

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-502346
(P2025-502346A)

(43)公表日 令和7年1月24日(2025.1.24)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0	4 C 0 8 4
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02		4 C 0 8 7
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	
		審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	(全86頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-542251(P2024-542251)		(71)出願人	524265552	
(86)(22)出願日	令和5年1月10日(2023.1.10)			エピジェニック・セラピューティクス・	
(85)翻訳文提出日	令和6年9月11日(2024.9.11)			インコーポレイテッド	
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/071521			E P I G E N I C T H E R A P E U T	
(87)国際公開番号	WO2023/134658			I C S , I N C .	
(87)国際公開日	令和5年7月20日(2023.7.20)			中華人民共和国 2 0 0 1 3 1 シャンハイ	
(31)優先権主張番号	PCT/CN2022/071930			、プドン・ニュー・エリア、チャイナ・	
(32)優先日	令和4年1月14日(2022.1.14)			(シャンハイ)・パイロット・フリー・	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)			トレード・ゾーン、バージョン・ロード	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		(74)代理人	100145403	
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),			弁理士 山尾 憲人	
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(		(74)代理人	100106518	
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,			弁理士 松谷 道子	
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV				
	最終頁に続く			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 V E G F を調節する方法およびその使用

(57)【要約】

本発明は、特に少なくとも1つのDNA結合性タンパク質および遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターを含む融合分子を含む組成物を提供し、融合分子はV E G F 遺伝子の近傍および／またはV E G F 制御エレメント内のゲノム領域を標的とし、遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、前記V E G F 遺伝子の近傍および／またはV E G F 制御エレメント内の少なくとも1つのヌクレオチドの改変を提供する。本発明はまた、インビボにおけるV E G F 遺伝子産物の低減または排除の方法、およびそれらの使用を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質および遺伝子発現の少なくとも 1 つのモジュレーターを含む融合分子、または前記融合分子をコードする核酸配列を含む組成物であって、前記融合分子が VEGF 遺伝子の近傍および／または VEGF 制御エレメント内のゲノム領域を標的とし、遺伝子発現の前記少なくとも 1 つのモジュレーターが、前記 VEGF 遺伝子の近傍および／または VEGF 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変を提供し、

遺伝子発現の前記少なくとも 1 つのモジュレーターが、DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT)、DNA デメチラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼもしくはその一部、またはジンクフィンガータンパク質系転写因子もしくはその一部、またはそれらの組合せを含み、

前記少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質が、Cas9、dCas9、Cpf1、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZNF)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、ホーミングエンドヌクレアーゼ、dCas9-FokI ヌクレアーゼ、または MegaTal ヌクレアーゼである、組成物。

【請求項 2】

前記 VEGF 遺伝子が VEGF-A 遺伝子である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 VEGF 制御エレメントが、転写開始部位、コアプロモーター、近位プロモーター、遠位エンハンサー、サイレンサー、インシュレーターエレメント、境界エレメント、または遺伝子座制御領域である、請求項 2 または 3 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記 VEGF 遺伝子近傍および／または VEGF 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変が、前記 VEGF 遺伝子の転写開始部位の約 100 bp、約 200 bp、約 300 bp、約 400 bp、約 500 bp、約 600 bp、約 700 bp、約 800 bp、約 900 bp、約 1000 bp、約 1100 bp、約 1200 bp、約 1300 bp、約 1400 bp、または約 1500 bp 以内上流に位置している、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 VEGF 遺伝子近傍および／または VEGF 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変が、前記 VEGF 遺伝子の転写開始部位の約 100 bp、約 200 bp、約 300 bp、約 400 bp、約 500 bp、約 600 bp、約 700 bp、約 800 bp、約 900 bp、約 1000 bp、約 1100 bp、約 1200 bp、約 1300 bp、約 1400 bp、または約 1500 bp 以内下流に位置している、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 VEGF 遺伝子近傍および／または VEGF 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変が、前記 VEGF 遺伝子の転写開始部位の 500 bp 上流から 500 bp 下流まで以内に位置している、請求項 4 または 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 VEGF 遺伝子近傍および／または VEGF 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変が、前記 VEGF 遺伝子の転写開始部位の 300 bp 上流から 300 bp 下流まで以内に位置している、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

VEGF 遺伝子近傍および／または VEGF 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変が、前記 VEGF 遺伝子の転写開始部位の 1000 bp 以内上流から転写開始部位の 300 bp 以内下流に位置している、請求項 4 または 5 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変が DNA のメチル化である、請求項 1 から 8

10

20

30

40

50

のいずれかに記載の組成物。

【請求項 10】

遺伝子発現の前記少なくとも 1 つのモジュレーターが、DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT)、ジंकフィンガータンパク質系転写因子、それらの一部、およびそれらの任意の組合せから選択される 1 つまたは複数を含む、前記請求項のいずれかに記載の組成物。

【請求項 11】

遺伝子発現の前記少なくとも 1 つのモジュレーターが、DNA メチルトランスフェラーゼまたはその一部、およびジंकフィンガータンパク質系転写因子またはその一部を含む、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記 DNA メチルトランスフェラーゼが、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L、DNMT1、または DNMT2 である、請求項 10 または 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 DNMT3A が配列番号 23 のアミノ酸配列を含み、および／または前記 DNMT3L が配列番号 24 のアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記ジंकフィンガータンパク質系転写因子が Kruppel 関連抑制ボックス (KRAB) である、請求項 10 または 11 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記 KRAB が配列番号 22 のアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 DNA メチルトランスフェラーゼが DNMT3A および DNMT3L ならびにそれらの組合せから選択され、ジंकフィンガータンパク質系転写因子が KRAB である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質が、Cas9、dCas9、Cpf1、ジंकフィンガーヌクレアーゼ (ZNF)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、ホーミングエンドヌクレアーゼ、dCas9-FokI ヌクレアーゼ、または MegaTal ヌクレアーゼである、前記請求項のいずれかに記載の組成物。

【請求項 18】

前記少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質が dCas9 である、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記 dCas9 が、スタフィロコッカス・アウレウス dCas9、ストレプトコッカス・ピオゲネス dCas9、カンピロバクター・ジェジュニ dCas9、コリネバクテリウム・ジフテリア dCas9、ユーバクテリウム・ベントリオスム dCas9、ストレプトコッカス・パスチュリアヌス dCas9、ラクトバチルス・ファルシミニス dCas9、スピロヘータ・グロブス dCas9、アゾスピリルム (例えば B510 株) dCas9、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス dCas9、ネイセリア・シネレア dCas9、ロゼブリア・インテスティナリス dCas9、パルビバクルム・ラバメンチボランス dCas9、ニトラチフラクター・サルスギニス (例えば DSM 16511 株) dCas9、カンピロバクター・ラリ (例えば CF89-12 株) dCas9、ストレプトコッカス・サーモフィルス (例えば LMD-9 株) dCas9 を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記 dCas9 が配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記融合分子が、前記少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質の C 末端、N 末端、またはその両方に融合した遺伝子発現の前記少なくとも 1 つのモジュレーターを含む、前記

10

20

30

40

50

請求項のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 2】

遺伝子発現の前記少なくとも 1 つのモジュレーターが、前記少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質に直接融合している、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

遺伝子発現の前記少なくとも 1 つのモジュレーターが、非モジュレーター、第 2 のモジュレーター、またはリンカーを介して、前記少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質と間接的に融合している、請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記融合分子が、C 末端で K R A B と、N 末端で D N M T 3 A および D N M T 3 L と融合した d C a s 9 を含む、請求項 2 1 から 2 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記融合分子が配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記融合分子が少なくとも 1 つの核局在化配列をさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記少なくとも 1 つの核局在化配列が、前記少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質の C 末端、N 末端、またはその両方に直接または間接的に融合している、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記融合分子をコードする核酸配列が、デオキシリボ核酸 (DNA) またはメッセンジャーリボ核酸 (mRNA) である、前記請求項のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 9】

前記 V E G F 遺伝子近傍および／または V E G F 制御エレメント内の標的 DNA 配列と相補的である少なくとも 1 つのシングルガイド RNA (sgRNA) をさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の組成物。

【請求項 3 0】

前記標的 DNA 配列が、V E G F (例えば V E G F - A) 遺伝子の転写開始部位の約 1 0 0 b p、約 2 0 0 b p、約 3 0 0 b p、約 4 0 0 b p、約 5 0 0 b p、約 6 0 0 b p、約 7 0 0 b p、約 8 0 0 b p、約 9 0 0 b p、約 1 0 0 0 b p、約 1 1 0 0 b p、約 1 2 0 0 b p、約 1 3 0 0 b p、約 1 4 0 0 b p、または約 1 5 0 0 b p 以内上流または下流に位置している、請求項 2 9 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記 sgRNA が配列番号 2 9 ~ 5 8 および 6 0 ~ 8 4 の核酸配列を含む、請求項 2 9 または 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記融合分子がリボソームまたは脂質ナノ粒子の中にパッケージングされている、前記請求項のいずれかに記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記融合分子および sgRNA が、リボソームまたは脂質ナノ粒子の中にパッケージングされている、請求項 2 9 から 3 1 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記融合分子および sgRNA が、同じリボソームもしくは脂質ナノ粒子、または異なるリボソームもしくは脂質ナノ粒子の中にパッケージングされている、請求項 3 3 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記リボソームまたは脂質ナノ粒子が、イオン化可能な脂質 (モル比 2 0 % ~ 7 0 %)、P E G 化脂質 (モル比 0 % ~ 3 0 %)、支持脂質 (モル比 3 0 % ~ 5 0 %)、およびコレステロール (モル比 1 0 % ~ 5 0 %) からなっている、請求項 3 2 から 3 4 のいずれか

10

20

30

40

50

一項に記載の組成物。

【請求項 36】

前記イオン化可能な脂質が、pH 応答性のイオン化可能な脂質、熱応答性のイオン化可能な脂質、および光応答性のイオン化可能な脂質からなる群から選択される、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記融合分子が AAV ベクターの中にパッケージングされている、請求項 1 から 31 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 38】

前記融合分子および sgRNA が、AAV ベクターの中にパッケージングされている、請求項 29 から 31 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 39】

前記融合分子および sgRNA が、同じ AAV ベクターの中または異なる AAV ベクターの中にパッケージングされている、請求項 38 に記載の組成物。

【請求項 40】

薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である、前記請求項のいずれかに記載の組成物。

【請求項 41】

VEGF 遺伝子の近傍および／または VEGF 制御エレメント内に位置し、VEGF 遺伝子の転写開始部位の 500 bp 上流から 500 bp 下流まで以内に位置してもよい、標的 DNA 配列と相補的な配列を含む sgRNA。

20

【請求項 42】

配列番号 29～58 および 60～84 のいずれか 1 つの核酸配列を含み、配列番号 59 で説明される tracr 配列をさらに含んでもよい、請求項 41 に記載の sgRNA。

【請求項 43】

前記 VEGF 遺伝子が、哺乳動物、例えばヒト、サル、マウス、ラット、およびウサギ由来の VEGF-A 遺伝子である、請求項 41 または 42 に記載の sgRNA。

【請求項 44】

請求項 41 から 43 のいずれか一項に記載の sgRNA をコードする核酸分子。

【請求項 45】

(a) 少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質および遺伝子発現の少なくとも 1 つのモジュレーターを含む融合分子、または前記融合分子をコードする核酸配列、および

30

(b) 請求項 41 から 43 のいずれか一項に記載の sgRNA および前記少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質に結合することができるタンパク質結合配列を含むガイド分子、または前記ガイド分子をコードする核酸配列を含む組成物であって、

遺伝子発現の前記少なくとも 1 つのモジュレーターが、前記 VEGF 遺伝子の近傍および／または VEGF 制御エレメント内に少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変を提供する、組成物。

【請求項 46】

細胞における VEGF 遺伝子産物の発現を低減または排除する方法であって、請求項 1 から 40 および 44 のいずれか一項に記載の組成物を前記細胞に導入し、それにより、前記細胞における前記 VEGF 遺伝子産物の発現を低減または排除する工程を含む方法。

40

【請求項 47】

対象における VEGF 遺伝子産物の発現を低減または排除するインビボの方法であって、請求項 1 から 40 および 44 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象の細胞に導入し、それにより、前記対象における前記 VEGF 遺伝子産物の発現を低減または排除する工程を含む方法。

【請求項 48】

対象における VEGF 関連障害の症状を処置または軽減する方法であって、有効量の請

50

求項 1 から 4 0 および 4 4 のいずれか一項に記載の組成物を前記対象の細胞に導入する工程を含む方法。

【請求項 4 9】

前記対象が、哺乳動物、例えばヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウマ、ネコ、およびイヌである、請求項 4 7 または 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 V E G F 関連障害が血管新生を伴う、請求項 4 8 または 4 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 1】

前記 V E G F 関連障害が新生血管障害、例えば加齢性黄斑変性 (A M D) を含む眼科新生血管障害である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記細胞が、網膜細胞、網膜色素上皮 (R P E) 細胞、または脈絡膜細胞である、請求項 4 6 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記融合分子が眼内注射および硝子体内注射等の局所注射によって前記対象に送達される、請求項 4 7 から 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

対象における V E G F 関連障害の症状の処置または軽減における使用のための、請求項 1 から 4 0 および 4 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5 5】

前記 V E G F 関連障害が新生血管障害、例えば加齢性黄斑変性 (A M D) を含む眼科新生血管障害である、請求項 5 4 に記載の使用のための組成物。

【請求項 5 6】

対象における V E G F 関連障害の症状の処置または軽減のための医薬の製造における、請求項 1 から 4 0 および 4 4 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 5 7】

請求項 1 から 4 0 および 4 4 のいずれか一項に記載の組成物を含む容器を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示は一般に、分子生物学、免疫学、および医学の分野に関する。より詳細には、本開示は、インビボ (in vivo) における V E G F 遺伝子産物の標的化された低減または排除における使用のための C R I S P R / C a s 9 系融合分子およびその使用の方法に関する。

【0 0 0 2】

本出願は、本出願とともに電子フォーマットで提出され、それにより参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。

【背景技術】

【0 0 0 3】

哺乳動物細胞内の任意の遺伝子を標的とするようにカスタマイズすることができる操作された D N A 結合性タンパク質は生医学研究における急速な進歩を可能にしており、遺伝子治療のための有望なプラットフォームである。R N A によってガイドされる C R I S P R - C a s 9 システムは、プログラム可能な標的遺伝子制御のための有望なプラットフォームとして出現した。触媒として不活性な「デッド」C a s 9 (d C a s 9) の K r u p p e l 関連ボックス (K R A B) ドメインへの融合により、細胞培養実験における標的遺伝子の高度に特異的かつ強力な調節またはサイレンシングが可能な合成リプレッサーが生成される。

【0 0 0 4】

しかし、合成 d C a s 9 - K R A B 融合タンパク質を用いる内因性遺伝子の持続的な調

10

20

30

40

50

節およびサイレンシングは、インビボ治療における使用のためには困難であった。合成リプレッサーは、ウイルス系ベクターデリバリー法におけるサイズパッケージングの限界を超えている。安全性、毒性、免疫原性、およびオフターゲット効果は、インビボにおける合成リプレッサーの使用を制限する他の困難である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

遺伝子操作された合成遺伝子リプレッサーを生成するための代替のアプローチおよび治療薬としての使用のための合成遺伝子リプレッサーのインビボデリバリーに対するニーズが当技術で存在する。本開示は、当技術におけるこの満たされていないニーズに対処する。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

一態様では、本開示は、血管内皮増殖因子（VEGF）遺伝子の転写開始部位の500bp上流から500bp下流まで以内に位置する標的DNA配列と相補的な配列を含むsgRNAを提供する。

【0007】

一部の実施形態では、sgRNAは、配列番号29～58および60～84のいずれか1つの核酸配列を含む。

【0008】

一部の実施形態では、VEGF遺伝子は、哺乳動物、例えばヒト、サル、マウス、ラット、およびウサギ由来のVEGF-A遺伝子である。

【0009】

一態様では、本開示は、本明細書で開示するsgRNAをコードするDNA配列を提供する。

【0010】

一態様では、本開示は、

（a）少なくとも1つのDNA結合性タンパク質および遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターを含む融合分子、または融合分子をコードする核酸配列、および

（b）本明細書で開示するsgRNAおよび少なくとも1つのDNA結合性タンパク質に結合することができるタンパク質結合配列を含むガイド分子、またはガイド分子をコードする核酸配列

20

30

を含む組成物を提供し、

遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、VEGF遺伝子の近傍および／またはVEGF制御エレメント内に少なくとも1つのヌクレオチドの改変を提供する。

【0011】

一部の実施形態では、本明細書に記載する遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、VEGF遺伝子の転写開始部位の1,000bp上流から1,000bp下流まで以内に少なくとも1つのヌクレオチドの改変を提供する。

【0012】

一態様では、本開示は、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質および遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターを含む融合分子、または融合分子をコードする核酸配列を含む組成物を提供し、融合分子はVEGF遺伝子の近傍および／またはVEGF制御エレメント内のゲノム領域を標的とし、遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、VEGF遺伝子の近傍および／またはVEGF制御エレメント内の少なくとも1つのヌクレオチドの改変を提供する。

40

【0013】

一部の実施形態では、遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、DNAメチルトランスフェラーゼ（DNMT）、DNAデメチラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼもしくはその一部、またはジンクフィンガータンパク質系転

50

写因子もしくはその一部、またはそれらの組合せを含む。

【0014】

一部の実施形態では、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質は、Cas9、dCas9、Cpf1、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZNF）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、ホーミングエンドヌクレアーゼ、dCas9-FokIヌクレアーゼ、またはMegaTalヌクレアーゼである。

【0015】

一部の実施形態では、VEGF遺伝子は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、またはVEGF-E遺伝子である。

【0016】

一部の実施形態では、VEGF制御エレメントは、転写開始部位、コアプロモーター、近位プロモーター、遠位エンハンサー、サイレンサー、インシュレーターエレメント、境界エレメント、または遺伝子座制御領域である。

【0017】

一部の実施形態では、VEGF遺伝子近傍および／またはVEGF制御エレメント内の少なくとも1つのヌクレオチドの改変は、VEGF遺伝子の転写開始部位の約100bp、約200bp、約300bp、約400bp、約500bp、約600bp、約700bp、約800bp、約900bp、約1000bp、約1100bp、約1200bp、約1300bp、約1400bp、または約1500bp以内上流または下流に位置している。

【0018】

一部の実施形態では、VEGF遺伝子近傍および／またはVEGF制御エレメント内の少なくとも1つのヌクレオチドの改変は、VEGF遺伝子の転写開始部位の500bp以内上流または下流に位置している。

【0019】

一部の実施形態では、VEGF遺伝子近傍および／またはVEGF制御エレメント内の少なくとも1つのヌクレオチドの改変は、VEGF遺伝子の転写開始部位の300bp以内上流または下流に位置している。

【0020】

一部の実施形態では、VEGF遺伝子近傍および／またはVEGF制御エレメント内の少なくとも1つのヌクレオチドの改変は、VEGF遺伝子の転写開始部位の1000bp以内上流から転写開始部位の300bp以内下流に位置している。

【0021】

一部の実施形態では、少なくとも1つのヌクレオチドの改変はDNAのメチル化である。

【0022】

一部の実施形態では、遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、DNAメチルトランスフェラーゼ（DNMT）、ジンクフィンガータンパク質系転写因子、それらの一部、およびそれらの任意の組合せから選択される1つまたは複数を含む。DNAメチルトランスフェラーゼは、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L、DNMT1、および／またはDNMT2であってよい。

【0023】

一部の実施形態では、DNMT3Aは配列番号23のアミノ酸配列を含み、および／またはDNMT3Lは配列番号24のアミノ酸配列を含む。

【0024】

一部の実施形態では、ジンクフィンガータンパク質系転写因子はKruppel関連抑制ボックス（KRAB）である。具体的には、KRABは配列番号22のアミノ酸配列を含んでよい。

【0025】

一部の実施形態では、遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、DNAメチル

10

20

30

40

50

トランスフェラーゼまたはその一部、およびジンクフィンガータンパク質系転写因子またはその一部を含む。具体的には、DNAメチルトランスフェラーゼはDNMT3AおよびDNMT3Lならびにそれらの組合せから選択してよく、ジンクフィンガータンパク質系転写因子はKRABであってよい。

【0026】

一部の実施形態では、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質は、Cas9、dCas9、Cpf1、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZNF）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、ホーミングエンドヌクレアーゼ、dCas9-FokIヌクレアーゼ、またはMegaTalヌクレアーゼである。例えば、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質はdCas9である。

10

【0027】

一部の実施形態では、dCas9は、スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）dCas9、ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）dCas9、カンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）dCas9、コリネバクテリウム・ジフテリア（*Corynebacterium diphtheria*）dCas9、ユーバクテリウム・ベントリオスム（*Eubacterium ventriosum*）dCas9、ストレプトコッカス・パスチュリアヌス（*Streptococcus pasteurianus*）dCas9、ラクトバチルス・ファルシミニス（*Lactobacillus farciminis*）dCas9、スピロヘータ・グローブス（*Sphaerochaeta globus*）dCas9、アゾスピリillum（*Azospirillum*）（例えばB510株）dCas9、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス（*Gluconacetobacter diazotrophicus*）dCas9、ネイセリア・シネレア（*Neisseria cinerea*）dCas9、ロゼブリア・インテスティナリス（*Roseburia intestinalis*）dCas9、パルビバクルム・ラバメンチボランス（*Parvibaculum lavamentivorans*）dCas9、ニトラチフラクター・サルスギニス（*Nitratifractor salsuginis*）（例えばDSM 16511株）dCas9、カンピロバクター・ラリ（*Campylobacter lari*）（例えばCF89-12株）dCas9、ストレプトコッカス・サーモフィルス（*Streptococcus thermophilus*）（例えばLMD-9株）dCas9を含む。

20

【0028】

一部の実施形態では、dCas9は配列番号1のアミノ酸配列を含む。

30

【0029】

一部の実施形態では、本明細書で開示する融合分子は、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質のC末端、N末端、またはその両方に融合した遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターを含む。

【0030】

一部の実施形態では、遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質に直接融合している。

【0031】

一部の実施形態では、遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、非モジュレーター、第2のモジュレーター、またはリンカーを介して、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質と間接的に融合している。

40

【0032】

一部の実施形態では、本明細書で開示する融合分子は、C末端でKRABと、N末端でDNMT3AおよびDNMT3Lと融合したdCas9を含む。

【0033】

一部の実施形態では、融合分子は配列番号28のアミノ酸配列を含む。

【0034】

一部の実施形態では、融合分子は少なくとも1つの核局在化配列をさらに含む。少なくとも1つの核局在化配列は、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質のC末端、N末端、またはその両方に直接または間接的に融合してよい。

50

【0035】

一部の実施形態では、融合分子をコードする核酸配列は、デオキシリボ核酸（DNA）またはメッセンジャーリボ核酸（mRNA）である。

【0036】

一部の実施形態では、本明細書で開示する組成物は、VEGF遺伝子近傍および／またはVEGF制御エレメント内の標的DNA配列と相補的である少なくとも1つのシングルガイドRNA（sgRNA）をさらに含む。

【0037】

一部の実施形態では、標的DNA配列は、VEGF遺伝子の転写開始部位の約100bp、約200bp、約300bp、約400bp、約500bp、約600bp、約700bp、約800bp、約900bp、約1000bp、約1100bp、約1200bp、約1300bp、約1400bp、または約1500bp以内上流または下流に位置している。

10

【0038】

一部の実施形態では、sgRNAは配列番号29～58および60～84の核酸配列を含む。

【0039】

一部の実施形態では、融合分子はリボソームまたは脂質ナノ粒子の中にパッケージングされている。

【0040】

一部の実施形態では、融合分子およびsgRNAは、リボソームまたは脂質ナノ粒子の中にパッケージングされている。融合分子およびsgRNAは、同じリボソームもしくは脂質ナノ粒子、または異なるリボソームもしくは脂質ナノ粒子の中にパッケージングされてよい。

20

【0041】

一部の実施形態では、リボソームまたは脂質ナノ粒子は、イオン化可能な脂質（モル比20%～70%）、PEG化脂質（モル比0%～30%）、支持脂質（モル比30%～50%）、およびコレステロール（モル比10%～50%）からなっている。

【0042】

一部の実施形態では、イオン化可能な脂質は、pH応答性のイオン化可能な脂質、熱応答性のイオン化可能な脂質、および光応答性のイオン化可能な脂質からなる群から選択される。

30

【0043】

一部の実施形態では、融合分子はAAVベクターの中にパッケージングされている。

【0044】

一部の実施形態では、融合分子およびsgRNAは、AAVベクターの中にパッケージングされている。融合分子およびsgRNAは、同じAAVベクターの中または異なるAAVベクターの中にパッケージングされてよい。

【0045】

一部の実施形態では、本明細書で開示する組成物は、薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。

40

【0046】

一態様では、本開示は、細胞におけるVEGF遺伝子産物の発現を調節する（例えば低減または排除する）方法であって、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質および遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターを含む融合分子、または融合分子をコードする核酸配列を細胞内に導入する工程を含む方法を提供し、遺伝子発現のモジュレーターはVEGF遺伝子の近傍および／またはVEGF制御エレメント内の少なくとも1つのヌクレオチドの改変を提供し、それにより、細胞におけるVEGF遺伝子産物の発現が調節される（例えば低減または排除される）。

【0047】

50

一態様では、本開示は、対象における V E G F 遺伝子産物の発現を調節する（例えば低減または排除する）インビボの方法であって、少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質および遺伝子発現の少なくとも 1 つのモジュレーターを含む融合分子、または融合分子をコードする核酸配列を対象の細胞に導入する工程を含む方法を提供し、遺伝子発現のモジュレーターは、V E G F 遺伝子の近傍および／または V E G F 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変を提供し、それにより、対象における V E G F 遺伝子産物の発現を調節する（例えば低減または排除する）。

【0048】

一態様では、本開示は、対象における V E G F 関連障害の症状を処置または軽減するための方法であって、少なくとも 1 つの DNA 結合性タンパク質および遺伝子発現の少なくとも 1 つのモジュレーターを含む融合分子、または融合分子をコードする核酸配列を対象の細胞に導入する工程を含む方法を提供し、遺伝子発現のモジュレーターは、V E G F 遺伝子の近傍および／または V E G F 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変を提供し、それにより、対象における V E G F 関連障害の症状が処置または軽減される。

