクソン 3 4、エクソン 3 5、エクソン 3 6、エクソン 3 7、エクソン 3 8、エクソン 3 9、エクソン 4 0、エクソン 4 1、エクソン 4 2、エクソン 4 3、エクソン 4 4、エクソン 4 5、エクソン 4 6、エクソン 4 7、エクソン 4 8、エクソン 4 9、エクソン 5 0、エクソン 5 1、エクソン 5 2、エクソン 5 3、エクソン 5 4、エクソン 5 5、エクソン 5 6、エクソン 5 7、エクソン 5 8、エクソン 5 9、エクソン 6 0、エクソン 6 1、エクソン 6 2、エクソン 6 3、エクソン 6 4、エクソン 6 5、エクソン 6 6、エクソン 6 7、エクソン 6 8、エクソン 6 9、エクソン 7 0、エクソン 7 1、エクソン 7 2、エクソン 7 3、エクソン 7 4、エクソン 7 5、エクソン 7 6、エクソン 7 7、エクソン 7 8、エクソン 7 9、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくは c D N A 全体を含む、請求項 6 2 または 6 3 に記載の組成物。

【請求項 8 0】

前記挿入が、相同性により導かれる修復 (H D R) によるものである、請求項 6 2 から 7 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8 1】

前記ドナー鋳型が、一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドである、請求項 6 2 から 8 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8 2】

前記 C a s 9 または C p f 1 の、m R N A、g R N A、およびドナー鋳型が、各々別個の脂質ナノ粒子へと製剤化されているか、またはこれらの全てが、脂質ナノ粒子へと共製剤化されている、請求項 2 6 から 8 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8 3】

前記 C a s 9 または C p f 1 の m R N A が、脂質ナノ粒子へと製剤化されており、前記 g R N A およびドナー鋳型の両方が、前記細胞へと、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターにより送達されることを特徴とする、請求項 2 6 から 8 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8 4】

前記 C a s 9 または C p f 1 の m R N A が、脂質ナノ粒子へと製剤化されており、前記 g R N A が、前記細胞へと、電気穿孔により送達され、ドナー鋳型が、前記細胞へと、ア

デノ随伴ウイルス（AAV）ベクターにより送達されることを特徴とする、請求項26から81のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項85】

前記ジストロフィン遺伝子が、X染色体：31, 117, 228～33, 344, 609（Genome Reference Consortium：GRCh38/hg38）に位置する、請求項1から84のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項86】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーを伴う患者に由来する細胞内のジストロフィン遺伝子を編集するための、1または複数のガイドリボ核酸（gRNA）を含む組成物であって、前記1または複数のgRNAは、配列表の配列番号1～1, 410, 472内の核酸配列からなる群から選択されるスパーサー配列を含む、組成物。

【請求項87】

前記1または複数のgRNAが、1または複数の単一分子ガイドRNA（sgRNA）である、請求項86に記載の組成物。

【請求項88】

前記1もしくは複数のgRNA、または1もしくは複数のsgRNAが、1もしくは複数の修飾gRNA、または1もしくは複数の修飾sgRNAである、請求項86または87に記載の組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0615

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0615】

本明細書で特定される任意の特許、刊行物、または他の開示材料は、別に示されない限り、組み込まれる材料が本明細書で明白に示される存在する説明、定義、記述、または他の開示材料と矛盾しない限り、その全体が本明細書に参照により組み込まれる。そのため、および必要な限り、本明細書で示される明らかな開示は、参照により組み込まれる任意の矛盾する材料に取って代わる。本明細書に参照により組み込まれると述べられているが、本明細書で示される存在する定義、記述、または他の開示材料と矛盾する任意の材料またはその部分は、その組み込まれる材料と存在する開示材料との間で矛盾が生じない限りにおいてのみ組み込まれる。出願人らは、本明細書に参照により組み込まれる、任意の主題またはその部分を明白に列挙するために、本明細書を訂正する権利を有する。