【0049】

一部の実施形態では、V E G F 制御エレメントは、コアプロモーター、近位プロモーター、遠位エンハンサー、サイレンサー、インシュレーターエレメント、境界エレメント、または遺伝子座調節領域である。

【0050】

一部の実施形態では、V E G F 遺伝子近傍および／または V E G F 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変は、V E G F 遺伝子の転写開始部位の約 100 bp、約 200 bp、約 300 bp、約 400 bp、約 500 bp、約 600 bp、約 700 bp、約 800 bp、約 900 bp、約 1000 bp、約 1100 bp、約 1200 bp、約 1300 bp、約 1400 bp、または約 1500 bp 以内上流に位置している。一部の実施形態では、V E G F 遺伝子近傍および／または V E G F 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変は、V E G F 遺伝子の転写開始部位の 1000 bp 以内上流に位置している。一部の実施形態では、V E G F 遺伝子近傍および／または V E G F 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変は、V E G F 遺伝子の転写開始部位の 300 bp 以内上流に位置している。

【0051】

一部の実施形態では、V E G F 遺伝子近傍および／または V E G F 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変は、V E G F 遺伝子の転写開始部位の約 100 bp、約 200 bp、約 300 bp、約 400 bp、約 500 bp、約 600 bp、約 700 bp、約 800 bp、約 900 bp、約 1000 bp、約 1100 bp、約 1200 bp、約 1300 bp、約 1400 bp、または約 1500 bp 以内下流に位置している。一部の実施形態では、V E G F 遺伝子近傍および／または V E G F 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変は、V E G F 遺伝子の転写開始部位の約 300 bp 以内下流に位置している。一部の実施形態では、V E G F 遺伝子近傍および／または V E G F 制御エレメント内の少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変は、V E G F 遺伝子の転写開始部位の 1000 bp 以内上流および転写開始部位の 300 bp 以内下流に位置している。

【0052】

一部の実施形態では、少なくとも 1 つのヌクレオチドの改変は DNA のメチル化である。

【0053】

一部の実施形態では、遺伝子発現の少なくとも 1 つのモジュレーターは、DNA メチルトランスフェラーゼ（DNMT）、DNA デメチラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼまたはその一部を含む。

【0054】

一部の実施形態では、遺伝子発現の少なくとも 1 つのモジュレーターは、DNA メチル

トランスフェラーゼ（DNMT）またはその一部を含む。一部の実施形態では、DNAメチルトランスフェラーゼは、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L、DNMT1、またはDNMT2である。一部の実施形態では、DNMT3Aは配列番号23のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、DNMT3Lは配列番号24のアミノ酸配列を含む。

【0055】

一部の実施形態では、遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、ジンクフィンガータンパク質系転写因子またはその一部を含む。一部の実施形態では、ジンクフィンガータンパク質系転写因子はKruppel関連抑制ボックス（KRAB）である。一部の実施形態では、KRABは配列番号22のアミノ酸配列を含む。

【0056】

一部の実施形態では、遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、DNAメチルトランスフェラーゼまたはその一部、およびジンクフィンガータンパク質系転写因子またはその一部を含む。一部の実施形態では、DNAメチルトランスフェラーゼはDNMT3AおよびDNMT3Lならびにそれらの組合せから選択され、ジンクフィンガータンパク質系転写因子はKRABである。

【0057】

一部の実施形態では、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質は、Cas9、dCas9、Cpf1、ジンクフィンゲルヌクレアーゼ（ZNF）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、ホーミングエンドヌクレアーゼ、dCas9-FokIヌクレアーゼ、またはMegaTalヌクレアーゼである。一部の実施形態では、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質はdCas9である。一部の実施形態では、dCas9は、スタフィロコッカス・アウレウスdCas9、ストレプトコッカス・ピオゲネスdCas9、カンピロバクター・ジェジュニdCas9、コリネバクテリウム・ジフテリアdCas9、ユーバクテリウム・ベントリオスムdCas9、ストレプトコッカス・パストリウスdCas9、ラクトバチルス・ファルシミニスdCas9、スピロヘータ・グロブスdCas9、アゾスピリルム（例えばB510株）dCas9、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクスCas9、ネイセリア・シネラdCas9、ロゼブリア・インテスティナリスdCas9、パルビバクルム・ラバメンチボランスdCas9、ニトラチフラクター・サルスギニス（例えばDSM 16511株）dCas9、カンピロバクター・ラリ（例えばCF89-12株）dCas9、ストレプトコッカス・サーモフィルス（例えばLMD-9株）dCas9を含む。一部の実施形態では、dCas9は配列番号1のアミノ酸配列を含む。

【0058】

一部の実施形態では、融合分子は、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質のC末端、N末端、またはその両方に融合した遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターを含む。

【0059】

一部の実施形態では、遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質に直接融合している。一部の実施形態では、遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターは、非モジュレーター、第2のモジュレーター、またはリンカーを介して、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質と間接的に融合している。一部の実施形態では、融合分子は、C末端でKRABと、N末端でDNMT3AおよびDNMT3Lと融合したdCas9を含む。一部の実施形態では、融合分子は配列番号28のアミノ酸配列を含む。

【0060】

一部の実施形態では、融合分子は少なくとも1つの核局在化配列をさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの核局在化配列は、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質のC末端、N末端、またはその両方に直接融合している。一部の実施形態では、少なくとも1つの核局在化配列は、少なくとも1つのDNA結合性タンパク質のC末端、N末端、またはその両方にリンカーを介して間接的に融合している。

【0061】

一部の実施形態では、融合分子をコードする核酸配列はデオキシリボ核酸（DNA）である。一部の実施形態では、融合分子をコードする核酸配列はメッセンジャーリボ核酸（mRNA）である。

【0062】

一部の実施形態では、本方法は、VEGF遺伝子近傍および／またはVEGF制御エレメント内のDNA配列と相補的である少なくとも1つのシングルガイドRNA（sgRNA）を導入し、それにより、VEGF遺伝子もしくはVEGF制御エレメントを融合分子の標的とし、またはsgRNAをコードするDNAを導入する工程をさらに含む。一部の実施形態では、sgRNAは配列番号29～58および60～84の核酸配列を含む。

10

【0063】

一部の実施形態では、融合分子はリポソームまたは脂質ナノ粒子の中で製剤化される。一部の実施形態では、融合分子およびsgRNAはリポソームまたは脂質ナノ粒子の中で製剤化される。一部の実施形態では、融合分子およびsgRNAは同じリポソームまたは脂質ナノ粒子の中で製剤化される。一部の実施形態では、融合分子およびsgRNAは異なるリポソームまたは脂質ナノ粒子の中で製剤化される。

【0064】

一部の実施形態では、リポソームまたは脂質ナノ粒子は、イオン化可能な脂質（モル比20%～70%）、PEG化脂質（モル比0%～30%）、支持脂質（モル比30%～50%）、およびコレステロール（モル比10%～50%）からなっている。一部の実施形態では、イオン化可能な脂質は、pH応答性のイオン化可能な脂質、熱応答性のイオン化可能な脂質、および光応答性のイオン化可能な脂質からなる群から選択される。

20

【0065】

一部の実施形態では、融合分子はAAVベクターの中で製剤化される。一部の実施形態では、融合分子およびsgRNAは、AAVベクターの中で製剤化される。一部の実施形態では、融合分子およびsgRNAは、同じAAVベクターの中で製剤化される。一部の実施形態では、融合分子およびsgRNAは、異なるAAVベクターの中で製剤化される。

【0066】

一部の実施形態では、融合分子は、局所注射、全身注入、またはそれらの組合せで、細胞に送達される。一部の実施形態では、融合分子は、眼内注射または硝子体内注射によって、対象の眼に送達される。

30

【0067】

一部の実施形態では、対象は、哺乳動物、例えばヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウマ、ネコ、およびイヌである。

【0068】

一部の実施形態では、VEGF関連障害は血管新生を伴う。一部の実施形態では、VEGF関連障害は新生血管障害、例えば加齢性黄斑変性（AMD）を含む眼科新生血管障害である。一部の実施形態では、VEGF関連障害は、ウェット型AMDまたはドライ型AMDである。

40

【0069】

本開示は、配列番号29～58および60～84のいずれか1つの核酸配列を含むsgRNAを提供する。本開示は、本明細書で開示するsgRNAのいずれか1つをコードするDNA配列を提供する。

【0070】

一態様では、対象におけるVEGF関連障害の症状の処置または軽減における使用のための上記の組成物が本明細書で提供される。

【0071】

一部の実施形態では、VEGF関連障害は新生血管障害、例えば加齢性黄斑変性（AMD）を含む眼科新生血管障害である。

50

【0072】

一態様では、対象におけるVEGF関連障害の症状を処置または軽減するための医薬の製造における上記の組成物の使用が本明細書で提供される。

【0073】

一態様では、上記の組成物または融合分子を含む容器を含むキットが本明細書で提供される。

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1】図1Aは、マウスVEGF-A発現を標的とする「EPICAS」二重プラスミドシステムおよびsgRNAタイリングスクリーンデザインを示す概略図である。第1のプラスミド（「触媒タンパク質」プラスミドまたは「融合分子」プラスミド）は、CAGプロモーターの制御下のDNMT3A-DNMT3L（3A3L）-dCas9-KRAB、および2Aエレメントによって分離されたGFPマーカーをコードする。第2のプラスミド（「sgRNA」プラスミド）は、U6プロモーターの制御下のsgRNAスカフォールド、およびCMVプロモーターの制御下のmCherryマーカーを有している。タイリングスクリーンのsgRNAは、マウスVEGF-Aタンパク質コーディング配列（CDS）の転写開始部位（TSS）+250bp上流を標的としている。図1Bは、触媒タンパク質プラスミドおよび種々の単一VEGF sgRNAプラスミドによるマウスN2A細胞株のトランスフェクションの48時間後の相対的mRNA発現を示す棒グラフである。図1Cは、触媒タンパク質プラスミドおよび種々の単一VEGF sgRNAプラスミドまたはVEGF sgRNAプラスミドの混合物によるマウスN2A細胞株のトランスフェクションの1週間後の相対的mRNA発現を示す棒グラフである。図1Dは、VEGF-A遺伝子座の亜硫酸水素塩PCR解析の結果を示す概略図である。それぞれの行は1つの単一クローンを表し、それぞれの列は1つの特定のゲノム位置を示す。黒点はメチル化が成功した部位を表す。

【図2】図2Aは、EPICAS mRNAプラスミドデザインを示す概略図である。EPICAS ORFは、DNMT3A-DNMT3L-dCas9-KRABカセットを含む。プラスミドはXbaIおよびBpiI制限部位で消化され、線状化されたプラスミドを形成することができる。図2Bは、EPICAS mRNAプラスミドから発現され、精製されたmRNAの電気泳動図である。図2Cは、EPICAS mRNAが初代マウス肝細胞内の内因性VEGF-A遺伝子を成功裡にノックダウンできることを示す概略図である。左パネル：初代マウス肝細胞の顕微鏡写真、中央パネル：GFP-P2A-Casoff mRNAおよびsgRNA処理ありとなしでのトランスフェクションの72時間後のGFPの発現を示すフローサイトメトリックグラフ、右パネル：対照とGFP-P2A-Casoff mRNAおよびsgRNAで処理した群の間のGFP陽性細胞における相対的VEGF-A mRNA発現。

【図3】図3Aは、脂質ナノ粒子（LNP）デザインの概略図である。遺伝子外CRISPR/CasエレメントおよびsgRNAエレメントは、LNPによってカプセル化することができる。図3Bは、EPICASを含むLNPを示す透過電子顕微鏡画像である。図3Cは、LNPの粒径分布を示すグラフである。図3Dは、Ai9マウスの眼への脂質ナノ粒子の硝子体内注射によって送達されたルシフェラーゼmRNAのインビボ蛍光イメージングを示す一連の写真である。図3Eは、EPICAS mRNAおよびマウスVEGFを標的とするsgRNAを含むLNPのデリバリーのためのインビボ実験デザインの概略図である。眼の後方領域への注射によってLNPをAi9マウスに投与し、注射の5日後に網膜および脈絡膜におけるVEGF-A遺伝子の発現を解析した。

【図4】図4Aは、293Tレポーター細胞株におけるウサギVEGF-AのsgRNAタイリングスクリーンデザインの概略図である。タイリングスクリーンのsgRNAは、ウサギVEGF-A遺伝子の転写開始部位（TSS）の500bp上流および下流を標的とする。図4Bは、EPICASプラスミドおよびウサギVEGF-Aを標的とするsgRNAによるトランスフェクションの72時間後のレポーター細胞の蛍光強度を示す一連のグ

ラフである。図4Cは、EPICASプラスミドとともに良好なノックダウン効果を有していた、ウサギ細胞内の内因性遺伝子VEGFAを標的とする6種のsgRNAのトランスフェクションの後の、ウサギRK-13細胞におけるVEGFAのmRNA発現を示す一連のグラフである。

【図5】図5Aは、ヒトおよびマウスのVEGF-Aの保存された領域、具体的にはヒトVEGFA遺伝子の転写開始部位(TSS)の300bp上流から300bp下流まで以内を標的とするsgRNAタイリングスクリーンの実験デザインを示す概略図である。

図5Bは、VEGFを標的とする種々のsgRNAを用いるEPICAS二重プラスミドシステムによるトランスフェクションの48時間後のVEGFA mRNA発現を示す一連のグラフである。図5Cは、VEGFを標的とする種々のsgRNAを用いるEPICAS二重プラスミドシステムによるトランスフェクションの96時間後のVEGFA mRNA発現を示す一連のグラフである。

10

【発明を実施するための形態】

【0075】

本開示は、インビボ遺伝子治療における使用のための細胞内の遺伝子産物（例えばVEGF）の標的化された低減または排除のための遺伝子操作された融合分子[例えばDNMT3A-DNMT3L(3A3L)-dCas9-KRAB融合分子]を提供することによって、現行の技術に伴う課題を克服する。本開示の遺伝子操作された融合分子は、例えば肝臓の疾患、高コレステロールに伴う疾患、およびコレステロールの異常調節[例えば低密度リポタンパク質(LDL)コレステロール]に伴う疾患を含む遺伝子疾患の処置のために有用である。したがって、インビボデリバリーにおける使用のための遺伝子操作された融合分子およびその医薬製剤（例えば脂質ナノ粒子製剤）を作製する方法も提供される。

20

【0076】

I. 定義

本明細書で用いる場合、用語「コーディング配列」または「コーディング核酸」は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸(RNAまたはDNA分子)を意味する。コーディング配列は、核酸が投与される個体または哺乳動物の細胞内における発現を指令することができるプロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む制御エレメントに作動可能に連結された開始および終止のシグナルをさらに含み得る。コーディング配列はコドン最適化され得る。

30

【0077】

核酸に関連して本明細書で用いられる用語「相補体」または「相補的」は、核酸分子のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの間のWatson-Crick（例えばA-T/UおよびC-G）またはHoogsteen塩基対形成を意味し得る。「相補性」は、2つの核酸配列の間で共有された特性、例えばこれらが互いに逆平行に整列した場合を指し、それぞれの位置におけるヌクレオチド塩基は相補的になる。

【0078】

用語「修正する」、「ゲノム編集する」、および「復元する」は、変異型タンパク質または切断されたタンパク質をコードするか、またはタンパク質を全くコードしない変異型(mutant)遺伝子を変更して、完全長の機能性タンパク質または部分的に完全長の機能性タンパク質の発現が得られる変更を指す。変異型遺伝子の修正または復元は、変異を有する遺伝子の領域を置き換えること、または変異型遺伝子全体を相同組換え修復(HDR)等の修復機構によって変異を有しない遺伝子のコピーで置き換えることを含み得る。変異型遺伝子の修正または復元には、遺伝子に二本鎖切断を生成し、次いで非相同末端結合(NHEJ)を用いて修復することによって、早過ぎる終止コドン、異常なスプライスアクセプター部位、または異常なスプライスドナー部位を惹起するフレームシフト変異を修復することにも含まれる。NHEJは、修復の間に少なくとも1つの塩基対を付加または削除して、適正なリーディングフレームを復元し、早過ぎる終止コドンを排除することができる。変異型遺伝子の修正または復元には、異常なスプライスアクセプター部位またはス

40

50

プライスドナー配列を破壊することにも含まれる。変異型遺伝子の修正または復元には、2つのヌクレアーゼ標的部位の間のDNAを除去し、NHEJによってDNA切断を修復することによって適正なリーディングフレームを復元するために、同じDNA鎖上の2つのヌクレアーゼの同時の作用によって非必須遺伝子セグメントを削除することにも含まれる。

【0079】

本明細書で用いる場合、用語「ドナーDNA」、「ドナー鋳型」、および「修復鋳型」は、目的の遺伝子の少なくとも一部を含む二本鎖DNA断片または分子を指す。ドナーDNAは完全機能性タンパク質または部分的機能性タンパク質をコードし得る。

【0080】

本明細書で用いる場合、用語「フレームシフト」または「フレームシフト変異」は相互交換可能に用いられ、1つまたは複数のヌクレオチドの付加または欠失がmRNAにおけるコドンのリーディングフレームにシフトを惹起する遺伝子変異の型を指す。リーディングフレームにおけるシフトは、タンパク質翻訳の際にミスセンス変異または早すぎる終止コドン等のアミノ酸配列の変化をもたらすことがある。

【0081】

本明細書で用いる場合、用語「機能性」および「完全機能性」は、生物学的活性を有するタンパク質を記述する。「機能性遺伝子」は、機能性タンパク質に翻訳されるmRNAに転写される遺伝子を指す。

【0082】

本明細書で用いる場合、用語「融合タンパク質」は、もともと個別のタンパク質をコードしていた2つ以上の遺伝子の共有または非共有の結合によって直接または間接的に創成されたキメラタンパク質を指す。一部の実施形態では、融合遺伝子の翻訳は、元のタンパク質のそれぞれに由来する機能特性を有する単一のポリペプチドをもたらす。

【0083】

本明細書で用いる場合、用語「遺伝子コンストラクト」は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むDNAまたはRNA分子を指す。コーディング配列は、細胞内での発現を指令することができるプロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む制御エレメントに作動可能に連結された開始および終止のシグナルを含む。

【0084】

本明細書で相互交換可能に用いられる用語「相同組換え修復」または「HDR」は、DNAの相同の片が主として細胞サイクルのG2およびS期において核の中に存在する場合に、二本鎖DNAの損傷を修復する細胞内の機構を指す。HDRはドナーDNA鋳型を用いて修復をガイドし、遺伝子全体の標的化された付加を含むゲノムへの特定の配列変更を創成するために用いられる。ドナー鋳型がCRISPR/Cas9系システムのような部位特異的なヌクレアーゼとともに提供されれば、細胞機構は相同組換えによって切断を修復することになり、これはDNA切断の存在下で数桁増強される。相同DNA片が存在しない場合には、その代わりに非相同末端結合が起こり得る。

【0085】

本明細書で用いる用語「ゲノム編集」は遺伝子を変更することを指す。ゲノム編集は、変異遺伝子を修正または復元することを含み得る。ゲノム編集は変異型遺伝子または正常な遺伝子等の遺伝子をノックアウトすることを含み得る。ゲノム編集は目的の遺伝子を変化させることによって疾患を処置するために用いられる。

【0086】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列に関連して本明細書で用いる用語「同一」または「同一性」は、その配列が指定された領域にわたって同じである残基の指定されたパーセンテージを有することを意味する。そのパーセンテージは、2つの配列を最適に整列させ、指定された領域にわたってその2つの配列を比較し、両方の配列において同一の残基が生じる位置の数を決定して一致した位置の数を得て、一致した位置の数を指定された領域における位置の全数で除し、その結果を100倍して配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算できる。2つの配列が異なる長さである場合、または整列によって1

10

20

30

40

50

つまたは複数の付着末端が生じて特定された比較領域が単一配列のみを含む場合には、単一配列の残基は計算の分母には含まれるが分子には含まれない。DNAおよびRNAを比較する場合、チミン（T）およびウラシル（U）は等価とみなしてよい。同一性は手計算で、またはBLASTもしくはBLAST 2.0等のコンピューター配列アルゴリズムを用いて実施してよい。関連するペプチドの同一性は、既知の方法によって容易に計算することができる。そのような方法には、それだけに限らないが、全体が参照により本明細書に組み込まれるComputational Molecular Biology, Lesk, A. M. 編、Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 編、Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, パート1, Griffin, A. M. およびGriffin, H. G. 編、Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. およびDevereux, J. 編、M. Stockton Press, New York, 1991; ならびにCarilloら、SIAM J. Applied Math. 48, 1073ページ（1988）に記載された方法が含まれる。

10

20

【0087】

本明細書で用いる場合、本明細書で相互交換可能に用いられる用語「変異型遺伝子」または「変異した遺伝子」は、検出可能な変異を受けた遺伝子を指す。変異型遺伝子は、遺伝子の正常な伝達および発現に影響する遺伝材料の喪失、獲得、または交換等の変更を受けている。本明細書で用いる「破壊された遺伝子」は、早過ぎる終止コドンを引き起こす変異を有する変異型遺伝子を指す。破壊された遺伝子産物は、破壊されていない完全長の遺伝子産物に対して切り取られている。

【0088】

本明細書で用いる場合、用語「遺伝子外改変のモジュレーター」は、遺伝子外改変を介して（例えばヒストンのアセチル化もしくはメチル化、または標的遺伝子の制御エレメント、例えばプロモーター、エンハンサー、または転写開始部位におけるDNAのメチル化を介して）遺伝子発現を標的とする薬剤を指す。クロマチンのリモデリングおよびDNAのメチル化は、遺伝子転写を制御する2つの主要な機構である。特定の遺伝子外マーク（例えばDNAのメチル化）は、構造的または生化学的に遺伝子の転写または遺伝子のサイレンシング／抑制を指令する。例えば、転写活性を制御する領域のDNAのメチル化は、基礎となるDNA配列を変更することなく遺伝子発現を変化させる。遺伝子外改変（例えばDNAのメチル化）を用いる転写制御は、他の遺伝子産物の発現に影響することなく、遺伝子発現の標的化された調節を可能にする。

30

【0089】

本明細書で用いる用語「非相同末端結合（NHEJ）経路」は、相同鋳型を必要とせずに切断末端を直接ライゲートすることによってDNAの二本鎖切断を修復する経路を指す。NHEJによるDNA末端の鋳型に依存しない再ライゲーションは、DNAの切断点にランダムなミクロ挿入およびミクロ欠失（インデル）を導入する確率論的で誤差を生じやすい修復プロセスである。この方法は、標的とされた遺伝子配列のリーディングフレームを意図的に破壊、欠失、または変化させるために用いられる。NHEJは、典型的には修復をガイドするマイクロホモロジーと称される短い相同のDNA配列を用いる。これらのマイクロホモロジーは、多くの場合、二本鎖切断の末端の一本鎖オーバーハングに存在する。オーバーハングが完全に適合する場合には、NHEJは通常、切断を正確に修復するが、ヌクレオチドの喪失をもたらす不完全な修復も起こり得る。しかしこれはオーバーハングが適合しない場合により一層一般的である。

40

【0090】

50

本明細書で用いる用語「正常な遺伝子」は、遺伝材料の喪失、獲得、または交換等の変更を受けていない遺伝子を指す。正常な遺伝子は正常な遺伝子伝達および遺伝子発現を受ける。

【0091】

本明細書で用いる用語「ヌクレアーゼ媒介 NHEJ」は、cas9 等のヌクレアーゼが二本鎖 DNA を切断した後で開始される NHEJ を指す。

【0092】

本明細書で用いる場合、本明細書で用いる用語「核酸」または「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」は、一緒に共有的に連結された少なくとも 2 つのヌクレオチドを意味する。一本鎖の描写は相補鎖の配列も画定する。即ち、核酸は描写された一本鎖の相補鎖も包含する。核酸の多くのバリエーション (variant) を、所与の核酸として同じ目的のために用いてよい。即ち、核酸は実質的に同一の核酸およびその相補体も包含する。一本鎖は、厳格なハイブリダイゼーション条件の下で標的配列にハイブリダイズし得るプローブを提供する。即ち、核酸は、厳格なハイブリダイゼーション条件の下でハイブリダイズするプローブも包含する。核酸は一本鎖でも二本鎖でもよく、二本鎖および一本鎖の配列の両方の部分を含んでもよい。核酸はゲノム DNA と cDNA の両方である DNA、RNA、またはハイブリッドであってもよく、核酸はデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドの組合せならびにウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン、およびイソグアニンを含む組合せを含んでもよい。核酸は化学合成法または組換え法によって得てよい。

【0093】

本明細書で用いる場合、用語「作動可能に連結された」は、2 つ以上の目的の生物学的配列が、意図した様式で機能することを可能にする関係にあるように、スパーサーまたはリンカーを伴い、または伴わずに、並置されることを指す。ポリペプチドに関して用いられる場合、これは、連結された産生物が意図した生物学的機能を有することを可能にするようにポリペプチド配列が連結されていることを意味することを意図している。ポリヌクレオチドに関して用いられる場合、1 つの例として、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが制御配列 (例えばプロモーター、エンハンサー、サイレンサー配列、その他) と作動可能に連結されている場合、これはポリヌクレオチド配列が、そのポリヌクレオチドからのポリペプチドの制御された発現を可能にするように連結されていることを意味することを意図している。一部の実施形態では、遺伝子の発現は、それが空間的に接続されているプロモーターの制御下にある。プロモーターは、その制御下にある遺伝子の 5' (上流) または 3' (下流) にあり得る。プロモーターと遺伝子との間の距離は、それからプロモーターが誘導される遺伝子における、そのプロモーターとそれが制御する遺伝子との間の距離とほぼ同じであり得る。当技術で知られているように、この距離の変動は、プロモーター機能の喪失を伴わずに適応され得る。

【0094】

本明細書で用いる用語「部分的機能性」は、変異型遺伝子によってコードされ、機能性タンパク質より低い、非機能性タンパク質よりは高い生物学的活性を有するタンパク質を記述している。一実施形態では、部分的機能性タンパク質は、対応する機能性タンパク質の生物学的活性の 95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、または 30% 未満の生物学的活性を示す。

【0095】

本明細書で相互交換可能に用いられる用語「早過ぎる終止コドン」または「アウトオブフレーム終止コドン」は、DNA の配列におけるナンセンス変異を指し、これは野生型遺伝子では通常見られない位置に終止コドンをもたらす。早過ぎる終止コドンは、タンパク質の完全長のバージョンと比較して、切り取られたまたは短いタンパク質を惹起し得る。

【0096】

本明細書で用いる用語「プロモーター」は、細胞内で核酸の発現を付与、活性化、または増強することができる合成または天然由来の分子を意味する。プロモーターは、発現を

さらに増強し、ならびに／または核酸の空間的な発現および／もしくは時間的な発現を変化させる、1つまたは複数の特定の転写制御配列を含んでよい。プロモーターは、遠位のエンハンサーまたはリプレッサーエレメントも含むことがあり、これらは転写の開始部位から数千塩基対も離れて位置することもある。プロモーターは、ウイルス、細菌、真菌、植物、昆虫、および動物を含む源から誘導され得る。プロモーターは、構成的に、または発現が生じる細胞、組織、もしくは臓器に関して、または発現が生じる発達段階に関して、または生理学的ストレス、病原体、金属イオン、もしくは誘起剤等の外部刺激に応じて差別的に、遺伝子成分の発現を制御し得る。プロモーターの代表的な例には、バクテリオファージT7プロモーター、バクテリオファージT3プロモーター、SP6プロモーター、lacオペレータープロモーター、tacプロモーター、SV40レイトプロモーター、SV40アーリープロモーター、RSV-LTRプロモーター、およびCMV IEプロモーターが含まれる。

10

【0097】

本明細書で用いる用語「標的遺伝子」は、既知または想定上の遺伝子産物をコードする任意のヌクレオチド配列を指す。標的遺伝子は遺伝的な疾患または障害に関与する変異した遺伝子であり得る。

【0098】

本明細書で用いる用語「標的領域」は、部位特異的ヌクレアーゼが結合するように設計された標的遺伝子の領域を指す。

20

【0099】

本明細書で用いる場合、用語「トランスジーン」は、1つの生命体から単離され、別の生命体に導入される遺伝子配列を含む遺伝子または遺伝材料を指す。あるいは、用語「トランスジーン」は、化学的に合成されて生命体に導入される遺伝子または遺伝材料も指す。このDNAの非天然セグメントは、トランスジェニックな生命体においてRNAまたはタンパク質を産生する能力を保持し得るか、またはトランスジェニックな生命体の遺伝コードの正常な機能を変化させ得る。トランスジーンの導入は、生命体の表現型を変更させる可能性を有している。

【0100】

本明細書で用いる場合、用語「バリエント」は、核酸に関連して用いられる場合には、(i)言及したヌクレオチド配列の一部または断片、(ii)言及したヌクレオチド配列またはその一部の相補体、(iii)言及した核酸またはその相補体と実質的に同一の核酸、または(iv)言及した核酸、その相補体、またはそれと実質的に同一の配列と厳格な条件下でハイブリダイズする核酸を意味する。アミノ酸の挿入、欠失、または保存的置換によってアミノ酸配列が異なるペプチドまたはポリペプチドに関する「バリエント」は、しかし少なくとも1つの生物学的活性を保持している。

30

【0101】

バリエントは、少なくとも1つの生物学的活性を保持したアミノ酸配列を有する言及したタンパク質と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質も意味し得る。アミノ酸の保存的置換、即ち、アミノ酸を同様の特性（例えば親水性、荷電領域の程度および分布）を有する異なるアミノ酸で置き換えることは、当技術において典型的には軽微な変更を含むと認識される。これらの軽微な変更は、当技術で理解されているように、アミノ酸のハイドロパシー指数を考慮することによって部分的に同定され得る。全体が参照により本明細書に組み込まれるKyteら、J. Mol. Biol. 157:105~132ページ(1982)。アミノ酸のハイドロパシー指数は、その疎水性および電荷の考慮に基づいている。同様のハイドロパシー指数を有するアミノ酸は置換され、それでもタンパク質の機能を保持していることが当技術で知られている。一態様では、±2のハイドロパシー指数を有するアミノ酸は置換される。生物学的機能を保持したタンパク質をもたらす置換を明らかにするためにアミノ酸の親水性も用いられる。ペプチドに関連してアミノ酸の親水性を考慮することによって、そのペプチドの最大局所平均親水性の計算が可能になる。置換は、互いに±2以内の親水性値を有するアミノ酸について実施され得る。アミノ酸の

40

50

疎水性指数と親水性値はいずれも、そのアミノ酸の特定の側鎖によって影響される。その観察と一致して、生物学的機能と適合するアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、サイズ、およびその他の特性によって明らかになるように、アミノ酸の相対的な類似性、特にそれらのアミノ酸の側鎖に依存すると理解されている。

【0102】

本明細書で用いる場合、本明細書で用いる用語「ベクター」は、複製の起点を含む核酸配列を意味する。ベクターは、ウイルスベクター、バクテリオファージ、細菌人工染色体、または酵母人工染色体であってよい。ベクターはDNAまたはRNAベクターであってよい。ベクターはDNAプラスミド等の自己複製型の染色体外ベクターであってよい。

【0103】

本明細書で用いる場合、用語「遺伝子導入」、「遺伝子デリバリー」、および「遺伝子形質導入」は、特定のヌクレオチド配列（例えばDNAまたはRNA）、融合タンパク質、ポリペプチド等を標的細胞に確実に挿入するための方法またはシステムを指す。

【0104】

本明細書で用いる場合、用語「アデノウイルス随伴ウイルス（AAV）ベクター」、「AAV遺伝子治療ベクター」、および「遺伝子治療ベクター」は、機能性または部分的機能性ITR配列およびトランスジーンを有するベクターを指す。本明細書で用いる場合、用語「ITR」は、反転ターミナルリピート（ITR）を指す。ITR配列は、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、およびAAV-6を限定なく含む、アデノ随伴ウイルス血清型から誘導され得る。しかしITRは野生型ヌクレオチド配列でなくてもよく、配列が機能的レスキュー、複製、およびパッケージングを提供する機能を保持している限り、変化してもよい（例えばヌクレオチドの挿入、欠失、または置換によって）。AAVベクターは、AAV野生型遺伝子の1つまたは複数、好ましくはrepおよび／またはcap遺伝子が全体としてまたは部分的に欠失していてもよいが、隣接する機能性ITR配列を保持している。機能性ITR配列は、例えばAAVのビリオンまたは粒子をレスキューし、複製し、パッケージングするように機能する。即ち、「AAVベクター」は、本明細書でトランスジーンを対象の細胞に挿入するために必要な配列を少なくとも含むと定義される。ウイルスの複製およびパッケージングのためにシスで必要な配列（例えば機能性ITR）が含まれてもよい。

【0105】

本明細書で用いる場合、用語「遺伝子治療」は、ポリペプチドまたは核酸配列が患者の細胞に移入され、それにより、特定の遺伝子の活性および／または発現が調節される、患者を処置する方法を指す。ある特定の実施形態では、遺伝子の発現が抑制される。ある特定の実施形態では、遺伝子の発現が増強される。ある特定の実施形態では、遺伝子の発現の時間的または空間的なパターンが調節される。

【0106】

「トランスジーン」は、トランスジェニックな配列または天然もしくは野生型のDNA配列を含み得る。トランスジーンは、霊長類対象のゲノムの一部になり得る。トランスジェニックな配列は、部分的にまたは全体として異種であってよい。即ち、トランスジェニックな配列またはその一部は、それが導入される細胞とは異なる種に由来してよい。

【0107】

本明細書で用いる場合、用語「安定的に維持された」は、細胞の多数の世代を通してこれらのトランスジェニックな要素（即ち所望の要素）の少なくとも1つを維持したトランスジェニックな対象（例えばヒトまたは非ヒト霊長類）の特徴を指す。例えば、この用語は、もともとトランスフェクトされた細胞の多くの細胞分裂サイクルを包含することを意図している。用語「安定なトランスフェクション」または「安定的にトランスフェクトされた」は、細胞のゲノムへの外来DNAの導入および一体化を指す。用語「安定なトランスフェクタント」は、ゲノムDNAに安定的に一体化された外来DNAを有する細胞を指す。

【0108】

本明細書で用いる場合、用語「トランスジーンコーディング」、「核酸分子コーディング」、「DNA配列コーディング」、および「DNAコーディング」は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序または配列を指す。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序は、例えばポリペプチド（タンパク質）の鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定し得る。即ち、DNA配列はアミノ酸配列をコードし得る。

【0109】

本明細書で用いる場合、用語「野生型」（wt）は、天然に存在する源から単離された際にその遺伝子または遺伝子産物の特徴を有している遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は、集団中で最も頻繁に観察され、したがって遺伝子の「正常な」または「野生型の」形態が任意に設計される遺伝子である。対照的に、用語「改変された」または「変異体」は、野生型の遺伝子または遺伝子産物と比較した場合に配列および／または機能的特性の改変（即ち、変化した特徴）を呈する遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型の遺伝子または遺伝子産物と比較した場合に変化した特徴の獲得によって特定される、天然に存在する変異体が単離され得ることが注目される。

10

【0110】

本明細書で用いる場合、用語「トランスフェクション」は、細胞による外来の核酸（例えばDNAまたはRNA）の取り込みを指す。外因性の核酸（DNAまたはRNA）が細胞膜の内部に導入された場合、細胞は「トランスフェクト」されている。当技術においていくつかのトランスフェクション手法が一般に知られている[例えば全体が参照により本明細書に組み込まれるGrahamら、Virology, 52:456ページ(1973); Sambrookら、Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1989); Davisら、Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, (1986); およびChuraら、Gene 13:197ページ(1981)を参照されたい]。そのような手法は、遺伝子移入ベクターおよびその他の核酸分子等の1つまたは複数の外因性DNA部分を好適な受容体細胞に導入するために用いてよい。

20

【0111】

本明細書で用いる場合、用語「安定なトランスフェクション」および「安定的にトランスフェクトされた」は、トランスフェクトされた細胞のゲノムへの外来DNAの導入および一体化を指す。用語「安定なトランスフェクタント」は、ゲノムDNAに安定的に一体化された外来DNAを有する細胞を指す。

30

【0112】

本明細書で用いる場合、用語「過渡的なトランスフェクション」または「過渡的にトランスフェクトされた」は、外来DNAがトランスフェクトされた細胞のゲノムの中に一体化されずにエピソームとして維持される、外来DNAの細胞への導入を指す。この間に、外来DNAは、染色体中の内因性遺伝子の発現を支配する規制的制御を受ける。用語「過渡的なトランスフェクタント」は、外来DNAを取り込んだが、このDNAを一体化することができなかった細胞を指す。本明細書で用いる場合、用語「形質導入」は、複製欠損のウイルスベクターを介する、例えば組換えAAVビリオンを介する、インビボまたはインビトロ（in vitro）の受容体細胞へのDNA分子のデリバリーを意味する。

40

【0113】

本明細書で用いる場合、用語「受容体細胞」は、選択された目的のヌクレオチド配列を担持した核酸コンストラクトまたはベクターによってトランスフェクトもしくは形質導入された、またはトランスフェクトもしくは形質導入することができる細胞を指す。この用語は、選択したヌクレオチド配列が存在する限り、形態または遺伝的構成において元の親と同一であるか否かに関わらず、親細胞の子孫を含む。受容体細胞は、遺伝子治療粒子および／または遺伝子治療ベクターが投与された対象の細胞であってよい。

【0114】

本明細書で用いる場合、用語「組換えDNA分子」は、分子生物学手法によってともに

50

結合されたDNAのセグメントからなるDNA分子を指す。

【0115】

本明細書で用いる場合、用語「制御エレメント」は、核酸配列の発現を制御することができる遺伝エレメントを指す。例えば、プロモーターは、作動可能に連結されたコーディング領域の転写の開始を容易にする制御エレメントである。その他の制御エレメントは、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナル、終止シグナル、その他である。

【0116】

用語DNA「制御配列」は、プロモーター配列、ポリアデニル化シグナル、転写終止配列、上流制御ドメイン、複製の起点、内部リボソーム進入部位（「IRES」）、エンハンサー、その他等の制御エレメントを集合的に指し、これらは受容体細胞におけるコーディング配列の複製、転写、および翻訳を集合的に提供する。これらの制御配列の全てが存在する必要はない。

【0117】

真核生物中の転写制御シグナルは一般に、「プロモーター」および「エンハンサー」エレメントを含む。プロモーターおよびエンハンサーは、転写に関与する細胞タンパク質と特異的に相互作用するDNA配列の短いアレイからなっている[全体が参照により本明細書に組み込まれるManiatisら、Science 236:1237ページ(1987)]。プロモーターおよびエンハンサーエレメントは、酵母、昆虫、および哺乳動物の細胞ならびにウイルスの遺伝子を含む多種の真核生物の源から単離されている(類似の対照配列、即ちプロモーターも、原核生物で見出されている)。特定のプロモーターおよびエンハンサーの選択は、受容体細胞の型による。一部の真核生物のプロモーターおよびエンハンサーは広い宿主範囲を有しているが、他は限定された細胞型のサブセットにおいて機能的である[例えば全体が参照により本明細書に組み込まれるVossら、Trends Biochem. Sci., 11:287ページ(1986); および総説としてManiatisら(上掲)を参照]。例えば、SV40アーリー遺伝子エンハンサーは、多くの哺乳動物種由来の多種の細胞型において極めて活性であり、広範囲の哺乳動物細胞内でタンパク質を発現させるために用いられてきた[全体が参照により本明細書に組み込まれるDijkemaら、EMBO J. 4:761ページ(1985)]。ヒト伸長因子1-アルファ遺伝子[Uetsukiら、J. Biol. Chem., 264:5791ページ(1989); Kimら、Gene 91:217ページ(1990); ならびにMizushimaおよびNagata, Nucl. Acids. Res., 18:5322ページ(1990)]、Rous肉腫ウイルスの長いターミナルリピート[Gormanら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79:6777ページ(1982)]、ならびにヒトサイトメガロウイルス[Boshartら、Cell 41:521ページ(1985)]から誘導されるプロモーターおよびエンハンサーエレメントも多様な哺乳動物細胞型におけるタンパク質の発現のために有用であり、全体が参照により本明細書に組み込まれる。プロモーターおよびエンハンサーは、単独または一緒に、天然に見出すことができる。例えば、レトロウイルスの長いターミナルリピートはプロモーターとエンハンサーエレメントの両方を含む。一般にプロモーターおよびエンハンサーは転写または翻訳される遺伝子に依存しない。即ち、用いられるエンハンサーおよびプロモーターは、これらが作動可能に連結される遺伝子に関して「内因性」、「外因性」、または「異種」であってよい。「内因性」のエンハンサー／プロモーターは、ゲノム中の所与の遺伝子と天然に連結されたエンハンサー／プロモーターである。「外因性」または「異種」のエンハンサーまたはプロモーターは、その遺伝子の転写が連結されたエンハンサー／プロモーターによって指令されるように遺伝子操作(即ち分子生物学的手法)によって遺伝子に並置されたエンハンサー／プロモーターである。

【0118】

本明細書で用いられる場合、用語「組織特異的」は、核酸配列の発現が特定の細胞型または組織において実質的に大きい、プロモーター、エンハンサー等の制御エレメントまたは制御配列を指す。

10

20

30

40

50

【0119】

発現ベクター上の「スプライシングシグナル」の存在は、高いレベルの組換えトランスクリプトの発現をもたらすことが多い。スプライシングシグナルは、一次RNAトランスクリプトからのイントロンの除去を媒介し、スプライスドナーおよびアクセプター部位からなる[全体が参照により本明細書に組み込まれるSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989), 16.7~16.8ページ]。一般に用いられるスプライスドナーおよびアクセプター部位は、SV40の16S RNA由来のスプライスジャンクションである。

【0120】

転写終止シグナルは、一般にポリアデニル化シグナルの下流に見出され、数百ヌクレオチドの長さである。本明細書で用いられる用語「ポリA部位」または「ポリA配列」は、発生期のRNAトランスクリプトの終止とポリアデニル化の両方を指令するDNA配列を意味する。ポリAテイルを欠くトランスクリプトは不安定で急速に分解するので、組換えトランスクリプトの効率的なポリアデニル化が望ましい。発現ベクターにおいて利用されるポリAシグナルは、「異種」または「内因性」であってよい。内因性のポリAシグナルは、ゲノム中の所与の遺伝子のコーディング領域の3'末端に天然に見出されるシグナルである。異種ポリAシグナルは、1つの遺伝子から単離され、別の遺伝子の3'末端に作動可能に連結されたシグナルである。一般に用いられる異種ポリAシグナルは、SV40ポリAシグナルである。SV40ポリAシグナルは、237bpのBamHI/BclI制限断片上に含まれ、終止とポリアデニル化の両方を指令する(全体が参照により本明細書に組み込まれるSambrookら、上掲、16.6~16.7ページ)。

【0121】

本明細書で用いられる場合、用語「対象」および「患者」は本明細書で相互交換可能に用いられ、ヒトおよび非ヒト動物の両方を指す。本開示の用語「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、例えば哺乳動物および非哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類、その他を含む。

【0122】

本明細書で定義される場合、「治療有効量」または「治療有効用量」は、所望の様式でタンパク質の活性を調節するために十分な量の所望のタンパク質を産生し、それにより、臨床的介入のための緩和的なツールを提供することができる、融合タンパク質、ポリペプチド、核酸、脂質ナノ粒子、リボソーム、AAV粒子、またはビリオンの量または用量である。一部の実施形態では、本明細書に記載したトランスフェクトされた融合タンパク質、ポリペプチド、核酸、AAV粒子、またはビリオンの治療有効量または用量は、融合タンパク質/遺伝子治療コンストラクトによって標的とされる遺伝子の抑制を付与するために十分である。

【0123】

本明細書で用いられる場合、例えば障害を「処置する」という用語は、障害を有しているか、障害を有するリスクにあるか、および/または障害の症状を経験している対象(例えばヒト)が、一実施形態では、例えば本明細書に記載した融合分子もしくは融合分子をコードする核酸、および/またはgRNAもしくはgRNAをコードする核酸が投与された場合に、融合分子もしくは融合分子をコードする核酸、および/またはgRNAもしくはgRNAをコードする核酸が決して投与されなかった場合よりも重篤でない症状を有するか、および/または早く回復することを意味する。

【0124】

II. DNA結合性タンパク質

本開示によって本明細書で定義される方法および組成物におけるある特定の実施形態では、DNA結合性タンパク質(例えばDNA標的剤)は、(DNA)ヌクレアーゼ、例えば配列特異的な様式でDNAを標的とすることができるか、または配列特異的な様式でDNAを標的とするように指令または指示することができるヌクレアーゼ、例えばCRIS

10

20

30

40

50

PR-Casシステム、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、またはメガヌクレアーゼを含む。一部の実施形態では、DNA結合性タンパク質は、CRISPR-Casシステムから誘導されるDNAヌクレアーゼである。

【0125】

転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）システム

ある特定の実施形態では、核酸結合性タンパク質は、（改変された）転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）システムである。転写アクチベーター様エフェクター（TALE）は、実際上任意の所望のDNA配列に結合するように操作することができる。TALENシステムを用いるゲノム編集の例示的な方法は、例えばそれぞれ全体が参照により組み込まれるCermak T. Doyle EL. Christian M. Wang L. Zhang Y. Schmidt C. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res. 2011; 39: e82 ページ; Zhang F. Cong L. Lodato S. Kosuri S. Church GM. Arlotta P. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. Nat Biotechnol. 2011; 29: 149~153 ページ、ならびに米国特許第 8, 450, 471 号、第 8, 440, 431 号、および第 8, 440, 432 号で見出すことができる。

【0126】

さらなるガイドランスとして限定なく、天然に存在するTALEまたは「野生型TALE」は、数多くのプロテオバクテリアの種によって分泌される核酸結合性タンパク質である。TALEポリペプチドは、主として33、34、または35個のアミノ酸の長さで主としてアミノ酸の12位および13位で互いに異なる高度に保存されたモノマーポリペプチドのタンデムリピートからなる核酸結合ドメインを含む。一部の実施形態では、核酸はDNAである。

【0127】

本明細書で用いられる場合、用語「ポリペプチドモノマー」または「TALEモノマー」は、TALE核酸結合ドメインの中の高度に保存された反復ポリペプチド配列を指すために用いられ、用語「リピート可変二残基」または「RVD」は、ポリペプチドモノマーの12位および13位の高度に可変なアミノ酸を指すために用いられることになる。

【0128】

本開示を通して提供されるように、RVDのアミノ酸残基は、アミノ酸のIUPAC一文字コードを用いて表される。DNA結合ドメインの中に含まれるTALEモノマーの一般的な表示は、X₁-11-(X₁₂X₁₃)-X₁₄-33または34または35であり、ここで数字（subscript）はアミノ酸の位置を示し、Xは任意のアミノ酸を表す。X₁₂X₁₃はRVDを示す。一部のポリペプチドモノマーでは、13位の可変アミノ酸は失われているか存在せず、そのようなポリペプチドモノマーではRVDは単一のアミノ酸からなる。そのような場合には、RVDはその代わりにX*として表してよく、ここでXはX₁₂を表し、(*)はX₁₃が存在しないことを示す。DNA結合ドメインはTALEモノマーのいくつかの繰り返しを含み、これは[X₁-11-(X₁₂X₁₃)-X₁₄-33または34または35]_zとして表される。ここで有利な実施形態では、zは少なくとも5~40である。さらに有利な実施形態では、zは少なくとも10~26である。TALEモノマーは、そのRVDにおけるアミノ酸の同一性によって決定されるヌクレオチド結合親和性を有している。例えば、NIのRVDを有するポリペプチドモノマーはアデニン（A）に優先的に結合し、NGのRVDを有するポリペプチドモノマーはチミン（T）に優先的に結合し、HDのRVDを有するポリペプチドモノマーはシトシン（C

）に優先的に結合し、NNのRVDを有するポリペプチドモノマーはアデニン（A）とグアニン（G）の両方に優先的に結合する。本開示のさらに別の実施形態では、IGのRVDを有するポリペプチドモノマーはTに優先的に結合する。即ち、TALEの核酸結合ドメインにおけるポリペプチドモノマーリピートの数および順序が、その核酸標的特異性を決定する。本開示のさらなる実施形態では、NSのRVDを有するポリペプチドモノマーは4つの塩基対全てを認識し、A、T、G、またはCに結合し得る。TALEの構造および機能は、例えばそれぞれ全体が参照により組み込まれるMoscouら、*Science* 326:1501ページ（2009）；Bochら、*Science* 326:1509～1512ページ（2009）；およびZhangら、*Nature Biotechnology* 29:149～153ページ（2011）にさらに記載されている。ある特定の実施形態では、標的化はポリ核酸結合TALEN断片によって達成される。ある特定の実施形態では、標的ドメインは、触媒的に不活性なTALENまたはその核酸結合断片を含むかまたはからなる。

10

20

30

40

50

【0129】

Znフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）システム

ある特定の実施形態では、標的ドメインは、（改変された）ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）システムを含むかまたはからなる。ZFNシステムは、ジンクフィンガーDNA結合ドメインを所望のDNA配列を標的とするように操作することができるDNA切断ドメインに融合することによって生成される人工の制限酵素を用いる。ZFNを用いるゲノム編集の例示的な方法は、例えばそれぞれ全体が参照により組み込まれる米国特許第6,534,261号、第6,607,882号、第6,746,838号、第6,794,136号、第6,824,978号、第6,866,997号、第6,933,113号、第6,979,539号、第7,013,219号、第7,030,215号、第7,220,719号、第7,241,573号、第7,241,574号、第7,585,849号、第7,595,376号、第6,903,185号、および第6,479,626号で見出すことができる。さらなるガイダンスとして限定なく、人工のジンクフィンガー（ZF）技術は、ゲノム中の新規なDNA結合部位を標的とするZFモジュールのアレイを含む。ZFアレイ中のそれぞれのフィンガーモジュールは、3つのDNA塩基を標的とする。個別のジンクフィンガードメインのカスタム化されたアレイは、ZFタンパク質（ZFP）に組み立てられる。ZFPは機能性ドメインを含んでよい。最初の合成ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は、ZFタンパク質をIIS型制限酵素FokIの触媒ドメインに融合することによって開発された（Kim, Y. G. ら、1994, *Chimeric restriction endonuclease*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 883～887ページ；Kim, Y. G. ら、1996, *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1156～1160ページ）。切断特異性の増大は、それぞれが短いスペーサーによって分離された異なるヌクレオチド配列を標的とするZFNヘテロダイマーの対を使用することによって、オフターゲット活性の低下とともに達成することができる。（Doyon, Y. ら、2011, *Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures*, *Nat. Methods* 8, 74～79ページ）。ZFPは転写アクチベーターおよびリプレッサーとして設計することもでき、多種の生命体において多くの遺伝子を標的とするために用いられてきた。ある特定の実施形態では、標的ドメインは、核酸結合性ジンクフィンガーヌクレアーゼまたはその核酸結合性断片を含むかまたはからなる。ある特定の実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（の断片）に結合する核酸は触媒的に不活性である。

【0130】

メガヌクレアーゼ

ある特定の実施形態では、標的ドメインは（改変された）メガヌクレアーゼを含み、これは大きな認識部位（12～40塩基対の二本鎖DNA配列）によって特徴付けられるエンドデオキシリボヌクレアーゼである。メガヌクレアーゼを用いる例示的な方法は、それぞれ全体が参照により組み込まれる米国特許第8,163,514号、第8,133,697号、第8,021,867号、第8,119,361号、第8,119,381号、第8,124,369号、および第8,129,134号で見出すことができる。ある特定の実施形態では、標的化はポリ核酸結合性メガヌクレアーゼ断片によって達成される。ある特定の実施形態では、標的化はポリ核酸結合性で触媒的に不活性のメガヌクレアーゼ（断片）によって達成される。したがって特定の実施形態では、標的ドメインは核酸結合性メガヌクレアーゼまたはその核酸結合性断片を含むかまたはからなる。