本発明の実施形態の例として、以下の項目が挙げられる。

（項目1）

ヒト細胞内のジストロフィン遺伝子を、ゲノム編集により編集するための方法であって、前記ヒト細胞へと、1または複数のデオキシリボ核酸（DNA）エンドヌクレアーゼを導入するステップであって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、1または複数の一本鎖切断（SSB）または二本鎖切断（DSB）であって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、1もしくは複数のエクソン、または異常なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な欠失、挿入、または置きかえをもたらす、ジストロフィンのリーディングフレームの修復、およびジストロフィタンパク質の活性の修復をもたらすSSBまたはDSBを生じさせるステップを含む方法。

（項目2）

前記ヒト細胞が、筋細胞または筋前駆細胞である、項目1に記載の方法。

（項目3）

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）を伴う患者を処置するためのex vivo方法であって、

i）DMD患者特異的な誘導多能性幹細胞（iPSC）を創出するステップと；

i i) 前記 i P S C のジストロフィン遺伝子内またはその近傍で編集するステップと ;
i i i) ゲノム編集された i P S C を、P a x 7 + 筋始原細胞へと分化させるステップ
と ;

i v) 前記 P a x 7 + 筋始原細胞を、前記患者へと植え込むステップと
を含む e x v i v o 方法。

(項目 4)

前記創出するステップが、

a) 体細胞を、前記患者から単離することと ;

b) 多能性関連遺伝子のセットを、前記体細胞へと導入することであって、前記体細胞
が多能性幹細胞となるように誘導すること
を含む、項目 3 に記載の方法。

(項目 5)

前記体細胞が、線維芽細胞である、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

前記多能性関連遺伝子のセットが、O C T 4、S O X 2、K L F 4、L i n 2 8、N A
N O G、および c M Y C からなる群から選択される遺伝子のうちの 1 または複数である、
項目 4 に記載の方法。

(項目 7)

前記編集するステップが、前記 i P S C へと、1 または複数のデオキシリボ核酸 (D N
A) エンドヌクレアーゼを導入することであって、前記ジストロフィン遺伝子内またはそ
の近傍に、1 または複数の一本鎖切断 (S S B) または二本鎖切断 (D S B) であって、
前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、1 もしくは複数のエクソン、または異常
なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な欠失、挿入、また
は置きかえをもたらす、ジストロフィンのリーディングフレームの修復、およびジストロ
フィントタンパク質の活性の修復をもたらす S S B または D S B を生じさせることを含む、
項目 3 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8)

前記分化させるステップが、前記ゲノム編集された i P S C を、P a x 7 + 筋始原細胞
へと分化させるように、以下：前記ゲノム編集された i P S C を、低分子薬物を含む特異
的培地処方物と接触させること ; トランス遺伝子の過剰発現 ; または血清枯渇のうちの 1
または複数を含む、項目 3 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9)

前記植え込むステップが、所望の筋肉への局所注射により、前記 P a x 7 + 筋始原細胞
を、前記患者へと植え込むことを含む、項目 3 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0)

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) を伴う患者を処置するための i n v i v o
方法であって、前記患者の細胞内のジストロフィン遺伝子を編集するステップを含む i
n v i v o 方法。

(項目 1 1)

前記編集するステップが、前記患者の前記細胞へと、1 または複数のデオキシリボ核酸
(D N A) エンドヌクレアーゼを導入することであって、前記ジストロフィン遺伝子内ま
たはその近傍に、1 または複数の一本鎖切断 (S S B) または二本鎖切断 (D S B) であ
って、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、1 もしくは複数のエクソン、また
は異常なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な欠失、挿入
、または置きかえをもたらす、ジストロフィンのリーディングフレームの修復、およびジ
ストロフィントタンパク質の活性の修復をもたらす S S B または D S B を生じさせることを
含む、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 2)