10

【0131】

CRISPR-Casシステム

一部の実施形態では、本開示のDNA結合性タンパク質およびシングルガイドRNA配列は、CRISPR-Casシステムから誘導される。本開示は、ゲノム編集および遺伝疾患の処置における使用のための、CRISPR/Cas9に基づいて操作されるシステムを提供する。CRISPR/Cas9に基づく操作されたシステムは、遺伝疾患、肝疾患、およびLDL等のコレステロールの調節異常に関与する遺伝子を含む任意の遺伝子（例えばVEGF）を標的とするように設計してよい。本開示は、所望の特異性および活性（例えばVEGF遺伝子産物の発現を低減または排除すること）を有する、遺伝子操作されたCasタンパク質および／またはガイドRNAを含むCRISPR-Casシステムを提供する。CRISPR/Cas9系システムは、Cas9タンパク質、変異したCas9タンパク質、またはCas9融合タンパク質〔例えばDNMT3A-DNMT3L（3A3L）-dCas9-KRAB融合分子〕および少なくとも1つのsgRNA（例えばVEGF sgRNA）を含んでよい。Cas9融合タンパク質は、Cas9に内在的であるものとは異なる活性を有するドメイン（例えばDNMT3A、DNMT3L、またはKRAB）を含んでよい。

20

【0132】

一般に、Casタンパク質（本明細書でCRISPRタンパク質、CRISPR酵素、CRISPR-Casタンパク質、CRISPR-Cas酵素、Cas、CRISPRエフェクター、またはCasエフェクタータンパク質と相互交換可能に用いられる）および／またはガイド配列が、CRISPR-Casシステムの成分である。CRISPR-CasシステムまたはCRISPRシステムは集合的に、CRISPR関連（「Cas」）遺伝子の発現またはその活性の指令に関与するトランスクリプトおよびその他のエレメントを指し、Cas遺伝子をコードする配列、tracr（転写活性化CRISPR）配列（例えばtracrRNAまたは活性部分tracrRNA）、tracrメイト配列（内因性CRISPRシステムに関連する「ダイレクトリピート」およびtracrRNA処理された部分ダイレクトリピートを包含する）、ガイド配列（内因性CRISPRシステムに関連して「スパーサー」とも称される）、またはここで用いられる用語としての「RNA」〔例えばCasをガイドするRNA、例えばCRISPR RNAおよび転写活性化（tracr）RNA、またはシングルガイドRNA（別名sgRNA、キメラRNA）〕、またはCRISPR遺伝子座由来のその他の配列およびトランスクリプトを含む。

30

40

【0133】

一般に、CRISPRシステムは、標的配列（内因性CRISPRシステムに関連してプロトスパーサーとも称される）の部位におけるCRISPR複合体の形成を促進するエレメントによって特徴付けられる。本開示の操作されたシステムにおいて、ダイレクトリピートは、天然に存在する配列または天然に存在しない配列を包含し得る。本開示のダイレクトリピートは、天然に存在する長さおよび配列に限定されない。さらに、本開示のダイレクトリピートは、アダプターまたはアダプタータンパク質に結合する配列等のヌクレオチドの挿入を含んでよい（機能性ドメインとの会合のため）。ある特定の実施形態では

50

、挿入等を含むダイレクトリピートの一端は短いDRのほぼ前半部分であり、末端は短いDRのほぼ後半部分である。

【0134】

CRISPR複合体の形成に関連して、「標的配列」または「標的ポリヌクレオチド」は、それに対してガイド配列が相補性を有するように設計される配列を指し、標的配列とガイド配列とのハイブリダイゼーションがCRISPR複合体の形成を促進する。標的配列は任意のポリヌクレオチド、例えばDNAまたはRNAポリヌクレオチドを含んでよい。一部の実施形態では、標的配列は細胞の核または細胞質に位置している。

【0135】

一般に、ガイド配列（またはスペーサー配列）は、標的配列とハイブリダイズし、CRISPR複合体の標的配列への配列特異的な結合を指令するために十分な標的ポリヌクレオチド配列との相補性（例えば完全な相補性）を有する任意のポリヌクレオチド配列であってよい。一部の実施形態では、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適な整列アルゴリズムを用いて最適に整列させた場合、約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上である。

【0136】

ある特定の実施形態では、切断効率の調節は、ミスマッチ、例えばスペーサー／標的に沿ったミスマッチの位置を含めて、スペーサー配列と標的配列との間の1つまたは2つのミスマッチ等の、1つまたは複数のミスマッチの導入によって利用することができる。二重のミスマッチが例えばより中央部（即ち3'または5'ではなく）にあれば、切断効率がより大きく影響される。したがって、ミスマッチの位置をスペーサーに沿って選択することによって、切断効率を調節することができる。例として、標的の100%未満の切断が望ましい場合（例えば細胞集団において）には、スペーサーと標的配列との間の1つまたは複数、例えば好ましくは2つのミスマッチをスペーサー配列に導入してよい。ミスマッチの位置がスペーサーに沿ってより中心にあれば、切断パーセンテージはより低くなる。

【0137】

CRISPR-Casシステムまたはその成分を、標的の遺伝子座または核酸配列に1つまたは複数の変異を導入するために用いてよい。変異は、細胞のそれぞれの標的配列におけるガイドRNAまたはsgRNAを介する1つまたは複数のヌクレオチドの導入、欠失、または置換を含んでよい。変異は、前記細胞のそれぞれの標的配列におけるガイドRNAを介する1～75ヌクレオチドの導入、欠失、または置換を含んでよい。

【0138】

典型的には、内因性CRISPR-Casシステムに関連して、CRISPR複合体（標的配列とハイブリダイズし、1つまたは複数のCasタンパク質と複合したガイド配列を含む）の形成は、標的配列の中またはその近傍（例えば標的配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、またはそれ以上の塩基対以内）における切断をもたらすが、特にRNA標的の場合には、例えば二次構造に依存することがある。一部の場合には、内因性CRISPRシステムに関連して、CRISPR複合体（標的配列とハイブリダイズし、1つまたは複数のCasタンパク質と複合したガイド配列を含む）の形成は、標的配列の中またはその近傍（例えば標的配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、またはそれ以上の塩基対以内）における1つまたは両方の鎖（適用可能であれば）の切断をもたらす。

【0139】

一部の実施形態では、ガイドRNA（Casを標的遺伝子座にガイドすることができる）は、（1）真核細胞内で標的遺伝子座（ポリヌクレオチド標的遺伝子座、例えばRNA標的遺伝子座）とハイブリダイズすることができるガイド配列、（2）ダイレクトリピート（DR）配列を含んでよく、これらは単一のRNA、即ちsgRNA（5'から3'への配向で配置された）またはcrRNAの中に存在する。

【0140】

10

20

30

40

50

本開示の実施において全て有用な、方法、材料、デリバリー媒体、ベクター、粒子、A V、ならびにそれらの作製および使用を含み、量および処方を含む、C R I S P R - C a s システム、その成分、およびそれらの成分のデリバリーに関する一般的な情報に関しては、それぞれ全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 8, 999, 641 号、第 8, 993, 233 号、第 8, 945, 839 号、第 8, 932, 814 号、第 8, 906, 616 号、第 8, 895, 308 号、第 8, 889, 418 号、第 8, 889, 356 号、第 8, 871, 445 号、第 8, 865, 406 号、第 8, 795, 965 号、第 8, 771, 945 号、および第 8, 697, 359 号、米国特許公開 2014-0310830、2014-0287938 A1、2014-0273234 A1、2014-0273232 A1、2014-0273231 A1、2014-0256046 A1、2014-0248702 A1、2014-0242700 A1、2014-0242699 A1、2014-0242664 A1、2014-0234972 A1、2014-0227787 A1、2014-0189896 A1、2014-0186958、2014-0186919 A1、2014-0186843 A1、2014-0179770 A1、および 2014-0179006 A1、2014-0170753、欧州特許 2784162 B1 および 2771468 B1、欧州特許出願 2771468、2764103、および 2784162、ならびに P C T 特許公開 W O 2021/183807 A1 (P C T / U S 2021/021973)、W O 2014/093661 (P C T / U S 2013/074743)、W O 2014/093694 (P C T / U S 2013/074790)、W O 2014/093595 (P C T / U S 2013/074611)、W O 2014/093718 (P C T / U S 2013/074825)、W O 2014/093709 (P C T / U S 2013/074812)、W O 2014/093622 (P C T / U S 2013/074667)、W O 2014/093635 (P C T / U S 2013/074691)、W O 2014/093655 (P C T / U S 2013/074736)、W O 2014/093712 (P C T / U S 2013/074819)、W O 2014/093701 (P C T / U S 2013/074800)、W O 2014/018423 (P C T / U S 2013/051418)、W O 2014/204723 (P C T / U S 2014/041790)、W O 2014/204724 (P C T / U S 2014/041800)、W O 2014/204725 (P C T / U S 2014/041803)、W O 2014/204726 (P C T / U S 2014/041804)、W O 2014/204727 (P C T / U S 2014/041806)、W O 2014/204728 (P C T / U S 2014/041808)、W O 2014/204729 (P C T / U S 2014/041809) を参照する。

10

20

30

40

50

【0141】

C a s タンパク質

C a s タンパク質（例えば操作された C a s タンパク質）は、野生型カウンターパートの C a s タンパク質と実質的に同一の（例えば 80%~100%、90%~100%、95%~100%、98%~100%、99%~100%、99.9%~100%、または約 100% の）ヌクレアーゼ活性を有し得る。ある特定の場合には、操作された C a s タンパク質は、野生型カウンターパートの C a s タンパク質より高い（例えば少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、または少なくとも 90% 高い）ヌクレアーゼ活性を有している。

【0142】

あるいはまたはさらに、C a s タンパク質（例えば操作された C a s タンパク質）は、野生型のカウンターパート C a s タンパク質より少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、または少なくとも 90% 高い特異性を有し得る。特定の例では、C a s タンパク質（例えば操作された C a s タンパク質）は、野

生型のカウンターパート Cas タンパク質より少なくとも 30% 高い特異性を有し得る。本明細書で用いられる場合、Cas の用語「特異性」は、オンターゲットおよびオフターゲットの事象を含む全てのポリヌクレオチド切断事象の数またはパーセンテージに対するオンターゲットのポリヌクレオチド切断事象の数またはパーセンテージに対応し得る。Cas タンパク質の活性および特異性は、これも Cas タンパク質の活性および特異性を検出するための方法の例を記載し、全体が参照により本明細書に組み込まれ、本明細書の他の箇所に詳細を記載した、Hsu PD ら、DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases, Nat Biotechnol. 2013 Sep; 31 (9) : 827~832 ページ; および Slaymaker IM ら、Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity, Science. 2016 Jan 1; 351 (6268) : 84~88 ページに記載されたものと一致している。

10

20

30

40

50

【0143】

一部の実施形態では、Cas タンパク質（例えばその RuvC ドメイン）は、1塩基だけ上流に（PAM に関して）スライドして付着切断を産生する。これは満たされて単一塩基の複製（即ち +1 の挿入）をもたらし得る。+1 挿入位置の例は、Zuo, Z. および Liu, J. (2016). Cas9-catalyzed DNA Cleavage Generates Staggered Ends: Evidence from Molecular Dynamics Simulations. Scientific Reports 6, 37584 ページに記載されている。一部の実施形態では、操作された Cas タンパク質は、野生型カウンターパートの Cas タンパク質と異なる +1 挿入頻度を有する。例えば、グアニンが PAM に関して -2 位に存在する場合の +1 挿入頻度は、チミジン、シチジン、またはアデニンが PAM に関して -2 位に存在する場合の +1 挿入頻度より高い。一部の場合には、+1 挿入はヒト細胞内の宿主機構による。一部の例では、Cas タンパク質は付着切断を生成し得る。付着切断は 1 bp または 1 ヌクレオチドの 5' オーバーハングであってよい。付着切断は 1 bp または 1 ヌクレオチドの 3' オーバーハングであってよい。

【0144】

Cas をコードする核酸分子は、コドン最適化してよい。コドン最適化配列の例は、この例において真核生物、例えばヒト（即ちヒトにおける発現のために最適化されている）、または本明細書で論じる別の真核生物、動物または哺乳動物における発現のために最適化された配列である。例えば WO 2014/093622 (PCT/US2013/074667) における SaCas9 ヒトコドン最適化配列を参照されたい。これは好ましいが、他の例も可能であることが認識され、ヒト以外の宿主種のためのコドン最適化、または特定の臓器のためのコドン最適化が知られている。一部の実施形態では、Cas をコードする酵素コーディング配列は、真核生物細胞等の特定の細胞内での発現のためにコドン最適化される。真核生物細胞は、本明細書で論じるヒトまたは非ヒト真核生物、または動物もしくは哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、家畜、または非ヒト哺乳動物もしくは霊長類を含むがそれらに限らない哺乳動物等の特定の生命体の細胞であるか、それらから誘導されてよい。一部の実施形態では、人類の生殖細胞系の遺伝的同一性を改変するためのプロセスおよび／またはヒトもしくは動物への実質的な医学的恩恵を何ら伴わずに苦痛を与える可能性がある、動物の遺伝的同一性を改変するためのプロセス、ならびにこれらのプロセスに起因する動物は、除外してよい。一般に、コドン最適化は、天然のアミノ酸配列を維持しながら、天然の配列の少なくとも 1 つのコドン（例えば約 1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、またはそれ以上のコドン）を、その宿主細胞の遺伝子中でより頻繁にまたは最も頻繁に用いられるコドンで置き換えることによって、目的の宿主細胞内での発現を増強するために核酸配列を改変するプロセスを指す。多様な種が特定のアミノ酸のある特定のコドンへの特定の偏りを呈する。コドンの偏り（生命体の間でのコドンの使用の相違）は、メッセンジャー RNA (mRNA) の翻訳の効

率と相関することが多く、これは (in tum) とりわけ、翻訳されるコドンの特性および特定のトランスファーRNA (tRNA) 分子の利用可能性に依存すると考えられている。細胞内の選択されたtRNAの優位性は一般に、ペプチド合成において最も頻繁に用いられるコドンの反映である。したがって、遺伝子は、所与の生命体においてコドン最適化に基づいて最適の遺伝子発現のために調整することができる。コドン使用表は、例えば www.kazusa.or.jp/codon/ で入手できる「Codon Usage Database」で容易に入手することができ、これらの表はいくつかの方法で適応させることができる。Nakamura, Y. ら、「Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000」Nucleic Acids Res. 28:292ページ (2000) を参照されたい。特定の宿主細胞内での発現のために特定の配列をコドン最適化するためのコンピューターアルゴリズムも利用可能で、例えばGene Forge (Aptagen社; Jacobus, PA) も利用可能である。一部の実施形態では、Casをコードする配列中の1つまたは複数のコドン (例えば1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、もしくはそれ以上、または全てのコドン) は、特定のアミノ酸について最も頻繁に用いられるコドンに対応している。

10

【0145】

一部の実施形態では、Casタンパク質は核酸切断活性を有し得る。Casタンパク質はRNA結合およびDNA切断の機能を有し得る。一部の実施形態では、Casは、標的配列の位置またはその近傍での、例えば標的配列の中および／もしくは標的配列の相補体の中での、または標的配列に付随する配列での、例えば標的配列の最初もしくは最後のヌクレオチドから約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500、もしくはそれ以上の塩基対の中での、1つまたは複数の核酸鎖の切断を指令し得る。一部の実施形態では、Casタンパク質は、標的配列の中での、および／または標的配列の相補体の中もしくは標的配列に付随する配列での、および／または標的配列の最初もしくは最後のヌクレオチドから約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500、もしくはそれ以上の塩基対の中での、1つもしくは2つの鎖の2つ以上の切断 [例えば1つ (one)、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の切断] を指令し得る。一部の実施形態では、切断はブラントであってよく、即ち平滑末端を生成してよい。一部の実施形態では、切断はスタガードであってよく、即ち粘着末端を生成してよい。

20

30

【0146】

一部の実施形態では、ベクターは、対応する野生型酵素に対して変異することがある、核酸を標的とするCasタンパク質をコードし、それにより、核酸を標的とする変異したCasタンパク質は、標的配列を含む標的ポリヌクレオチドの1つまたは2つの鎖を切断する能力を欠いている。例えば、全てのDNA切断活性を実質的に欠く変異したCasを産生するHNHドメインの変化または変異であり、例えば、変異した酵素のDNA切断活性は、非変異形の酵素の核酸切断活性の約25%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%、またはそれ未満を超えない。例としては、変異形の核酸切断活性が全くないか、または非変異形と比較して無視できる程度である場合がある。本明細書で用いられる場合、酵素に関する用語「誘導された」は、誘導された酵素が高度の配列相同性を有しているという意味で主として野生型酵素に基づいているが、当技術で既知の方法または本明細書に記載した方法で変異している (改変されている) ことを意味する。

40

【0147】

典型的には、内因性の核酸標的システムに関連して、核酸標的複合体 (標的配列とハイブリダイズし、核酸を標的とする1つまたは複数のエフェクタータンパク質と複合体を形成したガイドRNAまたはcrRNAを含む) の形成は、標的配列の中またはその近傍 (例えば標的配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、またはそれ以上の塩基対以内) におけるDNA鎖の切断をもたらす。本明細書で用いられる場合、

50

用語「目的の標的遺伝子座に付随する配列」は、標的配列の近傍（例えば標的配列から 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、またはそれ以上の塩基対以内、ここで標的配列は目的の標的遺伝子座の中に含まれる）の配列を指す。

【0148】

エフェクタータンパク質は酵素に基づくか酵素から誘導され、したがって一部の実施形態では用語「エフェクタータンパク質」は確かに「酵素」を含むことが認識されよう。しかし、エフェクタータンパク質は、一部の実施形態で必要とされるように、デッド Cas タンパク質機能を含めて、DNA または RNA との結合活性を有するが、切断または傷付けの活性を必ずしも有しなくてよいことも認識されよう。

【0149】

一部の実施形態では、Cas タンパク質は、誘導システムの成分を形成し得る。システムの誘導的性質は、エネルギーの形態を用いる遺伝子編集または遺伝子発現の空間時間的制御を可能にすることになる。エネルギーの形態には、それだけに限らないが、電磁放射、音響エネルギー、化学的エネルギー、および熱エネルギーが含まれる。誘導システムの例には、テトラサイクリン誘導プロモーター（Tet-On または Tet-Off）、小分子 2 ハイブリッド転写活性化システム（FKBP、ABA、その他）、または光誘導システム（Phytochrome、LOV ドメイン、またはクリプトクローム）が含まれる。一実施形態では、CRISPR エフェクタータンパク質は、配列特異的な様式で転写活性の変更を指令する光誘導転写エフェクター（LITE）の一部であってよい。光（light）の成分は、CRISPR エフェクタータンパク質、光応答性チトクロームヘテロダイマー [例えばシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来]、および転写活性化／抑制ドメインを含んでよい。誘導可能な DNA 結合性タンパク質およびそれらの使用のための方法のさらなる例は、全体が参照により本明細書に組み込まれる米国 61／736465 および 61／721,283、ならびに WO 2014018423 A2 で提供されている。

【0150】

一部の実施形態では、変異した Cas は、低減されたオフターゲット効果、例えばガイド RNA と複合した際に標的遺伝子座への改変を達成するが、オフターゲットに向かう活性を低減または排除する使用のために改善された CRISPR 酵素、ならびに例えばガイド RNA と複合した際に CRISPR 酵素の活性を増大させるために改善された CRISPR 酵素をもたらす 1 つまたは複数の変異を有し得る。本明細書で以下に記載する変異した酵素は本明細書の他の箇所に記載した本開示による方法のいずれにおいても用い得ることを理解されたい。本明細書の他の箇所に記載した方法、製品、組成物、および使用のいずれも、以下にさらに詳細に述べるように、変異した CRISPR 酵素とともに等しく適用可能である。

【0151】

オンターゲットとオフターゲットの活性および／もしくは特異性を増大または低減させるために、またはオンターゲットとオフターゲットの結合の結合および／もしくは特異性を増大または低減させるために、種々の組合せにおいて採用することができる方法および変異は、他の効果を促進するために行なわれる変異または改変を補償または増強するために用いることができる。他の効果を促進するために行なわれるそのような変異または改変は、Cas への変異もしくは改変、および／またはガイド RNA に行なわれる変異もしくは改変を含む。本開示の方法および変異は、Cas ヌクレアーゼの活性および／または化学的に改変されたガイド RNA との結合を調整するために用いられる。

【0152】

ある特定の実施形態では、本開示の Cas タンパク質の触媒活性は変化または改変される。触媒活性が対応する野生型 Cas タンパク質（例えば変異していない Cas タンパク質）の触媒活性と異なれば、変異した Cas は変化したまたは改変された触媒活性を有していると理解されたい。触媒活性は、当技術で既知の手段によって決定することができる。例として限定なく、触媒活性は、インデルのパーセンテージの決定（例えば所与の時間

10

20

30

40

50

の後、または所与の用量での)によって、インビトロまたはインビボで決定することができる。ある特定の実施形態では、触媒活性は増大する。ある特定の実施形態では、触媒活性は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%増大する。ある特定の実施形態では、触媒活性は低下する。ある特定の実施形態では、触媒活性は、少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、例えば少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または(実質的に)100%低下する。本明細書における1つまたは複数の変異は触媒活性を不活化することがあり、それにより、全ての触媒活性が実質的に低下し、活性が検出可能なレベル未満に低下し、または測定できない触媒活性まで低下することがある。

10

【0153】

操作されたCasタンパク質の1つまたは複数の特徴は、対応する野生型Casタンパク質と異なることがある。そのような特徴の例には、触媒活性、gRNA結合、Casタンパク質の特異性(例えば定義された標的の編集の特異性)、Casタンパク質の安定性、オフターゲット結合、ターゲット結合、プロテアーゼ活性、ニッカーゼ活性、PFS認識が含まれる。一部の例では、操作されたCasタンパク質は、対応する野生型Casタンパク質の1つまたは複数の変異を含んでよい。一部の実施形態では、操作されたCasタンパク質の触媒活性は、対応する野生型Casタンパク質と比較して増大している。一部の実施形態では、操作されたCasタンパク質の触媒活性は、対応する野生型Casタンパク質と比較して低下している。一部の実施形態では、操作されたCasタンパク質のgRNA結合は、対応する野生型Casタンパク質と比較して増大している。一部の実施形態では、操作されたCasタンパク質のgRNA結合は、対応する野生型Casタンパク質と比較して低下している。一部の実施形態では、Casタンパク質の特異性は、対応する野生型Casタンパク質と比較して増大している。一部の実施形態では、Casタンパク質の特異性は、野生型Casタンパク質と比較して低下している。一部の実施形態では、Casタンパク質の安定性は、対応する野生型Casタンパク質と比較して増大している。一部の実施形態では、Casタンパク質の安定性は、対応する野生型Casタンパク質と比較して低下している。一部の実施形態では、操作されたCasタンパク質は、触媒活性を不活化する1つまたは複数の変異をさらに含む。一部の実施形態では、Casタンパク質のオフターゲット結合は、対応する野生型Casタンパク質と比較して増大している。一部の実施形態では、Casタンパク質のオフターゲット結合は、対応する野生型Casタンパク質と比較して低下している。一部の実施形態では、Casタンパク質の標的結合は、対応する野生型Casタンパク質と比較して増大している。一部の実施形態では、Casタンパク質の標的結合は、対応する野生型Casタンパク質と比較して低下している。一部の実施形態では、操作されたCasタンパク質は、対応する野生型Casタンパク質と比較して高いプロテアーゼ活性またはポリヌクレオチド結合能力を有している。一部の実施形態では、PFS認識は対応する野生型Casタンパク質と比較して変化している。

20

30

40

【0154】

Casタンパク質の例

Casタンパク質の例には、クラスI(例えばI型、III型、およびIV型)、およびクラス2(例えばII型、V型、およびVI型)のCasタンパク質、例えばCas9、Cas12(例えばCas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12d)、Cas13(例えばCas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13d)、CasX、CasY、Cas14、それらのバリエーション(例えば変異形、切断形)、それらのホモログ、およびそれらのオルソログが含まれる。用語「オルソログ」および「ホモログ」は当技術で周知である。さらなるガイダンスとして、本明細書で用いられるタンパク質の「ホモログ」は、それがホモログであるタンパク質と同じまたは同様の機能を発揮する同

50

じ種のタンパク質である。ホモログタンパク質は構造的に関連していてもよいが、関連していなくてもよく、または部分的にのみ構造的に関連している。本明細書で用いられるタンパク質の「オルソログ」は、それがオルソログであるタンパク質と同じまたは同様の機能を発揮する異なる種のタンパク質である。オルソログタンパク質は構造的に関連していてもよいが、関連していなくてもよく、または部分的にのみ構造的に関連している。

【0155】

クラス2 Cas タンパク質

一部の実施形態では、Cas タンパク質はクラス2のCas タンパク質、即ちクラス2 CRISPR-Cas システムのCas タンパク質である。クラス2 CRISPR-Cas システムは、サブタイプ、例えばII-A型、II-B型、II-C型、V-A型、V-B型、V-C型、またはV-U型であってよい。一部の実施形態では、Cas タンパク質はCas 9、Cas 12a、Cas 12b、Cas 12c、またはCas 12dである。一部の実施形態では、Cas 9は、SpCas 9、SaCas 9、StCas 9、およびその他のCas 9オルソログであってよい。Cas 12は、FnCas 12aを含むCas 12a、Cas 12b、およびCas 12c、またはそれらのホモロジーもしくはオルソログであってよい。CRISPR-Cas システムの定義および例示的なメンバーには、Kira S. MakarovaおよびEugene V. Koonin, Annotation and Classification of CRISPR-Cas systems, Methods Mol Biol. 2015; 1311: 47~75 ページ; およびSergey Shmakovら、Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems, Nat Rev Microbial. 2017 Mar; 15 (3): 169~182 ページに記載されたものが含まれる。

【0156】

Cas タンパク質リンカー

一部の例では、Cas タンパク質は、少なくとも1つのRuvCドメインおよび少なくとも1つのHNHドメインを含む。Cas タンパク質は、RuvCドメインとHNHドメインを接続する第1および第2のリンカードメインをさらに含んでよい。Cas 9においてHNHドメインとRuvCドメインを接続する第1のリンカー(L1)および第2のリンカー(L2)は、Nishimasu, H. ら、「Crystal structure of Cas 9 in complex with guide RNA and target RNA」Cell 156 (Feb. 27, 2014): 935~949 ページおよびRibeiro, L. ら、(2018)「Protein engineering strategies to expand CRISPR-Cas 9 applications」International Journal of Genomics 2018 巻、論文ID 1652567 (doi.org/10.1155/2018/1652567) による研究に記載されている。Ribeiroの図1は、Cas 9の全体の構成、構造、および機能を示しており、参照により具体的に本明細書に組み込まれる。具体的には、図1Aは、本明細書に記載するように、リンカーL1(アミノ酸765~780にわたる)およびL2(アミノ酸906~918にわたる)を含むHNHドメインおよびRuvCドメインの遺伝子構築を示すSpCas 9のドメイン構成の概略表現を示す。