前記細胞が、筋細胞または筋前駆細胞である、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記 1 または複数の DNA エンドヌクレアーゼが、C a s 1、C a s 1 B、C a s 2、C a s 3、C a s 4、C a s 5、C a s 6、C a s 7、C a s 8、C a s 9 (また、C s n 1 および C s x 1 2 としても公知である)、C a s 1 0 0、C s y 1、C s y 2、C s y 3、C s e 1、C s e 2、C s c 1、C s c 2、C s a 5、C s n 2、C s m 2、C s m 3、C s m 4、C s m 5、C s m 6、C m r 1、C m r 3、C m r 4、C m r 5、C m r 6、C s b 1、C s b 2、C s b 3、C s x 1 7、C s x 1 4、C s x 1 0、C s x 1 6、C s a X、C s x 3、C s x 1、C s x 1 5、C s f 1、C s f 2、C s f 3、C s f 4、もしくは C p f 1 エンドヌクレアーゼ；これらの相同体、これらの天然に存在する分子の組換え体、これらのコドン最適化体、またはこれらの修飾形、およびこれらの組合せである、項目 1、7、または 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 4)

前記細胞へと、前記 1 または複数の DNA エンドヌクレアーゼをコードする、1 または複数のポリヌクレオチドを導入するステップを含む、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 5)

前記細胞へと、前記 1 または複数の DNA エンドヌクレアーゼをコードする、1 または複数のリボ核酸 (RNA) を導入するステップを含む、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記 1 もしくは複数のポリヌクレオチド、または 1 もしくは複数の RNA が、1 もしくは複数の修飾ポリヌクレオチド、または 1 もしくは複数の修飾 RNA である、項目 1 4 または 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記 1 または複数の DNA エンドヌクレアーゼが、1 または複数のタンパク質またはポリペプチドである、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記細胞へと、1 または複数のガイドリボ核酸 (g RNA) を導入するステップをさらに含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 9)

前記 1 または複数の g RNA が、単一分子ガイド RNA (s g RNA) である、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記 1 もしくは複数の g RNA、または 1 もしくは複数の s g RNA が、1 もしくは複数の修飾 g RNA、または 1 もしくは複数の修飾 s g RNA である、項目 1 8 または 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記 1 または複数の DNA エンドヌクレアーゼを、1 もしくは複数の g RNA、または 1 もしくは複数の s g RNA とあらかじめ複合体化させる、項目 1 8 から 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記細胞へと、野生型ジストロフィンの遺伝子または c DNA の少なくとも一部分を含むポリヌクレオチドドナー鋳型を導入するステップをさらに含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 3)

前記野生型ジストロフィンの遺伝子または c DNA の前記少なくとも一部分が、エクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5、エクソン 6、エクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 10、エクソン 11、エクソン 12、エクソン 13、エクソン 14、エクソン 15、エクソン 16、エクソン 17、エクソン 18、エクソン 19、エクソン 20、エクソン 21、エクソン 22、エクソン 23、エクソン 24、エクソン 25、エクソン 26、エクソン 27、エクソン 28、エクソン 29、エクソン 30、エクソン 31、エクソン 32、エクソン 33、エクソン 34、エクソン 35、エクソン 36、エクソン 37、エクソン 38、エクソン 39、エクソン 40、エクソン 41、エクソン 4

2、エクソン43、エクソン44、エクソン45、エクソン46、エクソン47、エクソン48、エクソン49、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53、エクソン54、エクソン55、エクソン56、エクソン57、エクソン58、エクソン59、エクソン60、エクソン61、エクソン62、エクソン63、エクソン64、エクソン65、エクソン66、エクソン67、エクソン68、エクソン69、エクソン70、エクソン71、エクソン72、エクソン73、エクソン74、エクソン75、エクソン76、エクソン77、エクソン78、エクソン79、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくはcDNA全体の少なくとも一部を含む、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記野生型ジストロフィンの遺伝子またはcDNAの前記少なくとも一部分が、エクソン1、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン10、エクソン11、エクソン12、エクソン13、エクソン14、エクソン15、エクソン16、エクソン17、エクソン18、エクソン19、エクソン20、エクソン21、エクソン22、エクソン23、エクソン24、エクソン25、エクソン26、エクソン27、エクソン28、エクソン29、エクソン30、エクソン31、エクソン32、エクソン33、エクソン34、エクソン35、エクソン36、エクソン37、エクソン38、エクソン39、エクソン40、エクソン41、エクソン42、エクソン43、エクソン44、エクソン45、エクソン46、エクソン47、エクソン48、エクソン49、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53、エクソン54、エクソン55、エクソン56、エクソン57、エクソン58、エクソン59、エクソン60、エクソン61、エクソン62、エクソン63、エクソン64、エクソン65、エクソン66、エクソン67、エクソン68、エクソン69、エクソン70、エクソン71、エクソン72、エクソン73、エクソン74、エクソン75、エクソン76、エクソン77、エクソン78、エクソン79、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくはcDNA全体を含む、項目22に記載の方法。