【0157】

同様に、スタフィロコッカス・アウレウスのCas 9 (SaCas 9) のドメイン構成を、第1および第2のリンカードメインを参照する際に利用することができる。一態様では、リンカー1ドメイン領域は残基481~519にわたり、SaCas 9中のRuvC-IIドメインをHNHドメインに接続している。一部の実施形態では、リンカー2領域は残基629~649にわたり、SaCas 9のRuvC-IIドメインとHNHドメインを接続している。したがって、第1および/または第2のリンカードメインは、Cas 9オルソログにおいて変異していてもよく、野生型SaCas 9のアミノ酸に対応する

アミノ酸残基を参照してよい。参照により本明細書に組み込まれる N i s h i m a s u , C e l l . 2 0 1 5 A u g 2 7 ; 1 6 2 (5) : 1 1 1 3 ~ 1 1 2 6 ページ ; d o i : 1 0 . 1 0 1 6 / j . c e l l . 2 0 1 5 . 0 8 . 0 0 7 を参照されたい。特に、N i s h i m a s u の図 1、S 1 ~ S 3 は C a s 9 タンパク質のドメイン構成の詳細を示しており、その教示のため、参照により具体的に本明細書に組み込まれる。

【 0 1 5 8 】

第 1 および第 2 のリンカーは、約 1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、またはそれ以上のアミノ酸を含んでよい。第 1 および第 2 のリンカーは、野生型リンカーに対応し得る。一部の態様では、第 1 および第 2 のリンカーは、第 1 および／または第 2 のリンカーに 1 つまたは複数の変異を含んでよい。一態様では、第 1 および／または第 2 のリンカーは、C a s 9 タンパク質の特異性を改善する 1 つまたは複数の変異を含む。

10

【 0 1 5 9 】

一部の実施形態では、C a s 9 の H N H ドメインと R u v C ドメインを接続するリンカー L 1 および L 2 は、野生型アミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、H N H ドメインと R u v C ドメインを接続するリンカーは、1 つまたは複数のアミノ酸に変異を含む。例としての実施形態では、第 1 のリンカー (L 1) は、S p C a s 9 のアミノ酸 T 7 6 9 I に対応する変異を含み、および／または第 2 のリンカー (L 2) は、S p C a s 9 のアミノ酸 G 9 1 5 M に対応する変異を含む。例としての実施形態では、1 つまたは複数のリンカー変異、例えば T 7 6 9 I および G 9 1 5 M は、C a s 9 タンパク質に改善された特異性を付与する。

20

【 0 1 6 0 】

一実施形態では、第 1 および第 2 のリンカーにおける 1 つまたは複数 (more) の変異は、本明細書に記載したように、特異性のさらなる改善および／または野生型 C a s 9 タンパク質と実質的に等価な活性の保持のために、C a s 9 タンパク質の他の部分における 1 つまたは複数の変異と組み合わせる。一実施形態では、リンカーにおける変異および／または C a s タンパク質内のさらなる変異は、特異性を増強／改善し、野生型 C a s 9 の (to) 野生型活性を実質的に保持する、本明細書に詳細を述べた方法を利用して、同定することができる。

30

【 0 1 6 1 】

クラス 2、I I 型 C a s タンパク質 (例えば C a s 9)

一部の実施形態では、C a s タンパク質は、クラス 2、I I 型の C R I S P R - C a s システムの C a s タンパク質 (I I 型 C a s タンパク質) であってよい。一部の実施形態では、C a s タンパク質は、クラス 2、I I 型の C a s タンパク質、例えば C a s 9 であってよい。一部の実施形態では、C R I S P R / C a s 9 システムは、C a s 9 タンパク質もしくはその断片、C a s 9 融合タンパク質、C a s 9 タンパク質もしくはその断片をコードする核酸、または C a s 9 融合タンパク質をコードする核酸を含んでよい。「C a s 9 (C R I S P R 付随タンパク質 9) は、N C B I 受託番号 N P _ 2 6 9 2 1 5 と少なくとも約 8 5 % のアミノ酸同一性を有し、R N A 結合活性、D N A 結合活性、および／または D N A 切断活性 (例えばエンドヌクレアーゼまたはニッカーゼ活性) を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。「C a s 9 機能」は、例えば本明細書に記載したように、それだけに限らないが、蛍光分極に基づく核酸結合アッセイ、蛍光分極に基づくストランド侵入アッセイ、転写アッセイ、E G F P 破壊アッセイ、D N A 切断アッセイ、および／またはサーベイヤアッセイを含むいくつかのアッセイのいずれかによって定義することができる。「C a s 9 核酸分子」は、C a s 9 ポリペプチドまたはその断片をコードするポリヌクレオチドを意味する。例示的な C a s 9 核酸分子配列は、ゲノム配列番号 N C _ 0 0 2 7 3 7 で提供されている。一部の実施形態では、C a s 9、例えば天然に存在する S . ピオゲネスの C a s 9 (S p C a s 9) または S . アウレウスの C a s 9 (

40

50

S a C a s 9) またはそれらのバリエーションの阻害剤が本明細書で開示される。C a s 9 は、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) 配列およびガイド R N A (g R N A) による標的 D N A の塩基対形成を用いて外来 D N A を認識する。C a s 9 によって任意のゲノム遺伝子座において標的化された鎖切断を誘導することが比較的容易であるため、多数の細胞型および生命体における効率的なゲノム編集が可能になった。C a s 9 誘導体も、転写アクチベーター／リプレッサーとして用いることができる。

【0162】

一部の場合には、C R I S P R - C a s タンパク質は、C a s 9 またはそのバリエーションである。一部の例では、C a s 9 は、天然に存在する任意の細菌性 C a s 9 を含む野生型 C a s 9 であってよい。C a s 9 オルソログは、典型的には 3 ~ 4 個の R u v C ドメインおよび H N H ドメインの一般的な構成を共有している。5' 最末端の R u v C ドメインは非相補鎖を切断し、H N H ドメインは相補鎖を切断する。全ての表記はガイド配列に準拠している。5' R u v C ドメインの触媒残基は、目的の C a s 9 の他の C a s 9 オルソログ [S. ピオゲネス I I 型 C R I S P R 遺伝子座、S. サーモフィルス C R I S P R 遺伝子座 1、S. サーモフィルス C R I S P R 遺伝子座 3、およびフランシセラ・ノビシダ (Franciscilla novicida) I I 型 C R I S P R 遺伝子座由来] との相同性比較によって同定され、保存された A s p 残基 (D 1 0) はアラニンに変異し、C a s 9 は相補鎖切断酵素に変換される。したがって、C a s 9 酵素は、天然に存在する任意の細菌性 C a s 9 を含む野生型 C a s 9 であってよい。C R I S P R、C a s、または C a s 9 酵素は、コドン最適化されていてよく、または任意のキメラ、変異体、ホモログ、またはオルソログを含む改変されたバージョンであってよい。本開示のさらなる態様では、C a s 9 酵素は 1 つまたは複数の変異を含んでよく、機能性ドメインとの融合を伴いまたは伴わずに、一般的な D N A 結合性タンパク質として用いてよい。

【0163】

変異は、人工的に導入された変異、または機能獲得型変異、もしくは機能喪失型変異であってよい。一部の実施形態では、転写活性化ドメインは V P 6 4 であってよい。一部の実施形態では、転写リプレッサードメインは K R A B または S I D 4 X であってよい。本開示のその他の態様は、ヌクレアーゼ、転写アクチベーター、リプレッサー、リコンビナーゼ、トランスポザーゼ、ヒストンリモデラー、デメチラーゼ、D N A メチルトランスフェラーゼ、クリプトクローム、光誘導性／制御性ドメインもしくは化学的誘導性／制御性ドメインを含むがそれらに限らないドメインと融合した、変異した C a s 9 酵素に関する。本開示は、細胞内のこれらの R N A の性能を増強することを可能にする s g R N A もしくは t r a c r R N A、またはガイドもしくはキメラガイド配列を含んでよい。この I I 型 C R I S P R 酵素は任意の C a s 9 酵素であってよい。一部の場合には、C a s 9 酵素は S p C a s 9 または S a C a s 9 であるか、これらから誘導される。本明細書で用いる場合、酵素に関連する用語「誘導された」は、誘導された酵素が、高度の配列同一性を有しているという意味で主として野生型酵素に基づいているが、当技術で既知のまたは本明細書に記載したある方法で変異している (改変されている) ことを意味する。一例では、変異は第 1 のリンカードメイン、第 2 のリンカードメイン、および／またはタンパク質のその他の部分における 1 つまたは複数の変異を含んでよい。高度の配列同一性は、野生型酵素に対して少なくとも 8 0 %、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 %、またはそれ以上を含んでよい。

【0164】

C a s 9 酵素は、同定された C a s 9 であってよい。それは、これが I I 型 C R I S P R システム由来の多数のヌクレアーゼドメインを有する最大のヌクレアーゼと相同性を共有する一般的な酵素のクラスを指し得るからである。一部の場合には、C a s 9 酵素は、S p C a s 9 (S. ピオゲネス C a s 9) または s a C a s 9 (S. アウレウス C a s 9) 由来またはそれらから誘導される。「S t C a s 9」は、S. サーモフィルス由来の野生型 C a s 9 (U n i P r o t I D : G 3 E C R 1) を指す。同様に、「S p C a s 9」は

10

20

30

40

50

(*Parcubacteria bacterium*) GW2011 GWC2__44__17、スミセラ (*Smithella*) 亜種 SCADC、アシダミノコッカス亜種 BV3L6、ラクノスピラセアエ・バクテリウム MA2020、カンジダツス・メタノプラズマ・テルミツム (*Candidatus Methanoplasma termitum*)、ユーバクテリウム・エリゲンス (*Eubacterium eligens*)、モラケセラ・ボボクリ (*Moraxella bovoculi*) 237、レプトスピラ・イナダイ (*Leptospira inadai*)、ラクノスピラセアエ・バクテリウム ND2006、ポルフィロモナス・クレビオリカニス3 (*Porphyromonas crevioricanis* 3)、プレボテラ・ディジエンス (*Prevotella disiens*)、およびポルフィロモナス・マカカエ (*Porphyromonas macacae*) から選択される生命体に由来するかそれらに起源する。一部の実施形態では、ストレプトコッカス・ピオゲネス、スタフィロコッカス・アウレウス、またはストレプトコッカス・サーモフィルスの Cas9 由来の生命体に由来するかそれらに起源する Cas9 エフェクタータンパク質。

10

【0167】

より好ましい実施形態では、Cas9 タンパク質は、ストレプトコッカス・ピオゲネス、スタフィロコッカス・アウレウス、またはストレプトコッカス・サーモフィルスの Cas9 から選択される細菌種から誘導される。ある特定の実施形態では、Cas9 は、フランシセラ・ツラレンシス1、プレボテラ・アルペンシス、ラクノスピラセアエ・バクテリウム MC20171、ブチリビブリオ・プロテオクラステクス、ペレグリニバクテリア・バクテリウム GW2011 GWA2__33__JO、パルクバクテリア・バクテリウム GW2011 GWC2__44__17、スミセラ亜種 SCADC、アシダミノコッカス亜種 BV3L6、ラクノスピラセアエ・バクテリウム MA2020、カンジダツス・メタノプラズマ・テルミツム、ユーバクテリウム・エリゲンス、モラケセラ・ボボクリ237、レプトスピラ・イナダイ、ラクノスピラセアエ・バクテリウム ND2006、ポルフィロモナス・クレビオリカニス3、プレボテラ・ディジエンス、およびポルフィロモナス・マカカエから選択される細菌種から誘導される。ある特定の実施形態では、Cas9 タンパク質は、アシダミノコッカス亜種 BV3L6、ラクノスピラセアエ・バクテリウム MA2020 から選択される細菌種から誘導される。ある特定の実施形態では、エフェクタータンパク質は、フランシセラ・ツラレンシス亜種ノビシダを含むがそれだけに限らない、フランシセラ・ツラレンシス1の亜種に由来する。

20

【0168】

Cas9 酵素は、S. ピオゲネス血清型 M1 (UniProt ID: Q99ZW2)、S. アウレウス Cas9 (UniProt ID: J7RUA5)、ユーバクテリウム・ベントリオスム Cas9 (UniProt ID: A5Z395)、アゾスピリルム (B510 株) Cas9 (UniProt ID: D3NT09)、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス (ATCC 49037 株) Cas9 (UniProt ID: A9HKP2)、ナイセリア・シネレア Cas9 (UniProt ID: D0W2Z9)、ロゼブリア・インテスティナリス Cas9 (UniProt ID: C7G697)、パルビバクulum・ラバメンチボランス (DS-1 株) Cas9 (UniProt ID: A7HP89)、ニトラチフラクター・サルスギニス (DSM 16511 株) Cas9 (UniProt ID: E6WZS9)、カンピロバクター・ラリ Cas9 (UniProt ID: G1UFN3) を含むが、それだけに限らない。

30

40

【0169】

ストレプトコッカス・ピオゲネスから誘導される Cas9 または密接に関連する任意の Cas9 による酵素作用により、ガイド配列の 20 ヌクレオチドとハイブリダイズして標的配列の 20 ヌクレオチドの後にプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列 (例には NGG/NRG または本明細書に記載したように決定することができる PAM が含まれる) を有する標的部位配列において二本鎖切断が生成される。部位特異的な DNA 認識および切断のための Cas9 による CRISPR 活性は、ガイド配列、部分的にガイド配列とハイブリダイズする tracr 配列、および PAM 配列によって定義される。CRISPR システムのさらなる態様は、Karginov および Hannon, The CRIS

50

PR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea, *Mol Cell* 2010, January 15; 37 (1): 7 ページに記載されている。4つの遺伝子 Cas 9、Cas 1、Cas 2、および Csn 1 のクラスター、ならびに 2つの非コーディング RNA エLEMENT、tracrRNA、および非反復配列（スパーサー、それぞれ約 30 bp）の短いストレッチが挟まれた反復配列（ダイレクトリピート）の特徴的なアレイを含むストレプトコッカス・ピオゲネス SF370 由来の II 型 CRISPR 遺伝子座。このシステムにおいて、標的化された DNA 二本鎖切断（DSB）は、4つの逐次的ステップで生成する。第1に、2つの非コーディング RNA、即ちプレcrRNA アレイおよび tracrRNA が、CRISPR 遺伝子座から転写される。第2に、tracrRNA がプレcrRNA のダイレクトリピートとハイブリダイズし、これが次に処理されて個別のスパーサー配列を含む成熟 crRNA になる。第3に、成熟 crRNA: tracrRNA 複合体が、crRNA のスパーサー領域とプロトスパーサー DNA との間のヘテロデュプレックス形成を介して、プロトスパーサーと対応する PAM とからなる DNA 標的に Cas 9 を方向付ける。最後に、Cas 9 が PAM の上流の標的 DNA の切断を媒介して、プロトスパーサーの中に DSB を創成する。2つのダイレクトリピート（DR）に隣接する単一のスパーサーからなるプレcrRNA アレイも、用語「tracrメイト配列」に包含される。ある特定の実施形態では、Cas 9 は、構成的に存在するか、誘導的に存在するか、条件付きで存在するか、または投与もしくは送達してよい。Cas 9 の最適化を用いて機能を増強するか、または新たな機能を開発してよい。キメラ Cas 9 タンパク質を生成することができ、Cas 9 を一般的な DNA 結合性タンパク質として用いてもよい。Cas 9 について提供される構造情報を用いて CRISPR-Cas システムをさらに操作および最適化してよく、これを拡張して他の CRISPR 酵素システムにおける構造機能関係、特に他の II 型 CRISPR 酵素または Cas 9 オルソログにおける構造機能関係を検討してもよい。結晶構造情報 [2013 年 12 月 12 日出願の米国仮出願 61/915, 251、2014 年 1 月 22 日出願の 61/930, 214、2014 年 4 月 15 日出願の 61/980, 012、および Nishimasu ら、「Crystal Structure of Cas 9 in Complex with Guide RNA and Target DNA」*Cell* 156 (5): 935~949 ページ、DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001> (2014) に記載され、そのそれぞれおよび全てが参照により本明細書に組み込まれる] は、誘導性 CRISPR-Cas システムに組み込むことができるモジュラーまたはマルチパートの CRISPR 酵素を切り詰め、創成するための構造情報を提供する。特に、構造情報は S. ピオゲネス Cas 9 (SpCas 9) について提供されており、これを他の Cas 9 オルソログまたは他の II 型 CRISPR 酵素に拡張してよい。Cas 9 遺伝子はいくつかの多様な細菌ゲノム、典型的には cas 1、cas 2、および cas 4 遺伝子、ならびに CRISPR カセットと同じ遺伝子座で見出されている。さらに、Cas 9 タンパク質は、トランスポゾン ORF-B と相同の容易に特定できる C 末端領域を含み、活性 RuvC 様ヌクレアーゼ、アルギニンに富む領域を含む。

[0170]

dCas 9

Cas 9 タンパク質は、ヌクレアーゼ活性が不活化されないように変異させることができる。最近、エンドヌクレアーゼ活性を有しない S. ピオゲネス 由来の不活化された Cas 9 タンパク質 (iCas 9、「dCas 9」とも称する) が、立体障害によって遺伝子発現をサイレンシングするために gRNA によって細菌、酵母、およびヒトの細胞内の遺伝子に対して標的化されている。本明細書で用いる場合、「dCas 分子」は、dCas タンパク質またはその断片を指すことがある。本明細書で用いる場合、「dCas 分子」は、dCas タンパク質またはその断片を指すことがある。本明細書で用いる場合、用語「iCas」および「dCas」は相互交換可能に用いられ、触媒的に不活性な CRISPR 随伴タンパク質を指す。一実施形態では、dCas 分子は、DNA 切断ドメインに 1

つまたは複数の変異を含む。一実施形態では、dCas分子は、RuvCまたはドメインに1つまたは複数の変異を含む。一実施形態では、dCas分子は、RuvCとHNHドメインの両方に1つまたは複数の変異を含む。一実施形態では、dCas分子は、野生型Cas分子の断片である。一実施形態では、dCas分子は野生型Cas分子由来の機能性ドメインを含み、機能性ドメインは、Reeドメイン、架橋ヘリックスドメイン、またはPAM相互作用ドメインから選択される。一実施形態では、dCas分子のヌクレアーゼ活性は、対応する野生型Cas分子の活性と比較して少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%低減する。

【0171】

好適なdCas分子は、野生型Cas分子から誘導することができる。Cas分子は、I型、II型、またはIII型のCRISPR-Casシステム由来であってよい。一実施形態では、好適なdCas分子は、Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、またはCas10分子から誘導することができる。一実施形態では、dCas分子は、Cas9分子から誘導される。dCas9分子は、例えばDNA切断ドメイン、例えばヌクレアーゼドメイン、例えばRuvCおよび／またはHNHドメインにおいてCas9分子に点変異（例えば置換、欠失、または付加）を導入することによって得ることができる。例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれるJinekら、Science (2012) 337: 816~21ページを参照されたい。例えば、RuvCおよびHNHドメインに2つの点変異を導入することによって、Cas9のsgRNAおよびDNA結合活性を保持しながらCas9ヌクレアーゼ活性が低減される。一実施形態では、RuvCおよびHNHの活性部位内の2つの点変異は、S.ピオゲネスCas9分子のD10AおよびH840Aの変異である。あるいは、S.ピオゲネスCas9分子のsgRNAおよびDNA結合活性を保持しながら、Cas9ヌクレアーゼ活性を無効にするためにD10およびH840を欠失させることができる。一実施形態では、RuvCおよびHNH活性部位内の2つの点変異は、S.ピオゲネスCas9分子のD10AおよびN580A変異である。

【0172】

種々の実施形態では、本開示は、dCas分子またはそれらのバリエーションのいずれかのバリエーションもしくは変異体を含む。dCas9の全てのバリエーションおよび変異体は、SpCas9（ストレプトコッカス・ピオゲネスから単離されたCas9）、SaCas9（スタフィロコッカス・アウレウスから単離されたCas9）、StCas9（ストレプトコッカス・サーモフィルスから単離されたCas9）、NmCas9（ネイセリア・メニンギチデスから単離されたCas9）、FnCas9（フランシセラ・ノビシダから単離されたCas9）、CjCas9（カンピロバクター・ジェジュニから単離されたCas9）、ScCas9 [ストレプトコッカス・カニス (Streptococcus canis) から単離されたCas9]、ならびに上記のCas9の任意のバリエーションおよび変異体形、例えば高忠実度Cas9 (Kleinstiverら、Nature, 2016 Jan 28) および増強されたSpCas9 (Slaymakerら、Sciences, 2016 Jan 01) から誘導されたものを含むが、それだけに限らない、本明細書で開示する方法、組成物、またはキットにおいて用いることができる。このリストはいくつかの例示的選択肢を提供するためのみであって、排他的ではない。

【0173】

一実施形態では、dCas分子は、配列番号1に従って番号付けしてD10および／またはH840に変異を含むストレプトコッカス・ピオゲネスdCas9分子である。一実施形態では、dCas分子は、配列番号1に従って番号付けしてD10Aおよび／またはH840Aの変異を含むストレプトコッカス・ピオゲネスdCas9分子である。

【0174】

ストレプトコッカス・ピオゲネスdCas9

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGET

AEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHER
HPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRILIYALAHMIKFRGHFLIEGD
LNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPG
EKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYAD
LFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK
YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRT
FDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFA
WMTRKSEETITPWNFEVVDKGGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT
VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFD
SVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEER
LPTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN
FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVK
VMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQL
QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTNRSDKN
RGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR
QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVR
EINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKAT
AKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQ
VNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAK
VEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEFE
NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHK
HYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPA
AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 1)

10

20

30

40

50

【0175】

一実施形態では、dCas9分子は、配列番号2もしくは3のアミノ酸配列、配列番号2もしくは3と実質的に同一（例えば配列同一性において少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）の配列、または配列番号2もしくは3に対して1つ、2つ、3つ、4つ、5つもしくはそれ以上の変更、例えばアミノ酸の置換、挿入、もしくは欠失を有する配列、またはそれらの任意の断片を含むスタフィロコッカス・アウレウスdCas9分子である。

【0176】

天然に存在する他の任意のCas9（例えば他の種由来のCas9）または操作されたCas9分子に同様の変異を適用することもできる。ある特定の実施形態では、dCas9分子は、ストレプトコッカス・ピオゲネスdCas9分子、スタフィロコッカス・アウレウスdCas9分子、カンピロバクター・ジェジュニdCas9分子、コリネバクテリウム・ジフテリアdCas9分子、ユーバクテリウム・ベントリオスムdCas9分子、ストレプトコッカス・パスチュリアヌスdCas9分子、ラクトバチルス・ファルシミニスdCas9分子、スピロヘータ・グロブスdCas9分子、アゾスピリルム（B 510株）dCas9分子、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクスdCas9分子、ネイセリア・シネレアdCas9分子、ロゼブリア・インテスティナリスdCas9分子、パルビバクルム・ラバメンチボランスdCas9分子、ニトラチフラクター・サルシギニス（DSM 16511株）dCas9分子、カンピロバクター・ラリ（CF89-12株）dCas9分子、ストレプトコッカス・サーモフィルス（LMD-9株）dCas9分子、またはそれらの断片を含む。

【0177】

ある特定の実施形態では、本開示は、ストレプトコッカス・ピオゲネスdCas9分子、スタフィロコッカス・アウレウスdCas9分子、カンピロバクター・ジェジュニdCas9分子、コリネバクテリウム・ジフテリアdCas9分子、ユーバクテリウム・ベントリオスムdCas9分子、ストレプトコッカス・パスチュリアヌスdCas9分子、ラ

クトバチルス・ファルシミニス d C a s 9 分子、スピロヘータ・グローブス d C a s 9 分子、アゾスピリウム (B 5 1 0 株) d C a s 9 分子、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス d C a s 9 分子、ネイセリア・シネレア d C a s 9 分子、ロゼブリア・インテスティナリス d C a s 9 分子、パルビバクulum・ラバメンチボランス d C a s 9 分子、ニトラチフラクター・サルスギニス (D S M 1 6 5 1 1 株) d C a s 9 分子、カンピロバクター・ラリ (C F 8 9 - 1 2 株) d C a s 9 分子、ストレプトコッカス・サーモフィルス (L M D - 9 株) d C a s 9 分子、またはそれらの断片をコードするヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【 0 1 7 8 】

例示的な d C a s 9 タンパク質は、表 1 に列挙したものを含むが、それらに限定されない。

【 0 1 7 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表1. 例示的なdCas9タンパク質

説明	配列	配列 番号
スタフィロコッカス・アウレウスdCas9 (変異体: D10AおよびH557A)	MKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGR RSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVK GLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISR SKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVQK AYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMG HCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEYEFQ I IENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVY HDIKDITARKEI IENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLT QEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKL VPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAI IKKYGL PNDII IELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEE IIRTTGKENA KYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDAI IPRSVS FDNSEFNKVLVKQEEENSKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNL AKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMN LLRSYFRVNNLDVKVKISINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAE DALLIANADFI FKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETE QEYKE IFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNT LIVNNLNGLYDKDNDKLKLINKSPEKLLMYHHDPPQTYQKLKLIMEQ YGDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNALDI TDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKENYY EVNSKCYEEAKKLKKSINQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNND LLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIKTIASKTQSIKKYSTDI LGNLYEVKSKKHPQ I KKG	2
スタフィロコッカス・アウレウスdCas9 (変異体: D10AおよびN580A)	MKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGR RSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVK GLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISR SKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVQK AYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMG HCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEYEFQ I IENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVY HDIKDITARKEI IENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLT QEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKL VPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAI IKKYGL PNDII IELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEE IIRTTGKENA KYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVHAI IPRSVS FDNSEFNKVLVKQEEASKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNL AKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMN LLRSYFRVNNLDVKVKISINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAE DALLIANADFI FKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETE QEYKE IFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNT LIVNNLNGLYDKDNDKLKLINKSPEKLLMYHHDPPQTYQKLKLIMEQ YGDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNALDI TDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKENYY EVNSKCYEEAKKLKKSINQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNND LLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIKTIASKTQSIKKYSTDI LGNLYEVKSKKHPQ I KKG	3