(項目25)

前記ドナー鋳型が、一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドである、項目22から24のいずれか一項に記載の方法。

(項目26)

前記細胞へと、1または複数のガイドリボ核酸(gRNA)を導入するステップをさらに含み、前記1または複数のDNAエンドヌクレアーゼが、5'ローカスにおける第1のSSBまたはDSBによる切断、および3'ローカスにおける第2のSSBまたはDSBによる切断である1対の一本鎖切断(SSB)または二本鎖切断(DSB)であって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍の前記5'ローカスと前記3'ローカスとの間に、1もしくは複数のエクソン、または異常なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な欠失または置きかえをもたらす、前記ジストロフィンのリーディングフレームの修復、および前記ジストロフィンタンパク質の活性の修復をもたらすSSBまたはDSBを生じさせる1または複数のCas9またはCpf1エンドヌクレアーゼである、項目1、7、または11のいずれか一項に記載の方法。

(項目27)

1つのgRNAが、1対のSSBまたはDSBを創出する、項目26に記載の方法。

(項目28)

1つのgRNAが、前記5'ローカス、前記3'ローカス、または前記5'ローカスと3'ローカスとの間のセグメントと相補的であるスパーサー配列を含む、項目26に記載の方法。

(項目29)

第1のgRNAおよび第2のgRNAを含み、前記第1のgRNAが、前記5'ローカスのセグメントと相補的であるスパーサー配列を含み、前記第2のgRNAが、前記3'

ローカスのセグメントと相補的であるスパーサー配列を含む、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記 1 または複数の g R N A が、 1 または複数の単一分子ガイド R N A (s g R N A) である、項目 2 6 から 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1)

前記 1 もしくは複数の g R N A、または 1 もしくは複数の s g R N A が、 1 もしくは複数の修飾 g R N A、または 1 もしくは複数の修飾 s g R N A である、項目 2 6 から 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2)

前記 1 または複数の D N A エンドヌクレアーゼを、 1 もしくは複数の g R N A、または 1 もしくは複数の s g R N A とあらかじめ複合体化させる、項目 2 6 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3)

前記 5 ' ローカスと前記 3 ' ローカスとの間に染色体 D N A の欠失が存在する、項目 2 6 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4)

前記欠失が、単一エクソンの欠失である、項目 2 6 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 5)

前記単一エクソンの欠失が、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 4 3、エクソン 4 4、エクソン 4 5、エクソン 4 6、エクソン 5 0、エクソン 5 1、エクソン 5 2、またはエクソン 5 3 の欠失である、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記 5 ' ローカスが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 4 3、エクソン 4 4、エクソン 4 5、エクソン 4 6、エクソン 5 0、エクソン 5 1、エクソン 5 2、およびエクソン 5 3 からなる群から選択される単一エクソンの 5 ' 境界部に対して近位である、項目 3 4 から 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 7)

前記 3 ' ローカスが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 4 3、エクソン 4 4、エクソン 4 5、エクソン 4 6、エクソン 5 0、エクソン 5 1、エクソン 5 2、およびエクソン 5 3 からなる群から選択される単一エクソンの 3 ' 境界部に対して近位である、項目 3 4 から 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 8)

前記 5 ' ローカスが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 4 3、エクソン 4 4、エクソン 4 5、エクソン 4 6、エクソン 5 0、エクソン 5 1、エクソン 5 2、およびエクソン 5 3 からなる群から選択される単一エクソンの 5 ' 境界部に対して近位であり、前記 3 ' ローカスが、これらの前記 3 ' 境界部に対して近位である、項目 3 4 から 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 9)

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンの周囲のスプライスドナーおよびアクセプターを含む、項目 3 6 から 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 0)

前記欠失が、マルチエクソンの欠失である、項目 2 6 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 1)

前記マルチエクソンの欠失が、エクソン 4 5 ~ 5 3 またはエクソン 4 5 ~ 5 5 の欠失である、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記 5 ' ローカスが、エクソン 4 5 ~ 5 3 およびエクソン 4 5 ~ 5 5 からなる群から選択される複数のエクソンの 5 ' 境界部に対して近位である、項目 4 0 から 4 1 のいずれか

一項に記載の方法。

(項目43)

前記3'ローカスが、エクソン45～53およびエクソン45～55からなる群から選択される複数のエクソンの3'境界部に対して近位である、項目40から42のいずれか一項に記載の方法。

(項目44)

前記5'ローカスが、エクソン45～53およびエクソン45～55からなる群から選択される複数のエクソンの5'境界部に対して近位であり、3'ローカスが、これらの3'境界部に対して近位である、項目40から43のいずれか一項に記載の方法。

(項目45)

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンの周囲のスプライスドナーおよびアクセプターを含む、項目42から44のいずれか一項に記載の方法。

(項目46)

前記5'ローカスと前記3'ローカスとの間に染色体DNAの置きかえが存在する、項目26から32のいずれか一項に記載の方法。

(項目47)

前記置きかえが、単一エクソンの置きかえである、項目26から32または46のいずれか一項に記載の方法。

(項目48)

前記単一エクソンの置きかえが、エクソン2、エクソン8、エクソン43、エクソン44、エクソン45、エクソン46、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53、またはエクソン70の置きかえである、項目26から32または46から47のいずれか一項に記載の方法。

(項目49)

前記5'ローカスが、エクソン2、エクソン8、エクソン43、エクソン44、エクソン45、エクソン46、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53、またはエクソン70からなる群から選択される単一エクソンの5'境界部に対して近位である、項目47から48のいずれか一項に記載の方法。

(項目50)

前記3'ローカスが、エクソン2、エクソン8、エクソン43、エクソン44、エクソン45、エクソン46、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53、またはエクソン70からなる群から選択される単一エクソンの3'境界部に対して近位である、項目47から49のいずれか一項に記載の方法。

(項目51)

前記5'ローカスが、エクソン2、エクソン8、エクソン43、エクソン44、エクソン45、エクソン46、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53、またはエクソン70からなる群から選択される単一エクソンの5'境界部に対して近位であり、3'ローカスが、これらの3'境界部に対して近位である、項目47から50のいずれか一項に記載の方法。

(項目52)

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンまたは隣接エクソンの周囲のスプライスドナーおよびアクセプターを含む、項目49から51のいずれか一項に記載の方法。

(項目53)

前記置きかえが、マルチエクソンの置きかえである、項目26から32または46のいずれか一項に記載の方法。

(項目54)

前記マルチエクソンの置きかえが、エクソン45～53またはエクソン45～55の置きかえである、項目53に記載の方法。

(項目55)

前記 5' ローカスが、エクソン 45 ~ 53 およびエクソン 45 ~ 55 からなる群から選択される複数のエクソンの 5' 境界部に対して近位である、項目 53 から 54 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 56)

前記 3' ローカスが、エクソン 45 ~ 53 およびエクソン 45 ~ 55 からなる群から選択される複数のエクソンの 3' 境界部に対して近位である、項目 53 から 55 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 57)

前記 5' ローカスが、エクソン 45 ~ 53 およびエクソン 45 ~ 55 からなる群から選択される複数のエクソンの 5' 境界部に対して近位であり、3' ローカスが、これらの 3' 境界部に対して近位である、項目 53 から 56 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 58)

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンの周囲のスプライスドナーおよびアクセプターを含む、項目 55 から 57 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 59)

前記細胞へと、野生型ジストロフィンの遺伝子または cDNA の少なくとも一部分を含むポリヌクレオチドドナー鋳型を導入するステップをさらに含み、前記置きかえが、相同性により導かれる修復 (HDR) によるものである、項目 46 から 58 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 60)