10

20

30

40

【表 1 - 2】

スタフィロコッカス・アウレウスdCas9 (D10A, H557A, N580A)	MKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDACVRLFKEANVENNEGR RSKRGRARLRKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVK GLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISR SKALEEKYVAELQLERLKKDGVEGRSINRFKTS DYVKEAKQLLVQK AYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTTYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMG HCTYPPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEYEFQ I IENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVY HDIKDITARKEI IENAEILLQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNLSELT QEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKL VPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGL PNDIIEELAREKNSKDAQKMINEMQKRRNRQTNERIEEII RTTGKENA KYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFFNYEVHAIIPRSVS FDNSFNKNVLVKQEEASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNL AKGKGRI SKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMN LLRSYFRVNNLDVVKVSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHAEDA LI IANADFIKKEWKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQEYKE IFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKPKNRELINDTLYSTRKDDKGNT LIVNNLNGLYDKDNDKLLKLINKSPEKLLMYHHDPOQTYQKLLIMEQ YGDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYGNKLNLAHLDI TDDYNSNRKNVVKLSLKPYPFDVYLDNGVYKFVTVKNLVDVIKENYY EVNSKCYEEAKKLLKISNQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNND LLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDI LGNLYEVKSKKHPQIIKKG	4
カンピロバクター・ジエジュニdCas9 (D8A, H559A)	MARILAFAGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALP RRLARSARKRLARRKARLNHLKHLTANEFKLNIEDYQSFDES LAKAY KGLSISPYE LRFRALNELLSKQDFARVILHTAKRRGYDDIKNSDDKE KGAILKAIKQNEEKLANYQSVGEYLYKEYFQKFKEKNSKEFTNVRNKK ESYERCIAQSFLKDELKLIFFKKQREFGFSFKKFEVEVLSVAFYKRA LKDFSHLVGNCSEFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRI INLLNNLKNTE GILYTKDDLNALNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGTYF TEFKKYKEFIKALGEHNL SQDDI,NEJAKDT,TLIKDETKLKKAT,AKYD LNQNIQIDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTPMLLEGKKYDEACNELNL KVAINEDKKDFLPAFNETYYKDEVTPNPVVLRAIKEYRKVLNALKKY GKVHKINIELAREVGKNHSQRAKIEKEQENENYKAKKDAELECEKLG KINSKNILKRLFKKEQKEFCAYSGEKIKISDLQDEKMLEIDAIYPYS RSFDDSYMKNVLVFTTKNQKEKLNQTPFEAFGNDSAKWQKIEVLAKNL PTKKQKRILDKNYKDKEQKNFKDRNLNDTRYIARLVNLNTRYKDYLDL PLSDDENTKLNQTKGSKVHVEAKSGMLTSALRHTWGFSAKDRNNHL HHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAEYAKKISELDYKNK RKFFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFY QSYGGKEGV LKALELGKIRKVNKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYA VPIYTMDFALKVLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYEFCSLYKDSL ILIQTQKDMQEPFVYYNAFTSSTVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFK NANEKEVIAKSIGIQNLKVFEKYIVSALGEVTKAEFRQREDFKK	5
コリネバクテリウム・ジフテリアdCas9 (D8A, H573A)	MKYHVGIAVGTFSVGLAAIEVDDAGMPIKTLSLVSHIHDSGLDPDEI KSAVTRLASSGIARRTRRLYRRKRRRLQQLDKFIQRQGWPIELEDY SDPLYPWKVARLAASYIADEKERGEKLSVALRHIAHRGWRNYPYAK VSSLYLPDGPDAFKAIREEIKRASGQVPETATVGQMVTLCELGTL KLRGEGGVLSARLQQSDYAREIQEICRMQEIQEELYRKIIDVFAAE SPKGSASSRVGKDP LQPGKNRALKASDAFQRYRIAALIGNLRVRVDG EKRIILSVEEKNLVFDHLVNLTPKKEPEWVTIAEILGIDRGQLIGTAT MTDDGERAGARPPHTDTRNSIVNSRIAPLVDWWKTASALEQHAMVKA LSNAEVDDFDSPEGAKVQAFFADLDDDVHAKLDSLHLFPVGRAAYSED TLVRLTRRMLSDGVDLYTARLQEFGEIPESWTPPTPRIGEPVGNPAVD RVLKTVSRWLESATKTWGAPERVIEHVREGFVTEKRAREMDGDMRR RAARNAKLFQEMQEKLVQGKPSRADLWRYQSVQRQNCQACAYCGSPI TFSNSEMDAIVPRAGQGSTNTRENLVAVCHRCNQSKGNTPFPAIWAKN TSIEGVSVKAEVERTRHVVDTGMRSTDFKKFTKAVVERFQRATMDE EIDARSMESVAMANELRSRVAQHFAHSGTTVRVYRGS LTAEARRAS GISGKLFKFFDVGKSRDLRRHHAIDAAVIAFTSDYVAETLAVRSNLK	6

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

	QSQAHRQEAPQWREFTGKDAEHRAAWRVWCQKMEKLSALLTEDLRDD RVVVMNSVRLRLNGSAHKETIGKLSKVKLSSQLSVSDIDKASSEAL WCALTREPFGDPKEGLPANPERHIRVNGTHVYAGDNIGLFPVSAGSI ALRGGYAELGSSFHHARVYKITSGKKPAFAMLRVYTIDLLPYRNQDL FSVELKPQTMSMRQAEKKLRDALATGNAEYLGWLVDDELVDVDSKI ATDQVKAVEAELGTIRRWVVDGFFSPSKLRLRPLQMSKEGIKKESAP ELSKIIDRPGWLPVAVNKLFSGDGNTVVRRDSLGRVRLESTAHLPVTW KVQ	
ユーバクテリウ ム・ベントリオ スム dCas9 (D8A, H592A)	MGYTVGLAIGVASVGVAVLDENDNIVEAVSNIFDEADTSNNKVRRTL REGRRTRRRQKTRIEDFKQLWETSGYIIPKHLHLNIIELRNKGLTEL LSLDELYCVLLSMLKHRGISYLEDAADDGEKGNAYKKGLAFNEKQLKE KMPCEIQLERMKKYGKYHGEFIIIEINDEKEYQSNVFTTKAYKKELEK IFETQRCNGNKINTKFIKKYMEIYERKREYYIGPGNEKSRTDYGIYT TRTDEEGNFIDEKNIFGKLIGKCSVYPPEYRASSASYTAQEFNLLND LNNLKINNEKLTEFQKKEIVEI IKDASSVNMRI IKKVIDEDIEQYS GARIDKKGKEIYHTFEIYRKLKELKTINVIDIDSFTREELDKTMDIL TLNTERESIVKAFDEQKFVYEEENLIKKLIEFRKNNQRLFSGWHSFSY KAMLQILPVMYKEPKQMQLLTEMNVFKSKKEKYVNYKIIPENEVVK EIYNPVVVKSI RTTVKILNALIKKYGPESVVIEMPRDKNSDDEKEK IDMNQKKNQEYEEKILNKIYDEKGIEITNKDYKKQKKLVKLKLWNE QEGCLYSGKKIATEDLLNHPEFFEIDAIIPKSISLDDSRNKVLVY KTENSIKENDTPYHYLTRINGKWGFDEYKANVLELRRRGKIDDKKVN NLLCMEDITKIDVVKGFINRNLDTRYASRVVLNEMQSFFESRKYC NTKVKVIRGSLTYQMRQDLHLKKNREESYSHHAVDAMLIAFSQKG YEA YRKIQKDCYDFETGEILDKEKWNYIDDDEFDDILYKERMNEIRKKI IEAEKVKYNYKIDKKCNRGLCNQTIYGTREKDGKIHKISSYNIYDD KECNSLKKMINSKGSDLLMYNNDPKTYRDMLEKILETYSSEKNPFVA YNKETGDYFRKYSKNHNGPKVEKVYYSQGINSCIDISHKYGHAKNS KKVVLVSLNPYRTDVYYDNDTGKYYLVGVKYNHIKCVGNKYVIDSET YNELLRKEGVLNSDENLEDLNSKNITYKFSLYKNDIIQYKGGGEYYT ERFLSRIKEQKNLIETKPIKPNFQRKNKKGEWENTRNQIALAKTKY VGKLVTDVLGNCYIVNMEKFSLVVDK	7
ストレプトコッ カス・パスチュ リアヌス dCas9 (D10A, H599A)	MTNGKILGLAIGIASVGVGII EAKTGKVVHANSRLFSAANAENNAER RGFGRSRLNRRKKHRVKRVRDLFEKYGIVTDFRNLNLPYELRVKG LTEQLKNEELFAALRTISKRRGISYLDADAEDDSTGSTDYAKSIDENR RLLKNKTPGQIQLERLEKYGQLRGNFTVYDENGAEHRLINVFSTSDY EKEARKILETQADYNKKITAEFIDDYVEILTQKRKYHGPNEKSRT DYGRFRTDGTTLENIFGILIGKCNFYDPDEYRASKASYTAQEYNFLND LNNLKVSTETGKLSTEQKESLVEFAKNATATLGPALLKEIAKILDCK VDEIKGYREDDKGKPDLTTFEPYRKLKFNLESINIDDLREVIDKLA DILTLNTEREGIEDAIKRNLPNQFTTEEQISEI IKVRKSQSTAFNKGW HSFSAKLMNELIPELYATSDEQMTILTRLEKFKVNKKSSKNTKTIDE KEVTDEIYNPVVAKSVRQTIKI INAAVKKYGDFDKIVIEPRDKNAD DEKKFIDKRNKENKKEKDDALKRAAYLYNSSDKLPDEVFHGAQKLET KIRLWYQQGERCLYSGKPI SIQELVHNSNNFEIDHILPLSLSFDDSL ANKVLVYAWTNQEKQKTPYQVIDSMDAAWSFREM KDYVLKQKGLGK KKR DYLLTTENIDKIEVKKKFIERNLVDTRYASRVVLNSIQSALREL GKDTKVS VVRGQFTSQLRRKWKIDKSRETYHHHAVDALI IAASSQLK LWEKQDNPMFVDYGNQVVDKQTGEILSVSDDEYKELVFPPYQGFV NTISSKGFEDILFSYQVDSKYNRKVSDATYSTRKAKIGDKKEET YVLGKIKDIYSQNGFDTFIKKYNKDKTQFLMYQKDSL TWENVIEVIL RDPYPTTKKSEDGKNDVKCNPFEEYRRENGLICKYSKKGKGTPIKSLK YYDKKLGNCIDITPEESRNKVLQSINPWRADVFNPETLKYELMGL KYSDLSFEKGTGNYHISQEKYDAIKEKEGIGKKSEFKFTLYRNDLIL IKDIASGEQEIYRFLSRTMPNVNHYVELKPYDKEKFDNVQELVEALG EADKVGRCIKGLNKPNI SIYKVRTDVLGNKYFVKKKGDKPKLDFKNN KK	8

10

20

30

40

【表 1 - 4】

ラクトバチルス ・ファルシミニ ス dCas9 (D10A, H611A)	MTDRLSLGLAIGVASVGFSLDIDKKGKVELGARLFNATVAAGNQDR RDMRGSRRLLNRNKQRRKDVSKLQFQYGLLDNFDRDNFHTAFNNWN PYELRVKGLTKQLNKEELADSLYQIIKRRGISYALKDADANEDGTDY SSSSLKINSQELIEKTPAQIQLQRLNDYGKVRGKVI VGGDDIDDQKVLL NVFPTNAYEKEARQIIATQQQFYPEILTGEFVKEYCQILTRKRDYFV GPGNEKSRTDYGIIYKTDGRTLNDLFEELIGHDKIYPDEL RASAASYT AQLFNVLDLNNLRILSYEDGKLTQIDKEKIIAEIKNNTTVVNMLNV IKKVTGCQKDDIKGFRLEKDKPEISSMPIYRKAHKDFLKVIGIDITD WPIDFIDRLSFILTLNTENGEIRKQINKRLVPDFDFLNDLVLQLIID NKDSFDIKTNNKWHRFSLKTMNKLIPTMIERPVEQMTLLTEMGLIKK DTKRFEGNKYLPYKEIANDIFNPVASKSVREALKIVNAVLKKGHIE YIVIEMPRDKNLDEERKQIADFQKKNKIKDAAFNAFVKAVGSKKNV KIALSKNRKLQMGIRLWHQQQGIDPYNGEEINANDLISNPDKFEIDA IIPQSI SFDDGINNKTLCFASMNQVKGQKTPYEFLNEGHHGGYAKFK AIVSKNKNFSKAKRDNYLFEENVSNIE TRKRFLSRNLVDTRYSSRVV LNSLQEFFHEKSDDTKVTVIRGKFTSNMRKHHWIDKTRDTFHHHAID ASIIAATPFLRMWKKGSTIFPTKINETSIDIETGEILDDKNFQKVMY EEPYSGFISEIMNADRIKFHQVQDKMMNRKVS DATIYSTRIGLSK DKKDAEYVVAKVVDIYSVDGYENFKKVYKKDKTKFLYKYDPRTFSE LEKIVIDYPDKIEKVQTNKGKIKAVDISPFELYRRDNGMVRKYSKKTG PAIKQLKYLDKKLGSHIDITPKNANNKHVVQLSKLPWRTDVYLNHET GEYEIMGIKYSDLKFNKNEGYGIKKDKYLKIKNIEGVSENSEFMFSL YRKDRIKQVQDMETNESVELLFWSRNF SNKKYAE LKPI SQIDNDKVLP IYGRGRLIKRLIPKNCKIWKVNTSILGDTYYLEKESNYPQKILD	9
スピロヘータ・ グロボサ dCas9 (D30A, H635A)	MSKKVSRRYEEQAQEICQRLGSRPYSIGLALGVGSIGVAVAAAYDPIK KQPSDLVFVSSRIFIPSTGAAERRQKRGQRNSLRHRANRLKFLWKL AERNLMLSYSSEQDVPDPARLRFEDAVVRANPYELRLKGLNEQLTSE LGYALYHIANHRGSSSVRTFLDEEKSSDDKLEEQQAMTEQLAKEKG ISTFIEVLTAFTNTGLIGYRNSESVKSGVPVPTDIIISNEIDVLLQ TQKQFYQEILSDEYCDRIVSAILFENEKIVPEAGCCPYFPDEKKLPR CHFLNEERRLWEAINNARIKMPMQEGA AKRYQSASFSDQQRHILFHI ARSGTDITPKLVQKEFPALKTSIIVLQGKEKAIQKIAGFRFRRL EEK SFWKRLSEEQKDDFFSAWTNTPDDKRLSKYLMKHLLLTENEVVDALK TVSLIGDYGPIGKTATQLLMKHLEDGLTYTEALERMETGEFQELSV WEQQSLLPYYGQILTGSTQALMGKYWHS AFKEKRDSEGFFKPNTNSD EEKYGRIANPVVHQTLNELRKL MNELITILGAKPQEITVELARELKV GAEKREDIIKQQTQKEKEAVLAYSKYCEPNNLDKRYIERFRLLEDQA FVCPYCLEHISVADIAAGRADVDAIFPRDDTADNSYGNKVVAHRQCN DIKGKRTPYAAFSNTSAWGPIMHYLDETPGMWRKRKFETNEEEYAK YLQSKGFVSRFESDNSYIAKAAKEYLRCLFNPNNTAVGSLKGMETS ILRKAWN LQGIDDLGSRHWSKDADTSPTMRKNRDDNRHHGLDAIVA LYCSRSLVQMINTMSEQGKRAVEIAMIPIPGYASEPNLSFEAQREL FRKKILEFMDLHAFVSMKTDNDANGALLKDTVYSILGADTQGEDLVF VVKKKIKDIGVKIGDYEEVASAIRGRITDKQPKWYPMEMKDKIEQLQ SKNEAALQKYKESLVQAAAVLEESNRKLIESGKKPIQLSEKTISKKA LELVGYYYYLISNNKRTKTFVVKEPSNEVKGFADTGSNLCDFYHD AQGKLCGEIIRKIQAMNPSYKPAYMKQGYSLYVRLYQGDVCELRASD LTEAESNLAKTTHVRLPNAKPGRTFVIIITFTMGSGYQIYFSNLAK SKKGQDTSFTLTITIKNYDVRKVQLSSAGLVRYVSPLLVDKIEKDEVA LCGE	10

10

20

30

40

【表 1 - 5】

アゾスピリルム (B510株) dCas9 (D75A, H680A)	MARPAFRAPREHVNGWTPDPHRISKPFILVSWHLLSRVVIDSSSG CFPGTSRDHTDKFAEWECAPYRILSFALGTNSIGWGLLNLDRQKGP REIRALGSRI FSDGRDPQDKASLAVARRLARQMRRRDRYLTRRTRL MGALVRFGLMPADPAARKRLEVAVDPYLARERATRELERLEPFEIGRAL FHLNQRGRYKPVRTATKPDEEAGKVKEAVERLEAAIAAAGAPT LGAW FAWRKTRGETLRARLACKGKEAAYPFYPARRMLEAEFDTLWAEQARH HPDLLTAEAREILRHRI FHQRPLKPPFPVGRCTLYPDDGRAFRALPSA QRLRLFQELASIRV HLDLSERPLTPAERDRIVAFVQGRPPKAGRKP GKVQKSVPFELRGLLELPFGTGSLESDDRPELLGDETGARIAPAF GPGWTALPLEEQDALVELLLTEAEFERATAALTARWALDEATAAKLA GATLPDFHGRYCRRVAELLPVLERETRGDPDGRVRFIRLDEAVKLL RGGKDHSDFSREGALLDALPYYGAVLERHVAFGTGNEADPEEKRVGR VANPTVHTALNQLRHVLNAILARHGRPEEIVIELARDLKRSADERRR EDKRGADNQKNEERKRLILSLGERPTPRNLLKLRLWEEQGPVENRR CPYSGETISMRMLLSEQVDIDAILPFSVSLDDSAANKVVCLEARNRI KRNRSPWEAFGHDSEWAGILARAEALPKNKRRWFAPDALEKLEGE GLRARHLNDRHLSRLAVEYLRVCVKVRVSPGRLTALLRRRWGIDA ILAEADGPPPEVPAETLDPSPAENRADHRHHALDAVVIGCIDRSMV QRVQLAAASAEREAAREDNIRRVLEGFKEEPWDGFRAELEERRARTI VVSHRPEHGGIGALHKETAYGPVDPPEEGFNLVVRKFIDGLSKDEIN SVRDPRLRRALIDRLAIRRRDANDPATALAKAAEDLAAQPASRGIRR VRVLKKESENPRVEHGGNPSGPRSGGPFHKL LLAGEVHHVDVALRAD GRRWVGHWVTLFEAHGGRGADGAAAPRLGDGERFLMR LHKGDCLKL EHKGRVVRVMQVVKLEPSSNSVVVVEPHQVKTDRSKHVKISCDQLRAR GARRVTVDP LGRVRVHAPGARVIGGDAGRTAMEPAEDIS	11
グルコンアセト バクター・ジア ノトロフィクス dCas9 (D11A, H587A)	MIDESLTFGIALGIGSCGWAVLRPSAFGRKGVIEGMSWCDFVDPET SKERTPTNQIRRSNRLRRVIRRRNRNMAAIRLLHAAGLLPSTDSD ALKRPGHDPWE LRARGLDKPLKPVEFAVVLGHIAKRRGFKSAAKRKA TNISDDKKMLTALEATRERLGRYRTVGEMFARDPDEASRRNRREGK YDRTTARDDLEHEVHALFAAQRRLGQGFASPELEEAFTASAFHQ RPM QDSERLVGFCPFERTEKRAAKLTPSFERFLLARLLNLRIITPDGER PLTVDEIALVTRDLGKTAKLSIKRVRTLIGLEDNQRFETTIRPEDEDR DIVARTGGAMTGTATLRKALGEALWTDQMERPEQLDAIVQVLSFFEA NETITEKLREGLTLAVLDVLLTALDAGVFAKFKGAHISTKAARNL LPHLEQGRRYDEACTMAGYDHAASRLSHHGQIVAKTQFNALVTEIGE SIANPIARKALTEGLKQIWAMRNHWGLPGSIHVELARDVGNSTEKRR EIEKHIEKNTALRARERREVDLDDLEDVNGDTLLRYRLWKEQGGKC LYTGKAIHIRQIAATDNSVQVDAILPWSRFGDDSFNNKTLCLASANO QKKRSTPYEWLSGQTGDANNAFVQRIETNKELRGFKKRNLYLLKNAKE AEEKFRSRNLNDTRYAARLFAEAVKLLYAFGERQEKGGNRRVFTRP ALTAALRQAWGVESLKKQDGKRRINDRRHHALDALTVAAVDEAEIQL TKSFHEWEQQLGRPLRRVEPPWESFRADVEATYPEVTVARPERRRRA RGEHAATIRQVKERECTPIVFERKAVSSLEADLERIKDGERNEAI VEAIRSWIATGRPADAPPRSPRGDIITKIRLATTIKAAPVVRGGTAG RGEMVRADVFSKPNRRGKDEWYLVFVYPHQIMNRKAWPKPPMRSIVA NKDEDEWTEVGFEHQFRFSLYPRSNIEIIRPSGEVIEGYFVGLHRNT GALIPTVPVGPDSYVIA	12
ネイセリア・シ ネレア dCas9 (D16A, H588A)	MAAFKPNPMNYILGLAIGIASVGWAIVEIDEENPIRLIDLGV RVFE RAEVPKTGDSLAAARRLARSVRRLTRRRARHLLRARLLKREGVLQA ADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPEWSAVLLHLIKHRGYL SORKNEGETADKELGALLKGVADNTHALQTGDFRTPAELALNKFEKE SGHIRNQRGDYSHTFNRKDLQAE LNLLFEKQKEFGNFHVS DGLKEGI ETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPTPEKAAKNITYAERFVWLTK LNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSCLTYAQARKLLDLDDT AFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRLEKEGLKDKKSPLNLSP ELQDEIGTAFSLFKTDEDITGR LKDRVQPEILEAL LKHISFDKFVQI SLKALRRIVPLMEQGNRYDEACTE IYGDHYGKKNTTEEKIYLPPIPAD EIRNPVVLRLALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRK EIEKRQEENRKDREKSAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKRLIYEQQHG KCLYSGKEINLGR LNEKGYVEIDAALPFSRTWDDSFNNKV LALGSEN	13

10

20

30

40

【表 1 - 6】

	QNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKQRILLQKFD EDGFKERNLNDTRYINRFLCQFVADHMLLTGKGKRRVFASNGQITNL LRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTIAMQQKITRFVRYKEMNA FDGKTIIDKETGEVLHQKAHFPQPWEFFAQEVMIKRVFGKPDGKPEFEE ADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHKYVTPLFISRAPNRKMSGQGHMET VKSARLDEGISVLRVPLTQLKLDLEKMNREPERKLYEALKARLE AHKDDPAKAFAPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVVWNHNG IADNATIVRVDVFEKGGKYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQKDEED WTVMDDSEFEKFLYANDLIKLTAKKNEFLGYFVSLNRATGAIDIRT HDTDSTKGKNGIFQSVGVKTALSFOKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPV R	
ロゼブリア・イ ンデステイナリ ス dCas9 (D24A, H628A)	MRENGSDERRRRNDEKMDYRIGLAIGIASVGWAVLQNNSDDEPVRIV DLGVRIFDTAETPKTGESLAGPRAARTTRRLRRRKHRLDRIKWLF ENQGLINIDDFLKRYNMAGLPDVYQLRYEALDRKLTDEELAQVLLHI AKHRGFRSTRKAETAAKENGAVLKATDENQKRMQEKGYRTVGEMIYL DEAFRTGCCSWSEKGYILTPRNKAENYQHTMLRAMLVVEEVEIFSSQR RLGNEKATEELEEKYLEIMTSQRSFDLPGMQPDGKPSPYAMEGFS RVGKCTFLGDQGEELRGAKGTYTAEYFVALQKINHTKLVNQDGETRNF TEEERRALTLLFTQKEVKYAAVRKKLGLPEDILFYNLNYKKAATKE EQOKENONTEKAKFIGMPYYHDYKKCLEERVKYLTENEVRDLFDEIG MILTCYKNDSDRTERLAKLCLVPIEMECLLAYTPTKQHLMSKAMRN IIPFLEKGMTYDKACEEAGYDFKADSKGTQKLLTGENVQNTINEIT NPVVKRSVSQTVKVINAIIRTYGSPQAINIELAREMSKTFEERRKIK GDMEKRQKNNEDVKKQIQELGKLSPTGQDILKYRLWQEQGGICMYS KTIPLLEELFKPGYDIDAILPYSITFDDSRNKVLVTSQENRQKGNRT PYEYMGNDQQRWNEFETRVTIRDYKKQKLLKKHFESEERSEFKE RNLTDTKYITTVIYNMIRQNLMAPLNRPEKKQVRAVNGAITAYLR KRWGLPQKNRETDTHAMDAVVIACCTDGMQIKISRYTKVRERCYSK GTEFVDAETGEIFRPEDYSRAEWDEIFGVHPIPKFWETFAELDVRMG DDPKGFLDTHSDVALELDYPEYIYENLRPIFVSRMPNHKVTGAHAH TIRSPRHFKDEGIVLTKTALTDLKLDKDGIEDGYNPNQSDLLLYEAL KKQLLLYGNDAKKAFQDFHKKPKADGTEGPVVRKVKIQKKQTMGVFV DSGNGIAENGMVRIDVFRVNGKYFVFPVYTAADVKKVLPNRASTAH KPYGEWKVMDKDFLSLYSRDLIHKSKKDIPIKMVNGMGMEGIKET YAYYIGADISAANIQGIADHSRYKFRGLGIQSLDVLEKQCIDVLGHV SVVRSEKRMGFS	14
バルビバクルム ・ラバメンチボ ランス dCas9 (D8A, H601A)	MERIFGFAIGTTSIGFSVIDYSSISQAGNIQRLGVRIFFPEARDPDGT PLNQORRQKRMRRQLRRRRIRRKALNETLHEAGFLPAYGSADWPV MADEPYELRRRGLEEGLSAYEFGRALYHLAQHRHFKGRELEESDTPD PDVDDEKEAANERAATLKALKNEQTTLGAWLARRPPSDRKRGIHAHR NVVAEEFERLWEVQSKFHPALKSEEMRARI SDTIFAQRVPVWRKNTL GECRFMPGPEPLCPKGSWLSQQRMLKLNLA TAGGNARPLDAEERD AILSKLQQQASMSWPGVRSALKALYKQGEPGAESKLFNLELGGES KLLGNALAKLADMFGPDWFAHPRKQEI RHAVHERLWAADYGETPDK KRVIIILSEKDRKAHREAAANSFVADFGITGEQAAQLQALKLPTGWEP YSTIPAINLFI AELEKGERFGALVNGPDWEGWRRTNFPHRNQPTGETL DKLPSPASKEERERISQLRNPTVVRTQNELRKVVNNLIGLYGKPDRI RIEVGRDVGKSKREREIEIQSGIRNEKQKKATEDLIKNGIANPSRD DVEKWILWKEGQERCPTYGDQIGFNALFREGRYEVEAIWPRSRSFDN SPRNKTLCKRDVNIKGNRMFFEAFGHDEDRWSAIQIRLQGMVSAKG GTGMSPGKVKRFLAKTMPEDFAARQLNDTRYAAQILAQILRLWPD GPEAPVKVEAVTGQVTAQLRKLWTLNLI LADDEKTRADHRHHAIDA LTVACTHPGMTNKL SRYWQLRDDPRAEKPALTPPWD TIRADA EKAVS EIVVSHRVRKKVSGPLHKETTYGDTGTDIKTKSGTYRQFVTRKKIES LSKGE LDEIRD PRIKEIVA AHVAGRGDPKKAFFPPYPCVSPGGPEIR KVRLTSKQQLNLMAQTGNGYADLGSNNHIAIYRLPDGKADFEIVSLF DASRRLAQRNPIVQRTRADGASFVMSLAAGEAIMIPEGSKKGIWIVQ GVWASGVVLERD TDADHSTTRFMPNPILKDDAKKVSIDPIGRVPR SND	15