前記野生型ジストロフィンの遺伝子または cDNA の前記少なくとも一部分が、エクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5、エクソン 6、エクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 10、エクソン 11、エクソン 12、エクソン 13、エクソン 14、エクソン 15、エクソン 16、エクソン 17、エクソン 18、エクソン 19、エクソン 20、エクソン 21、エクソン 22、エクソン 23、エクソン 24、エクソン 25、エクソン 26、エクソン 27、エクソン 28、エクソン 29、エクソン 30、エクソン 31、エクソン 32、エクソン 33、エクソン 34、エクソン 35、エクソン 36、エクソン 37、エクソン 38、エクソン 39、エクソン 40、エクソン 41、エクソン 42、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 47、エクソン 48、エクソン 49、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、エクソン 54、エクソン 55、エクソン 56、エクソン 57、エクソン 58、エクソン 59、エクソン 60、エクソン 61、エクソン 62、エクソン 63、エクソン 64、エクソン 65、エクソン 66、エクソン 67、エクソン 68、エクソン 69、エクソン 70、エクソン 71、エクソン 72、エクソン 73、エクソン 74、エクソン 75、エクソン 76、エクソン 77、エクソン 78、エクソン 79、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくは cDNA 全体の少なくとも一部を含む、項目 59 に記載の方法。

(項目 61)

前記野生型ジストロフィンの遺伝子または cDNA の前記少なくとも一部分が、エクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5、エクソン 6、エクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 10、エクソン 11、エクソン 12、エクソン 13、エクソン 14、エクソン 15、エクソン 16、エクソン 17、エクソン 18、エクソン 19、エクソン 20、エクソン 21、エクソン 22、エクソン 23、エクソン 24、エクソン 25、エクソン 26、エクソン 27、エクソン 28、エクソン 29、エクソン 30、エクソン 31、エクソン 32、エクソン 33、エクソン 34、エクソン 35、エクソン 36、エクソン 37、エクソン 38、エクソン 39、エクソン 40、エクソン 41、エクソン 42、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 47、エクソン 48、エクソン 49、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、エクソン 54、エクソン 55、エクソン 56、エクソン 57、エクソン 58、エクソン 59、エクソン 60、エクソン 61、エクソン 62、エクソン 63、エクソン 64、エクソン

6 5、エクソン 6 6、エクソン 6 7、エクソン 6 8、エクソン 6 9、エクソン 7 0、エクソン 7 1、エクソン 7 2、エクソン 7 3、エクソン 7 4、エクソン 7 5、エクソン 7 6、エクソン 7 7、エクソン 7 8、エクソン 7 9、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくは c D N A 全体を含む、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記細胞へと、1つのガイドリボ核酸 (g R N A) と、野生型ジストロフィンの遺伝子の少なくとも一部分を含むポリヌクレオチドドナー鋳型とを導入するステップをさらに含み、前記 1 または複数の D N A エンドヌクレアーゼが、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍のローカスに、前記ポリヌクレオチドドナー鋳型に由来する新たな配列の、前記ローカスにおける染色体 D N A への挿入を容易とする 1 つの一本鎖切断 (S S B) または二本鎖切断 (D S B) であって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、1もしくは複数のエクソン、または異常なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な挿入または矯正をもたらし、前記ジストロフィンのリーディングフレームの修復、および前記ジストロフィタンパク質の活性の修復をもたらす S S B または D S B を生じさせる 1 または複数の C a s 9 または C p f 1 エンドヌクレアーゼであり、前記 g R N A が、前記ローカスのセグメントと相補的であるスパーサー配列を含む、項目 1、7、または 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 3)

前記細胞へと、1または複数のガイドリボ核酸 (g R N A) と、野生型ジストロフィンの遺伝子の少なくとも一部分を含むポリヌクレオチドドナー鋳型とを導入するステップをさらに含み、前記 1 または複数の D N A エンドヌクレアーゼが、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍に、前記ポリヌクレオチドドナー鋳型に由来する新たな配列の、5 ' ローカスと 3 ' ローカスとの間における染色体 D N A への挿入を容易とする、前記 5 ' ローカスにおける第 1 の切断、および前記 3 ' ローカスにおける第 2 の切断である 1 対の一本鎖切断 (S S B) または二本鎖切断 (D S B) であって、前記ジストロフィン遺伝子内またはその近傍の前記 5 ' ローカスと前記 3 ' ローカスとの間に、1もしくは複数のエクソン、または異常なイントロンのスプライスアクセプターもしくはドナー部位の恒久的な挿入または矯正をもたらし、前記ジストロフィンのリーディングフレームの修復、および前記ジストロフィタンパク質の活性の修復をもたらす S S B または D S B を生じさせる 1 または複数の C a s 9 または C p f 1 エンドヌクレアーゼである、項目 1、7、または 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 4)

1 つの g R N A が、1 対の S S B または D S B を創出する、項目 6 3 に記載の方法。

(項目 6 5)

1 つの g R N A が、前記 5 ' ローカス、前記 3 ' ローカス、または前記 5 ' ローカスと前記 3 ' ローカスとの間のセグメントと相補的であるスパーサー配列を含む、項目 6 3 に記載の方法。

(項目 6 6)

第 1 の g R N A および第 2 の g R N A を含み、前記第 1 の g R N A が、前記 5 ' ローカスのセグメントと相補的であるスパーサー配列を含み、前記第 2 の g R N A が、前記 3 ' ローカスのセグメントと相補的であるスパーサー配列を含む、項目 6 3 に記載の方法。

(項目 6 7)

前記 1 または複数の g R N A が、1 または複数の単一分子ガイド R N A (s g R N A) である、項目 6 2 または 6 3 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記 1 もしくは複数の g R N A、または 1 もしくは複数の s g R N A が、1 もしくは複数の修飾 g R N A、または 1 もしくは複数の修飾 s g R N A である、項目 6 2 から 6 3 または 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 9)

前記 1 または複数の DNA エンドヌクレアーゼを、1 もしくは複数の gRNA、または 1 もしくは複数の sgRNA とあらかじめ複合体化させる、項目 6 2 から 6 3 または 6 7 から 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 0)

前記挿入が、単一エクソンの挿入である、項目 6 2 から 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 1)

前記単一エクソンの挿入が、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 4 3、エクソン 4 4、エクソン 4 5、エクソン 4 6、エクソン 5 0、エクソン 5 1、エクソン 5 2、エクソン 5 3、またはエクソン 7 0 の挿入である、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 2)

前記ローカス、5'ローカスまたは3'ローカスが、エクソン 2、エクソン 8、エクソン 4 3、エクソン 4 4、エクソン 4 5、エクソン 4 6、エクソン 5 0、エクソン 5 1、エクソン 5 2、エクソン 5 3、およびエクソン 7 0 からなる群から選択される単一エクソンの境界部に対して近位である、項目 7 0 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 3)

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンまたは隣接エクソンの周囲のスプライスドナーおよびアクセプターを含む、項目 7 2 に記載の方法。

(項目 7 4)

前記挿入が、マルチエクソンの挿入である、項目 6 2 から 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 5)

前記マルチエクソンの挿入が、エクソン 4 5 ~ 5 3 またはエクソン 4 5 ~ 5 5 の挿入である、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 7 6)

前記ローカス、5'ローカスまたは3'ローカスが、エクソン 4 5 ~ 5 3 またはエクソン 4 5 ~ 5 5 からなる群から選択されるマルチエクソンの境界部に対して近位である、項目 7 4 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 7)

前記エクソンの前記境界部に対する近位が、隣接イントロンの周囲のスプライスドナーおよびアクセプターを含む、項目 7 6 に記載の方法。

(項目 7 8)