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

ニトラチフラク ター・サルスギ ニス(DSM 1651 1株) dCas9 (D8A, H611A)	MKKILGVALGITSFGYAILQETGKDLRCLDNSVVMRNNPYDEKSGE SSQSIRSTQKSMRRLIEKRKKRIRCVAQTMERYGILDYSETMKINDP KNNPIKNRWQLRAVDWKRLPLSPQELFAIFAHMAKHARGYKSIATEDL IYELELELGLNDPEKESEKKADERRQVYNALRHLEELRKKYGGETIA QTIHRAVEAGDLRSYRNHDDYEKMIRREDIEEEEIEKVLLRQAEALGAL GLPEEQVSELIDELKACITDQEMPTIDESLFGKCTFYKDELAAPAYS YLYDLRRLYKKLADLNIDGYEVTQEDREKVIEWVEKKIAQGKNLKKI THKDLRKILGLAPEQKIFGVEDERIVKGKKEPRTFVPPFFFLADIAKF KELFASIQKHPDALQIFRELAEILQRSKTPQEALDRLRALMAGKGID TDDRELLELFKNKRSRGTRLSHRYILEALPLFLEGYDEKEVQRILGF DDREDYSRYPKSLRHLHLREGNLFEEKEENPINNHAVKSLASWALGLI ADLSWRYGPFDEIILETTRDALPEKIRKEIDKAMREREKALDKIIGK YKKEFPSIDKRLARKIQLWERQKGLDLYSGKVINLSQLLDGSADIEA IVPQSLGGLSTDYNTIVTLKSVNAAGNRLPGDWLAGNPDYRERIGM LSEKGLJDWKKRKNLLAQSLDEITYTENTHSGKIRATSYLEALVAQVL KRYYPFPDPPELRKNGIGVRMIPGKVTSKTRSLGKSKSRETNFHHHA EDALILSTLTRGWQNRHLRMLRDNYGKSEAEKELWKKYMPHIEGLT LADYIDEAFRRFMSKGEESLFYRDMFDTIRSISYWVDKKPLSASSHK ETVYSSRHEVPTLRKNILEAFDSLNVIKDRHKLTTTEEFMKRYDKEIR QKLWLHRIGNTNDESYRAVEERATQIAQILTRYQLMDAQNDKEID EK FQQALKELITSPIEVTGKLLRKMRFVYDKLNAMQIDRGLVETDKNML GIHISKGPNEKLI FRMDVNNAHELQKERSGILCYLNEMLFIFNKKG LIHYGCLRSYLEKGQGSKYIALFNPRFPANPKAQPSKFTSDSKI KQV GIGSATGIKAHLDLDCHVRSYEVFGTLPESGIEWFKEESCYGRVED DPHH	16
カンピロバクテ ー・ラリ dCas9 (D7A, H567A)	MKILGFAIGINSIGWAFVENDELKDCGVRI FTEAENPSNKE SLALPR RNARSSRRRLKRRKARLVAIKRILAKELKLNFKDYVAADGELPKAYE GKLTSIYELRYKALIQQLETKDLARVILHIAKHRYGMNKNKESNDT KKGKILSALKNNALKLENYQSVGEYFYKEFFQKYKENTKNFIKIRNT KDNYNNCVLSDDLKELKLILEKQKEFGYNYSEDFINEILKVAFFQR PLKDFSHLVGACTFFEEEEKRACKNSYSAWEFVALTKIINEIKSLEKI SGEIVPTQTINEILNLILDKGSITYKKFRSCINLHESISFKSLKYDK ENAENAKLIDFRKLVEFKKALGVHSLSRQELDQISTHITLIKDNVKL KTVLEKYNLSNEQINNLLIEFNDYINLSFKALGMILPLMREGKRY EACEITNLKPKTVDEKEDFLPAFCDSIFAHELSPVNNRAISEYRKV LNALLKKYGKVHVKIHLELARDVGLSKKAREKIEDQQKNNKAINDWAL KECENIGIKASAKNILKLKLWKEQKEICISGNKISIEHLKDEKALE VDAIYPYSRSFDDSFINKVLVFTKENQEKLNKTPEAFGKNIEKWSK IQTLAQNLPHYKKKNKILDENFKDKQQQDFISRNLNDTRYITTLIAKY TKEYLNLFLPLSENENTNLKSGEKGSKIHIQTISGMLTSVLRHTWGFD KKDRNNHLHHDALDAIIVAYSTSSIIKAFSDFKKNQELLKARFYAKEL TSDNYKHQVKFFEPFKGFREKILSKIDEIFVSTPPRKRARGALHEET FYSEDKMIKKYNSKEGLQIALSCGRVRKIGTKYVENDTMVRVDIFKK QNKFYAIPYVMDFALGILPNKIVITGKDKNNNPKQWQTIDESYEFC FSLYKNDLILLQKKNMQEPEFAYYNSFDIDRSRIKIKKHNDKFENLT SNQKLLFTNKDKGKNRTGIQNLKIFEKYIVTPLGDKIKADFPRENI SLKTSKKHGL	17

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

ストレプトコッカス・サーモフィルス(<i>LMD-9</i> 株) <i>dCas9</i> (<i>D10A, H847A</i>)	MTKPYSIGLAIGTNSVGWAVTTDNYKVPSKKMKVLGNTSKKYIKKNL LGVLLFDGSGITAEGRRLKRTARRRYTRRRNRILYLQEIFSTEMATLD DAFFQRLDDSLVLPDDKRDSKYPIFGNLVEEKAYHDEFPTIYHLRKY LADSTKKADLRLVYLALAHMIKYRGHFLIEGEFNSKNNDIQKNFQDF LDTYNAIFESDLSLENSKQLEEIVKDKISKLEKKDRILKLFPGKNS GIFSEFLKLIVGNQADFRKCFNLDEKASLHFSKESYDEDLETLLGYI GDDYSDVFLKAKKLYDAILLSGFLTVDNETEAPLSSAMIKRYNEHK EDLALLKEYIRNISLKYNEVFKDDTKNGYAGYIDGKTNQEDFYVYL KKLLAEFEGADYFLEKIDREDFLRKQRTFDNGSIPYQIHLQEMRAIL DKQAKFYFPLAKNKERIEKILTFRIPYVVGPLARGNSDFAWSIRKRN EKITPWNFEDVIDKESSAEAFINRMTSFDLYLPPEKVLPHKSLLYET FNVYNELTKVRFIAESMRDYQFLDSKQKKDIVRLYFKDKRKVTDKDI IEYLHAIYGYDGIELKGIKQFNSSLSTYHDLNLIINDKEFLDDSSN EAIIEEIIHTLTIFEDREMIKQRLSKFENIFDKSVLKKLSRRHYTGW GKLSAKLINGIRDEKSGNTILDYLIIDDGISNRNFMQLIHDDALSFKK KIQKAQIIGDEDKGNIKEVVKSLPGSPAIAKKGILQSIKIVDELVKVM GGRKPESIVVEMARENQYTNQGKSNSQQRLKRLEKSLKELGSKILKE NIPAKLSKIDNNALQNDRLYLYLQNGKDMYTGDDLDIDRLSNYDID AII PQAFKLDNSIDNKVLVSSASNRGKSDDVPSLEVVKRKTFWYQL LKSKLISQRKFDNLTKAERGGGLSPEDKAGFIQRQLVETRQITKHVAR LLDEKFNNKKDENNRRAVRTVKIITLKSTLVSQFRKDFELYKVREIND FHHAHDAYLNAVVASALLKKYPKLEPEFVYGDYPKYNSFRERKSATE KVYFYSNIMNIFKKSISLADGRVIERPLIEVNEETGESVWNKESDLA TVRRVLSYPQVNVVKKVVEEQNHGLDRGKPKGLFNANLSSKPKPNSNE NLVGAKEYLDPKKYGGYAGISNSFTVLVKGTEIEGAKKKITNVLEFQ GISILDRINRDKLNFLEKGYKDIELIELPKYSLFELS DGSRRM LASILSTNNKRGEIHKGNQIFLSQKFVKLLYHAKRISNTINENHRKY VENHKKEFEELFYIILEFNENYVGAKKNGKLLNSAFQSWQNHSIDEL CSSFIGPTGSEKGLFELTSRGSAADEFELGVKIPRYRDYTPSSLLK DATLIHQSVTGLYETRIDLAKLGEG	18
--	---	----

10

20

【0180】

Cas9 融合タンパク質

CRI SPR / Cas9 系システムは、融合分子 [例えば DNMT3A-DNMT3L (3A3L) - dCas9-KRAB] を含んでよい。融合分子は、少なくとも1つの DNA 結合性タンパク質 (例えば dCas9) および遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーター (例えば KRAB、DNMT3A、DNMT3L、DNMT3A-DNMT3L 融合ペプチド) を含んでよい。一部の実施形態では、遺伝子発現のモジュレーターは、遺伝子発現のリプレッサー (例えば KRAB)、遺伝子発現のアクチベーター、または遺伝子外変換のモジュレーター (例えば DNMT3A、DNMT3L、DNMT3A-DNMT3L 融合タンパク質) またはそれらの任意の組合せから選択される。当技術で遺伝子発現の様々なモジュレーターが知られている。例えば全体が参照により本明細書に組み込まれる Thakore ら、Nat Methods. 2016; 13: 127~37 ページを参照されたい。

30

40

【0181】

遺伝子発現のリプレッサー

一部の実施形態では、遺伝子発現のモジュレーターは、遺伝子発現のリプレッサーを含む。リプレッサーは、遺伝子発現の任意の既知のリプレッサー、例えば Kruppel 関連ボックス (KRAB) ドメイン、mSin3 相互作用ドメイン (SID)、MAX-相互作用タンパク質1 (MXI1)、クロモシャドウドメイン、EAR 抑制ドメイン (SRDX)、真核生物放出因子1 (ERF1)、真核生物放出因子3 (ERF3)、テトラサイクリンリプレッサー、lad リプレッサー、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) G ボックス結合因子1および2、ショウジョウバエ (*Drosophila Groucho*)、トリパータイトモチーフ含有28 (TRTM28)、核受容体共リプレッサー1、核受容体共

50

リプレッサー 2、またはそれらの断片もしくは融合体から選択されるリプレッサーであってよい。

【0182】

Kruppel 関連ボックス (KRAB)

KRABドメインは、多くのジンクフィンガータンパク質系転写因子のN末端部分に存在する一種の転写抑制ドメインである。KRABドメインは、DNA結合ドメインによって標的DNAに繋がれた場合に、転写リプレッサーとして機能する。KRABドメインは荷電したアミノ酸が富化されており、サブドメインAおよびBに分割されていることがある。KRABのAおよびBのサブドメインは可変スペーサーセグメントによって分離されていることがあり、多くのKRABタンパク質はAサブドメインのみを含む。KRAB Aサブドメインにおける45アミノ酸の配列が、転写抑制に重要であることが示されてきた。Bサブドメインはそれ自体では転写を抑制しないが、KRAB Aサブドメインによって発揮される抑制を強化する。KRABドメインは、共リプレッサーKAP1 (KRAB 関連タンパク質1。転写仲介因子1ベータ、KRAB-A相互作用タンパク質、およびトリパータイトモチーフタンパク質28としても知られている) およびヘテロクロマチンタンパク質1 (HP1)、ならびにその他のクロマチン調節タンパク質を動員し、ヘテロクロマチンの形成を通して転写の抑制をもたらす。一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、KRABドメインまたはその断片と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。一実施形態では、KRABドメインまたはその断片は、dCas9分子のN末端に融合する。一実施形態では、KRABドメインまたはその断片は、dCas9分子のC末端に融合する。一実施形態では、KRABドメインまたはその断片は、dCas9分子のN末端とC末端の両方に融合する。一実施形態では、融合分子は、配列番号22の配列、配列番号22と実質的に同一（例えば少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%またはそれ以上同一）の配列、または配列番号22に対して1つ、2つ、3つ、4つ、5つもしくはそれ以上の変更、例えばアミノ酸の置換、挿入、もしくは欠失を有する配列、またはそれらの任意の断片を含む。

10

20

【0183】

例示的なKRABドメイン配列：RTLVTFKDV FVDFTREEWKLLDTAQ QIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGE EEP (配列番号22)

30

【0184】

mSin3 相互作用ドメイン (SID)

mSin3 相互作用ドメイン (SID) は、いくつかの転写抑制タンパク質の上に存在する相互作用ドメインである。これは、mSin3の対形成した両親媒性アルファヘリックス2 (PAH2) ドメイン、即ちmSin3 A共リプレッサー等の転写リプレッサータンパク質に結合した転写リプレッサードメインと相互作用する。一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、mSin3 相互作用ドメインまたはその断片と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、連結された4つのmSin3 相互作用ドメイン (SID4X) と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。一実施形態では、連結された4つのmSin3 相互作用ドメイン (SID4X) は、dCas9分子のC末端に融合している。

40

【0185】

MAX 相互作用タンパク質1 (MXI1)

Mxi1はMYCのリプレッサーである。Mxi1は、おそらくMYCに結合してMYCが機能するために必要とされるMYC関連因子X (MAX) への結合について競合することによって、MYCの転写活性に拮抗する。一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、Mxi1またはその断片と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。一実施形態では、Mxi1はdCas9分子のC末端に融合している。

【0186】

遺伝子発現のアクチベーター

50

一部の実施形態では、遺伝子発現のモジュレーターは、遺伝子発現のアクチベーターを含む。アクチベーターは、遺伝子発現の任意の既知のアクチベーター、例えばVP16活性化ドメイン、VP64活性化ドメイン、p65活性化ドメイン、エプスタインバーウイルスRトランスアクチベーターRta分子、またはそれらの断片であってよい。dCas9分子とともに用い得る活性化は当技術で既知である。例えば全体が参照により本明細書に組み込まれるChavezら、Nat Methods. (2016) 13:563~67ページを参照されたい。

【0187】

VP16、VP64、VP160

VP16は、転写アクチベーターを動員してプロモーターおよびエンハンサーにする16アミノ酸のウイルスタンパク質配列である。VP64は、VP16の4つのコピーを含む転写アクチベーター、例えばGly-Serリンカーによって接続されたVP16の4つのタンデムコピーを含む分子である。VP160は、VP16の10個のコピーを含む転写アクチベーターである。一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、VP16の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のコピーと融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、VP64と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、VP160と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。一実施形態では、VP64は、dCas9分子のC末端、N末端、またはN末端とC末端の両方に融合している。

【0188】

p65活性化ドメイン (p65AD)

p65ADは、F-κB転写因子の核型の65kDaポリペプチドの主要なトランス活性化ドメインである。ヒト転写因子p65の例示的な配列は、UniProtデータベースで受託番号Q04206の下に入手可能である。一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、p65またはその断片、例えばp65ADと融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。

【0189】

エプスタインバーウイルス (EBV) Rトランスアクチベーター (Rta)

EBVの前初期タンパク質であるRtaは、溶菌遺伝子発現を誘導する転写アクチベーターであり、ウイルスの再活性化を誘発する。一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、Rtaまたはその断片と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。

【0190】

VP64、p65、Rta融合体

一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、VP64、p65、Rta、またはそれらの任意の組合せと融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。その中で3つの転写活性化ドメインが短いアミノ酸リンカーを用いて融合されたトリパーティトアクチベーターVP64-p65-Rta (VPRとしても知られている) は、dCas9分子と融合した場合に効果的に標的遺伝子発現を上方制御することができる。一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、VPRと融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。

【0191】

相乗的活性化メディエーター (SAM)

一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、3つの成分、(1) dCas9-VP64融合体、(2) テトラループおよびステムループに2つのMS2 RNA アプタマーを組み込んだgRNA、および(3) MS2-P65-HSF1活性化ヘルパータンパク質を含むCRISPR-Casシステムを含む。このシステムは相乗的活性化メディエーター (SAM) と命名され、3つのアクチベータードメインVP64、P65、およびHSF1が一緒になっており、全体が参照により本明細書に組み込まれるKon

ermannら、Nature. 2015; 517: 583～8ページに記載されている。

【0192】

Ldb自己会合ドメイン

一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、Ldb自己会合ドメインと融合したdcas9分子を含む融合分子を含む。Ldb自己会合ドメインは、エンハンサー関連内因性Ldbを動員する。

【0193】

遺伝子外変換のモジュレーター

一実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、遺伝子発現のモジュレーターと融合したdcas9分子を含む融合分子を含む。一部の実施形態では、遺伝子発現のモジュレーターは、遺伝子外変換のモジュレーターを含む。一実施形態では、融合分子は、標的遺伝子の制御エレメント、例えばプロモーター、エンハンサー、または転写開始部位において、遺伝子外変換を介して、例えばヒストンのアセチル化もしくはメチル化、またはDNAのメチル化を介して、標的遺伝子の発現を調節する。モジュレーターは、遺伝子外変換の任意の既知のモジュレーター、例えばヒストンアセチルトランスフェラーゼ（例えばp300触媒ドメイン）、ヒストンデアセチラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼ [例えばSUV39H1またはG9a (EHMT2)]、ヒストンデメチラーゼ（例えばLSD1）、DNAメチルトランスフェラーゼ（例えばDNMT3aまたはDNMT3a-DNMT3L）、DNAデメチラーゼ（例えばTET1触媒ドメインまたはTDG）、またはそれらの断片であってよい。

10

20

【0194】

ヒストン変換活性

一部の実施形態では、遺伝子外変換のモジュレーターはヒストン変換活性を有し得る。ヒストン変換活性は、ヒストンデアセチラーゼ、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、ヒストンデメチラーゼ、またはヒストンメチルトランスフェラーゼの活性を含んでよいが、それだけに限定されない。

【0195】

一部の実施形態では、遺伝子外変換のモジュレーターはヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を有し得る。ヒストンアセチルトランスフェラーゼは、p300またはCREB結合性タンパク質 (CBP) タンパク質またはその断片であってよい。一部の実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、アセチルトランスフェラーゼp300またはその断片、例えばp300の触媒コアと融合したdcas9分子を含む融合分子を含む。一部の実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、CREB結合性タンパク質 (CBP) タンパク質またはその断片と融合したdcas9分子を含む融合分子を含む。

30

【0196】

一部の実施形態では、遺伝子外変換のモジュレーターはヒストンデメチラーゼ活性を含んでよい。例えば、遺伝子外変換のモジュレーターは、核酸またはタンパク質（例えばヒストン）からメチル (CH₃-) 基を除去する酵素を含んでよい。一部の実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、Lys特異的ヒストンデメチラーゼ1 (LSD1) またはその断片と融合したdcas9分子を含む融合分子を含む。

40

【0197】

一部の実施形態では、遺伝子外変換のモジュレーターはヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有し得る。一部の実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、SUV39H1またはその断片と融合したdcas9分子を含む融合分子を含む。一部の実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、G9a (EHMT2) またはその断片と融合したdcas9分子を含む融合分子を含む。

【0198】

DNAデメチラーゼ活性

50

一部の実施形態では、遺伝子外変換のモジュレーターはDNAデメチラーゼ活性を有し得る。例えば、遺伝子外変換のモジュレーターは、DNAを脱メチル化するための機構として、メチル基をヒドロキシメチルシトシンに変換 (convert) し得る。一部の実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、10-11転座メチルシトシンジオキシゲナーゼ1 (TET1) またはその断片と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。一部の実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、チミンDNAグリコシラーゼ (TDG) またはその断片と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。

【0199】

DNAメチラーゼ活性

一部の実施形態では、遺伝子外変換のモジュレーターはDNAメチラーゼ活性を有し得る。例えば、遺伝子外変換のモジュレーターは、メチル基のDNA、RNA、タンパク質、小分子、シトシン、またはアデニンへの転移に関与するメチラーゼ活性を有し得る。一部の実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、DNMT3Aまたはその断片と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。一部の実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、DNMT3Lまたはその断片と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。一部の実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、DNMT3LおよびDNMT3Lまたはそれらの断片と融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。一部の実施形態では、本明細書で開示する方法および組成物は、DNMT3A-DNMT3L融合ペプチドと融合したdCas9分子を含む融合分子を含む。

【0200】

DNMT3A:

MNHDQEFDPKVPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRYIASEVCE
DSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGL
YEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLSNPVM
DAKEVSAAHRRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRS
NSIKQGKDQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRS
WSVPVIRHLFAPLKEYFACV (配列番号23)

【0201】

DNMT3L:

MGPMEIYKTVSAWKRPVRVLSLFRNIDKVLKSLGFLESGSGSGGGTLKYVEDVTNV
VRRDVEKWGPFDLVYGSTQPLGSSCDRCPGWYMFQFHRILQYALPRQESQRPFFWI
FMDNLLLTEDDQETTTRFLQTEAVTLQDVRGRDYQNAMRVWSNIPGLKSKHAPLTP
KEEEYLQAQVRSRSLDAPKVDLLVKNCLLPLREYFKYFSQNSLPL (配列番号24)

【0202】

DNMT3A-DNMT3L融合ペプチド

MNHDQEFDPKVPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRYIASEVCE
DSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGL
YEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLSNPVM
DAKEVSAAHRRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRS
NSIKQGKDQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRS
WSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGNSNANSRGPSFSSGLVPLSLRGSHMGPMEIYKTV
SAWKRPVRVLSLFRNIDKVLKSLGFLESGSGSGGGTLKYVEDVTNVVRRDVEKWG
PFDLVYGSTQPLGSSCDRCPGWYMFQFHRILQYALPRQESQRPFFWIFMDNLLLT
EDDQETTTRFLQTEAVTLQDVRGRDYQNAMRVWSNIPGLKSKHAPLTPKEEEYLQAQ
VRSRSLDAPKVDLLVKNCLLPLREYFKYFSQNSLPL (配列番号27)

【0203】

一実施形態では、Cas9融合タンパク質は、核局在化配列 (NLS)、例えばCas9のN末端及び／またはC末端に融合したLSも含む。

【0204】

核局在化配列は当技術で既知である。一実施形態では、NLSは、配列番号25もしくは

10

20

30

40

50

は26のアミノ酸配列、配列番号25もしくは26と実質的に同一（例えば少なくとも80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一）の配列、または配列番号25もしくは26に対して1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の変更、例えばアミノ酸の置換、挿入、もしくは欠失を有する配列、またはそれらの任意の断片を含む。

【0205】

配列番号25（例示的な核局在化配列）：

APKKKRKVG I HGVPA A

【0206】

配列番号26（例示的な核局在化配列）：

KRPAA TKKAGQA KKKK

【0207】

一部の実施形態では、CRISPR/Cas9系システムは、dCas9分子および遺伝子発現のモジュレーター、またはdCas9分子および遺伝子発現のモジュレーターをコードする核酸を含んでよい。一実施形態では、dCas9分子および遺伝子発現のモジュレーターは共有的に連結されている。一実施形態では、遺伝子発現のモジュレーターは、dCas9分子に共有結合で直接融合している。一実施形態では、遺伝子発現のモジュレーターは、非モジュレーターもしくはリンカーを介して、または第2のモジュレーターを介して、dCas9分子に共有結合で間接的に融合している。一実施形態では、遺伝子発現のモジュレーターは、dCas9分子のN末端および／またはC末端にある。一実施形態では、dCas9分子および遺伝子発現のモジュレーターは、非共有結合で連結されている。例示的な配列には、それだけに限らないが、表2に列挙したものが含まれる。一部の実施形態では、dCas9と遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターの間のリンカーは、表2に列挙したリンカーに対応するアミノ酸配列を含む。

【0208】

【表2】

表2. 例示的なリンカー配列

説明	配列	配列番号
リンカー	SSGNSNANSRGPSFSSGLVPLSLRGS	19
<i>XTEN80</i> リンカー	GGPSSGAPPPSGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE	20
<i>XTEN16</i> リンカー	SGSETPGTSESATPES	21

【0209】

一実施形態では、dCas9分子は、第1のタグ、例えば第1のペプチドタグと融合している。一実施形態では、遺伝子発現のモジュレーターは、第2のタグ、例えば第2のペプチドタグと融合している。一実施形態では、第1および第2のタグ、例えば第1のペプチドタグおよび第2のペプチドタグは互いに非共有結合で相互作用し、それにより、dCas9分子と遺伝子発現のモジュレーターを緊密に接近させる。