前記野生型ジストロフィンの遺伝子または cDNA の少なくとも一部分が、エクソン 1、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5、エクソン 6、エクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 10、エクソン 11、エクソン 12、エクソン 13、エクソン 14、エクソン 15、エクソン 16、エクソン 17、エクソン 18、エクソン 19、エクソン 20、エクソン 21、エクソン 22、エクソン 23、エクソン 24、エクソン 25、エクソン 26、エクソン 27、エクソン 28、エクソン 29、エクソン 30、エクソン 31、エクソン 32、エクソン 33、エクソン 34、エクソン 35、エクソン 36、エクソン 37、エクソン 38、エクソン 39、エクソン 40、エクソン 41、エクソン 42、エクソン 43、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 46、エクソン 47、エクソン 48、エクソン 49、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53、エクソン 54、エクソン 55、エクソン 56、エクソン 57、エクソン 58、エクソン 59、エクソン 60、エクソン 61、エクソン 62、エクソン 63、エクソン 64、エクソン 65、エクソン 66、エクソン 67、エクソン 68、エクソン 69、エクソン 70、エクソン 71、エクソン 72、エクソン 73、エクソン 74、エクソン 75、エクソン 76、エクソン 77、エクソン 78、エクソン 79、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくは cDNA 全体の少なくとも一部を含む、項目 6 2 または 6 3 に記載の方法。

(項目 7 9)

前記野生型ジストロフィンの遺伝子またはcDNAの少なくとも一部分が、エクソン1、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン10、エクソン11、エクソン12、エクソン13、エクソン14、エクソン15、エクソン16、エクソン17、エクソン18、エクソン19、エクソン20、エクソン21、エクソン22、エクソン23、エクソン24、エクソン25、エクソン26、エクソン27、エクソン28、エクソン29、エクソン30、エクソン31、エクソン32、エクソン33、エクソン34、エクソン35、エクソン36、エクソン37、エクソン38、エクソン39、エクソン40、エクソン41、エクソン42、エクソン43、エクソン44、エクソン45、エクソン46、エクソン47、エクソン48、エクソン49、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53、エクソン54、エクソン55、エクソン56、エクソン57、エクソン58、エクソン59、エクソン60、エクソン61、エクソン62、エクソン63、エクソン64、エクソン65、エクソン66、エクソン67、エクソン68、エクソン69、エクソン70、エクソン71、エクソン72、エクソン73、エクソン74、エクソン75、エクソン76、エクソン77、エクソン78、エクソン79、イントロン領域、合成イントロン領域、断片、これらの組合せ、またはジストロフィン遺伝子もしくはcDNA全体を含む、項目62または63に記載の方法。

(項目80)

前記挿入が、相同性により導かれる修復(HDR)によるものである、項目62から79のいずれか一項に記載の方法。

(項目81)

前記ドナー鋳型が、一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチドである、項目62から80のいずれか一項に記載の方法。

(項目82)

前記Cas9またはCpf1の、mRNA、gRNA、およびドナー鋳型を、各々別個の脂質ナノ粒子へと製剤化するか、またはこれらの全てを、脂質ナノ粒子へと共製剤化する、項目26から81のいずれか一項に記載の方法。

(項目83)

前記Cas9またはCpf1のmRNAを、脂質ナノ粒子へと製剤化し、前記gRNAおよびドナー鋳型の両方を、前記細胞へと、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターにより送達する、項目26から81のいずれか一項に記載の方法。

(項目84)

前記Cas9またはCpf1のmRNAを、脂質ナノ粒子へと製剤化し、前記gRNAを、前記細胞へと、電気穿孔により送達し、ドナー鋳型を、前記細胞へと、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターにより送達する、項目26から81のいずれか一項に記載の方法。

(項目85)

前記ジストロフィン遺伝子が、X染色体:31,117,228~33,344,609(Genome Reference Consortium:GRCh38/hg38)に位置する、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目86)

デュシェンヌ型筋ジストロフィーを伴う患者に由来する細胞内のジストロフィン遺伝子を編集するための、1または複数のガイドRNA(gRNA)であって、配列表の配列番号1~1,410,472内の核酸配列からなる群から選択されるスペーサー配列を含む、1または複数のgRNA。

(項目87)

1または複数の単一分子ガイドRNA(sgRNA)である、項目86に記載の、1または複数のgRNA。

(項目88)

前記1もしくは複数のgRNA、または1もしくは複数のsgRNAが、1もしくは複

数の修飾 g R N A、または 1 もしくは複数の修飾 s g R N A である、項目 8 6 または 8 7 に記載の、 1 または複数の g R N A または s g R N A。