【0210】

一実施形態では、CRISPR/Cas9系システムは、融合分子または融合分子をコードする核酸を含む。一実施形態では、融合分子は、遺伝子発現のモジュレーターと融合したdCas9を含む配列を含む。一実施形態では、dCas9分子は、ストレプトコッカス・ピオゲネスdCas9分子、スタフィロコッカス・アウレウスdCas9分子、カンピロバクター・ジェジュニdCas9分子、コリネバクテリウム・ジフテリアdCas9分子、ユーバクテリウム・ベントリオスムdCas9分子、ストレプトコッカス・パストチリアヌスdCas9分子、ラクトバチルス・ファルシミニスdCas9分子、スピロ

ヘータ・グローブス d C a s 9 分子、アゾスピリルム (B 5 1 0 株) d C a s 9 分子、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス d C a s 9 分子、ネイセリア・シネレア d C a s 9 分子、ロゼブリア・インテスティナリス d C a s 9 分子、パルビバクルム・ラバメンチボランス d C a s 9 分子、ニトラチフラクター・サルスギニス (D S M 1 6 5 1 1 株) d C a s 9 分子、カンピロバクター・ラリ (C F 8 9 - 1 2 株) d C a s 9 分子、ストレプトコッカス・サーモフィルス (L M D - 9 株) d C a s 9 分子、またはそれらの断片を含む。

【 0 2 1 1 】

一実施形態では、融合分子は、N末端からC末端へ、直接または間接的に（例えばリンカーを介して）融合した、DNMT3A-DNMT3L融合ペプチド（3A3L）、d C a s 9 ペプチド、およびKRABペプチドドメインを含む、DNMT3A-DNMT3L（3A3L）-d C a s 9 -KRAB融合分子である。

10

【 0 2 1 2 】

一実施形態では、融合分子は、N末端からC末端へ、直接または間接的に（例えばリンカーを介して）融合した、DNMT3A-DNMT3L融合ペプチド（3A3L）、d C a s 9 ペプチド、およびKRABペプチドドメインを含む、DNMT3A-DNMT3L（3A3L）-d C a s 9 -KRAB融合分子である。

【 0 2 1 3 】

一実施形態では、融合分子は、配列番号28のアミノ酸配列、配列番号28と実質的に同一の（例えば配列同一性が少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い）配列、または配列番号28に対して1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の変更、例えば置換、挿入、もしくは欠失を有する配列、またはそれらの任意の断片を含む。

20

【 0 2 1 4 】

DNMT3A-DNMT3L（3A3L）-d C a s 9 -KRAB

30

40

50

【化 1】

MNHDQEFDPKVPVPAEKRPIRVLSLFDGIATGLLVKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGM
VRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLL
HDARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLSNPVMIDAKEVSAHRARYFWGNLPGMN
RPLASTVNDKLELQECLHEGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQKQDQHFVFMNEKEDILWCTEMER
VFGFPVHYTDVSNMSRLARQRLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACVSSGNSNANSRGPFSFSSGL
VPLSLRGSIMGPMIYKTVSAWKRPVRVLSLFRNIDKVLKSLGFLESGSGSGGGTLKYVEDVT
NVVRDVEKWGPFDLVYGSTQPLGSSCDRCPGWYMFQFHRILQYALPRQESQRPFFWIFMDNLL
LTEDDQETTTRFLQTEAVTLQDVRGRDYQNAMRVWSNIPGLKSKHAPLTPKEEYLAQVRSRS
KLDAPKVDLLVKNCLPLREYFKYFSQNSLPLGGPSSGAPPPSGGSPAGSPTSTEEGTSESATP
ESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEPKKKKRKMDKKYSIGL
AIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYT
RRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSESLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYH
LRKKLVDDSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPI
NASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQ
LSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAKNLSAAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH
QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIPKILEKMDGTEELLVKL
NREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLAR
GNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVY
NELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED
RFNASLGTYHDLKI IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMK
QLKRRRYTGWGRSLRKLINGIRDQSGKITLDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQV
SGQGDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNS
RERMKRIEEG IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAI
VPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAER
GGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKD
FQFYKVRREINNYHHAHDAYLNAVVGTA LKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKAT
AKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKK
TEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVK
ELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE
LALPSKYVNFLYLASHYEKLKGPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLDK
VLSAYNKHDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI
GLYETRIDLSQLGGDAYPYDVPDYASLGSGSPPKKKKRKMVEDPKKKKRKMVDGSGSETPGTSESATPE
SRTLVTFKDVFDFTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEP
 (配列番号28)

10

20

30

40

【0215】

gRNA

本明細書で用いる場合、CRISPR-Casシステムに関する用語「ガイド配列」は、標的核酸配列とハイブリダイズし、核酸標的複合体の標的核酸配列への配列特異的結合を指令するために十分な標的核酸配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含む。ガイド配列は標的配列とデュプレックスを形成し得る。デュプレックスはDNAデュプレックス、RNAデュプレックス、またはRNA/DNAデュプレックスであってよい。用語「ガイド分子」および「ガイドRNA」および「シングルガイドRNA」は本明細書で相互交換可能に用いられ、CRISPR-Casタンパク質と複合体を形成するこ

50

とができ、標的核酸配列とハイブリダイズして複合体の標的核酸配列への配列特異的結合を指令するために十分な標的核酸配列との相補性を有するガイド配列を含むRNA系分子を指す。ガイド分子またはガイドRNAは、本明細書に記載したように、具体的には1つまたは複数の化学的(chemically)改変[例えば2つのリボヌクレオチドの化学的連結(chemical linking)または1つもしくは複数のリボヌクレオチドの1つもしくは複数のデオキシリボヌクレオチドによる置換え]を有するRNA系分子を包含する。

【0216】

CRISPR-Casタンパク質のガイド分子またはガイドRNAは、tracrメイト配列(内因性CRISPRシステムに関連して「ダイレクトリピート」を包含する)およびガイド配列(内因性CRISPRシステムに関連して「スペーサー」とも称する)を含んでよい。一部の実施形態では、本明細書に記載したCRISPRシステム-Casシステムまたは複合体は、tracr配列を含まず、および/またはその存在に依拠しない。ある特定の実施形態では、ガイド分子は、ガイド配列またはスペーサー配列と融合したまたはこれに連結されたダイレクトリピート配列を含むか本質的にこれからなるか、これからなつてよい。一部の実施形態では、ガイド分子またはsgRNAは、配列番号59で説明されるtracr配列を含む。

10

【0217】

例示的なtracr配列:

g t t t t a g a g c t a G A A A t a g c a a g t t a a a a t a a g g c t a g t c
c g t t a t c a a c t t g a a a a a g t g g c a c c g a g t c g g t g c (配列番号59)

20

【0218】

一般に、CRISPR-Casシステムは、標的配列の部位におけるCRISPR複合体の形成を促進するエレメントによって特徴付けられる。CRISPR複合体の形成に関連して、「標的配列」は、それに対してガイド配列が相補性を有するように設計された配列を指し、標的DNA配列とガイド配列とのハイブリダイゼーションがCRISPR複合体の形成を促進する。

【0219】

ある特定の実施形態では、ガイド分子のガイド配列またはスペーサーの長さは、長さ15~50ヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、ガイドRNAのスペーサーの長さは、少なくとも長さ15ヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、スペーサーの長さは、長さ15~17ヌクレオチド、長さ17~20ヌクレオチド、長さ20~24ヌクレオチド、長さ23~25ヌクレオチド、長さ24~27ヌクレオチド、長さ27~30ヌクレオチド、長さ30~35ヌクレオチド、または長さ35ヌクレオチド超である。

30

【0220】

一部の実施形態では、ガイド配列は、長さ15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100ヌクレオチドである。

40

【0221】

一部の実施形態では、ガイド分子(ダイレクトリピートおよび/またはスペーサー)の配列は、ガイド分子内の二次構造の程度を低減するように選択される。一部の実施形態では、核酸を標的とするガイドRNAのヌクレオチドの約75%、50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%、またはそれ未満が、最適に折り畳まれた場合に自己相補性塩基対形成に寄与する。最適な折り畳みは、任意の好適なポリヌクレオチド折り畳みアルゴリズムによって決定してよい。一部のプログラムは、最小ギブス自

50

由エネルギーの計算に基づいている。そのようなアルゴリズムの一例は、ZukerおよびStiegler [Nucleic Acids Res. 9 (1981), 133～148ページ] に記載されたmFoldである。折り畳みアルゴリズムの別の例は、Institute for Theoretical Chemistry at the University of Viennaで開発されたセントロイド構造予測アルゴリズムを用いるオンラインウェブサーバーRNAfoldである [例えばA. R. Gruberら、2008, Cell 106 (1) : 23～24ページ; ならびにPA CarrおよびGM Church, 2009, Nature Biotechnology 27 (12) : 1151～62ページを参照]。

【0222】

上記のように、CRISPR/Cas9システムは、CRISPR/Cas9系システムの標的化を提供するgRNAを利用している。gRNAは2つの非コーディングRNA、即ちcrRNAとtracrRNAの融合体である。sgRNAは、相補性塩基対形成によって標的特異性を付与する20bpのプロトスペーサーをコードする配列を所望のDNA標的と交換することによって、所望の任意のDNA配列を標的とすることができる。gRNAは、II型エフェクターシステムに関与する天然に存在するcrRNA:tracrRNAデュプレックスを模倣している。このデュプレックスは、例えば42ヌクレオチドのcrRNAおよび75ヌクレオチドのtracrRNAを含んでよく、Cas9が標的核酸を切断するためのガイドとして作用する。

【0223】

本明細書で相互交換可能に用いられる用語「標的領域」、「標的配列」、または「プロトスペーサー」は、CRISPR/Cas9系システムが標的とする標的遺伝子の領域を指す。CRISPR/Cas9系システムは少なくとも1つのgRNAを含んでよく、gRNAは異なるDNA配列を標的とする。標的DNA配列は重複していてもよい。標的配列またはプロトスペーサーには、プロトスペーサーの3'末端にPAM配列が続く。異なるII型システムは異なるPAMを必要とする。例えば、S.ピオゲネスII型システムは「NGG」配列を用いており、ここで「N」は任意のヌクレオチドであってよい。

【0224】

一部の実施形態では、細胞に投与されるgRNAの数は、少なくとも1つのgRNA、少なくとも2つの異なるgRNA、少なくとも3つの異なるgRNA、少なくとも4つの異なるgRNA、少なくとも5つの異なるgRNA、少なくとも6つの異なるgRNA、少なくとも7つの異なるgRNA、少なくとも8つの異なるgRNA、少なくとも9つの異なるgRNA、少なくとも10の異なるgRNA、少なくとも11の異なるgRNA、少なくとも12の異なるgRNA、少なくとも13の異なるgRNA、少なくとも14の異なるgRNA、少なくとも15の異なるgRNA、少なくとも16の異なるgRNA、少なくとも17の異なるgRNA、少なくとも18の異なるgRNA、少なくとも19の異なるgRNA、少なくとも20の異なるgRNA、少なくとも25の異なるgRNA、少なくとも30の異なるgRNA、少なくとも35の異なるgRNA、少なくとも40の異なるgRNA、少なくとも45の異なるgRNA、または少なくとも50の異なるgRNAであってよい。

【0225】

一部の実施形態では、細胞に投与されるgRNAの数は、少なくとも1つのgRNA～少なくとも50の異なるgRNA、少なくとも1つのgRNA～少なくとも45の異なるgRNA、少なくとも1つのgRNA～少なくとも40の異なるgRNA、少なくとも1つのgRNA～少なくとも35の異なるgRNA、少なくとも1つのgRNA～少なくとも30の異なるgRNA、少なくとも1つのgRNA～少なくとも25の異なるgRNA、少なくとも1つのgRNA～少なくとも20の異なるgRNA、少なくとも1つのgRNA～少なくとも16の異なるgRNA、少なくとも1つのgRNA～少なくとも12の異なるgRNA、少なくとも1つのgRNA～少なくとも8つの異なるgRNA、少なくとも1つのgRNA～少なくとも4つの異なるgRNA、少なくとも4つのgRNA～少

なくとも50の異なるgRNA、少なくとも4つの異なるgRNA～少なくとも45の異なるgRNA、少なくとも4つの異なるgRNA～少なくとも40の異なるgRNA、少なくとも4つの異なるgRNA～少なくとも35の異なるgRNA、少なくとも4つの異なるgRNA～少なくとも30の異なるgRNA、少なくとも4つの異なるgRNA～少なくとも25の異なるgRNA、少なくとも4つの異なるgRNA～少なくとも20の異なるgRNA、少なくとも4つの異なるgRNA～少なくとも16の異なるgRNA、少なくとも4つの異なるgRNA～少なくとも12の異なるgRNA、少なくとも4つの異なるgRNA～少なくとも8つの異なるgRNA、少なくとも8つの異なるgRNA～少なくとも50の異なるgRNA、少なくとも8つの異なるgRNA～少なくとも45の異なるgRNA、少なくとも8つの異なるgRNA～少なくとも40の異なるgRNA、少なくとも8つの異なるgRNA～少なくとも35の異なるgRNA、少なくとも8つの異なるgRNA～少なくとも30の異なるgRNA、少なくとも8つの異なるgRNA～少なくとも25の異なるgRNA、8つの異なるgRNA～少なくとも20の異なるgRNA、少なくとも8つの異なるgRNA～少なくとも16の異なるgRNA、または8つの異なるgRNA～少なくとも12の異なるgRNAの間でよい。

10

20

30

40

50

【0226】

一部の実施形態では、gRNAは、標的遺伝子の転写を増大または低減させるように選択される。一部の実施形態では、gRNAは、標的遺伝子（例えばVEGF）の転写開始部位（TSS）の上流、例えば標的遺伝子の転写開始部位の0～1000bp上流の領域を標的とする。一部の実施形態では、gRNAは、標的遺伝子の転写開始部位の0～50bp、0～100bp、0～150bp、0～200bp、0～250bp、0～300bp、0～350bp、0～400bp、0～450bp、0～500bp、0～550bp、0～600bp、0～650bp、0～700bp、0～750bp、0～800bp、0～850bp、0～900bp、0～950bp、または0～1000bp上流の領域を標的とする。一部の実施形態では、gRNAは、標的遺伝子の転写開始部位の約100bp、約200bp、約300bp、約400bp、約500bp、約600bp、約700bp、約800bp、約900bp、約1000bp、約1100bp、約1200bp、約1300bp、約1400bp、または約1500bp以内上流の領域を標的とする。一実施形態では、gRNAは、標的遺伝子のTSSの0～300bp上流の領域を標的とする。

【0227】

一部の実施形態では、gRNAは、標的遺伝子の転写開始部位の下流、例えば標的遺伝子の転写開始部位の0～1000bp下流の領域を標的とする。一部の実施形態では、gRNAは、標的遺伝子の転写開始部位の0～50bp、0～100bp、0～150bp、0～200bp、0～250bp、0～300bp、0～350bp、0～400bp、0～450bp、0～500bp、0～550bp、0～600bp、0～650bp、0～700bp、0～750bp、0～800bp、0～850bp、0～900bp、0～950bp、または0～1000bp下流の領域を標的とする。一部の実施形態では、gRNAは、標的遺伝子の転写開始部位の約100bp、約200bp、約300bp、約400bp、約500bp、約600bp、約700bp、約800bp、約900bp、約1000bp、約1100bp、約1200bp、約1300bp、約1400bp、または約1500bp以内下流の領域を標的とする。一実施形態では、gRNAは標的遺伝子のTSSの0～300bp下流の領域を標的とする。

【0228】

VEGF

本明細書で用いる場合、用語「VEGF」は、血管内皮増殖因子を指す。VEGF経路は血管の発達の多数の態様に関与しており、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-E、およびそれらの個別の受容体を含む血管新生アクチベーターとして作用するタンパク質のファミリーを含む。VEGF-AはVEGFまたは血管透過性因子（VPF）とも称され、抗血管新生療法のターゲットである。VEGF-Aは、単一のVEG

F 遺伝子、即ち VEGFm、VEGF45、VEGFies、VEGF189、および VEGF206 の mRNA の選択的スプライシングに起因する 5 つのアイソフォームに存在する。

【0229】

ヒト VEGFA は 6 p 21.1 の細胞遺伝学的位置を有し、ゲノム座標は第 6 染色体のフォワード鎖の 43,770,209～43,786,487 位に存在する。ヒト VEGF の配列の例は、NCBI 遺伝子 ID 7422 および Ensembl Gene ID ENSG00000112715 で見出すことができる。VEGFA は血管内皮細胞の増殖および遊走を誘導し、生理学および病理学的の両方の血管新生に重要である。マウスにおけるこの遺伝子の破壊は、胚血管形成の異常をもたらした。

10

【0230】

一部の実施形態では、本方法は、本明細書で開示する CRISPR/Cas9 システムによるトランスフェクションの後で、VEGFA の発現レベルの有意な減少を示した。一部の実施形態では、対照（例えば VEGFA を標的としない sgRNA によるトランスフェクション）と比較して、VEGF 発現レベルの低下は約 80% 以上、約 85% 以上、約 90% 以上、または約 95% 以上である。

【0231】

一部の実施形態では、VEGFA 発現レベルの低下は、本明細書で開示する CRISPR/Cas9 システムによるトランスフェクションの後、少なくとも約 96 時間、少なくとも約 1 週、少なくとも約 2 週、少なくとも約 3 週、少なくとも約 4 週、少なくとも約 6 週、少なくとも約 2 か月、またはそれ以上長く保持される。一部の実施形態では、VEGF レベルの低下は、約 1 週～約 4 週、約 1 週～約 3 週、約 1 週～約 2 週、約 2 週～約 4 週、約 2 週～約 3 週、または約 3 週～約 4 週、保持される。

20

【0232】

一部の実施形態では、VEGFA の発現レベルの低下は、ベースラインまたは VEGFA の所定のレベルの比較に基づいている。一部の実施形態では、VEGFA のレベルの低下は、対象からの第 1 の試料からの VEGF の第 1 のレベルと対象からの第 2 の試料からの VEGF の第 2 のレベルとの比較に基づいてよい。

【0233】

本開示は、マウスまたはウサギの VEGFA 標的遺伝子を標的とする sgRNA 配列を提供する。例示的な sgRNA は、表 3a および表 3b に列挙したものを含むが、それだけに限定されない。本開示は、ヒト VEGFA を標的とする sgRNA 配列（これはサル VEGFA における相同領域も標的とする）も提供する。例示的な sgRNA は、表 4 に列挙したものを含むが、それだけに限定されない。

30

【0234】

【表 3】

表 3a. 例示的なマウス VEGFA sgRNA 配列

説明	配列	配列番号
マウス VEGFA sgRNA1	TCAGCTCGCCCCCAGTGCCG	29
マウス VEGFA sgRNA2	GCAGCGAGGCCGCGGCACTG	30
マウス VEGFA sgRNA3	GGGGCAGCCGAGCTGCAGCG	31
マウス VEGFA sgRNA4	ACTGGGGGCGAGCTGAGCGG	32
マウス VEGFA sgRNA5	CAGCGAGGCCGCGGCACTGG	33
マウス VEGFA sgRNA6	GCCGAGCTGCAGCGAGGCCG	34
マウス VEGFA sgRNA7	GCCGCGGCCTCGCTGCAGCT	35

40

【0235】

50

【表 4】

表3b. 例示的なウサギVEGFA sgRNA 配列

説明	配列	配列番号
ウサギ VEGFA sgRNA1	TGGAACCCTGGAGTGACCCC	60
ウサギ VEGFA sgRNA2	GCCCAGAGCTGTTGGAACCC	61
ウサギ VEGFA sgRNA3	GGAGGCCGGGGGTCACTCCA	62
ウサギ VEGFA sgRNA4	GGAGCCCGTCAGGGACGGGT	63
ウサギ VEGFA sgRNA5	TAGGGGGCGAGGGTGCTGCG	64
ウサギ VEGFA sgRNA6	CTCCAGGGTTCCAACAGCTC	65
ウサギ VEGFA sgRNA7	TGTGTGAGCGCGTGTGTAGG	66
ウサギ VEGFA sgRNA8	AGGGGGCGAGGGTGCTGCGT	67
ウサギ VEGFA sgRNA9	GGGAAGGGGCCAGAGCTGT	68
ウサギ VEGFA sgRNA10	GCGGGGAGCCCGTCAGGGAC	69
ウサギ VEGFA sgRNA11	GTCCCTGACGGGCTCCCCGC	70
ウサギ VEGFA sgRNA12	AGGAGGCCGGGGGTCACTCC	71
ウサギ VEGFA sgRNA13	GCTGCGTGGGGAGGAGGCCGG	72
ウサギ VEGFA sgRNA14	TCCAGGGTTCCAACAGCTCT	73
ウサギ VEGFA sgRNA15	GACGGGCGGGGAGCCCGTCA	74
ウサギ VEGFA sgRNA16	GTGAGGAGCGCAGAGGCTTG	75
ウサギ VEGFA sgRNA17	GGGAGCGGTGAGGAGCGCAG	76
ウサギ VEGFA sgRNA18	TCAGTCGCCTGGGAGCGGTG	77
ウサギ VEGFA sgRNA19	GGGGCAGCCGGGCTGCGAGG	78
ウサギ VEGFA sgRNA20	GGTGAGGAGCGCAGAGGCTT	79
ウサギ VEGFA sgRNA21	CGCAGGGGGAGCGGAGCCGG	80
ウサギ VEGFA sgRNA22	GCGAGGAGGCCGCGGCGCAG	81
ウサギ VEGFA sgRNA23	CGAGGAGGCCGCGGCGCAGG	82
ウサギ VEGFA sgRNA24	GCTCCGCTCCCCCTGCGCCG	83
ウサギ VEGFA sgRNA25	CTGCGCTCCTCACCGCTCCC	84

【 0 2 3 6 】

10

20

30

40

50

【表 5】

表4. 例示的なヒト VEGFA sgRNA 配列

説明	配列	配列番号
ヒト VEGFA sgRNA1	AGCACCAGCGCTCTGTCGGG	36
ヒト VEGFA sgRNA2	GGGGCAGCCGGGTAGCTCGG	37
ヒト VEGFA sgRNA3	GGCTAGCACCAGCGCTCTGT	38
ヒト VEGFA sgRNA4	GCTAGCACCAGCGCTCTGTC	39
ヒト VEGFA sgRNA5	GCCGGGTAGCTCGGAGGTCG	40
ヒト VEGFA sgRNA6	GCTCGGAGGTCGTGGCGCTG	41
ヒト VEGFA sgRNA7	GCGCTCTGTCGGGAGGCGCA	42
ヒト VEGFA sgRNA8	AGCTCGGAGGTCGTGGCGCT	43
ヒト VEGFA sgRNA9	CGCTCTGTCGGGAGGCGCAG	44
ヒト VEGFA sgRNA10	CTCGGAGGTCGTGGCGCTGG	45
ヒト VEGFA sgRNA11	TAGCTCGGAGGTCGTGGCGC	46
ヒト VEGFA sgRNA12	GCCACGACCTCCGAGCTACC	47
ヒト VEGFA sgRNA13	CGGTAGGTGGACCGGTCAG	48
ヒト VEGFA sgRNA14	GGGGCGGATGGGTAATTTTC	49
ヒト VEGFA sgRNA15	GGGAAGCTCGACCCCCACCA	50
ヒト VEGFA sgRNA16	GTCGAGCTTCCCCTTCATTG	51
ヒト VEGFA sgRNA17	GAGCTTCCCCTTCATTGCGG	52
ヒト VEGFA sgRNA18	GCCCGGGCCCGAGCCGCGTG	53
ヒト VEGFA sgRNA19	GCTGGTAGCGGGGAGGATCG	54
ヒト VEGFA sgRNA20	GGTAGCGGGGAGGATCGCGG	55
ヒト VEGFA sgRNA21	GGGGAGGATCGCGGAGGCTT	56
ヒト VEGFA sgRNA22	GGGAGGATCGCGGAGGCTTG	57
ヒト VEGFA sgRNA23	GGACCGGTCAGCGGACTCAC	58

10

20

30

【0237】

一部の実施形態では、gRNAは、標的遺伝子のプロモーター領域を標的とする。一実施形態では、gRNAは、標的遺伝子のエンハンサー領域を標的とする。gRNAは、標的結合領域、Cas9結合領域、および転写終止領域に分割することができる。標的結合領域は、標的遺伝子中の標的領域とハイブリダイズする。そのような標的結合領域を設計する方法は当技術で既知である。例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれるDoenchら、Nat Biotechnol. (2014) 32:1262~7ページ；およびDoenchら、Nat Biotechnol. (2016) 34:184~91ページを参照されたい。設計ツールは、例えばFeng Zhang lab's target Finder、Michael Boutros lab's Target Finder (E-CRISP)、RGEN Tools (Cas-OF Finder)、CasFinder、およびCRISPR Optimal Target Finderで入手可能である。ある特定の実施形態では、標的結合領域は、長さ約15~50ヌクレオチド（長さ約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または約50ヌクレオチド）の間であってよい。ある特定の実施形態では、標的結合領域は、長さ約19~約21ヌクレオチドの間であってよい。一実施形態では、標的結合領域は、長さ1

40

50

5、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチドである。

【0238】

一実施形態では、標的結合領域は、標的遺伝子内の標的領域と相補的、例えば完全に相補的である。一実施形態では、標的結合領域は、標的遺伝子内の標的領域と実質的に相補的である。一実施形態では、標的結合領域は、標的遺伝子内の標的領域と相補的でない1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10以下のヌクレオチドを含む。

【0239】

一実施形態では、標的結合領域は、例えば非天然ヌクレオチドまたは改変されたヌクレオチドを標的結合領域に組み込むことによって、RNA不安定化配列エレメントを除去または改変することによって、RNA安定化配列エレメントを付加することによって、またはCas9/gRNA複合体の安定性を増大することによって、安定性を改善し、または半減期を延長させるように操作される。一実施形態では、標的結合領域は、その転写を増強するように操作される。一実施形態では、標的結合領域は、二次構造形成を低減するように操作される。一実施形態では、gRNAのCas9結合領域は、gRNAの転写を増強するように改変される。一実施形態では、gRNAのCas9結合領域は、Cas9/gRNA複合体の安定性またはアセンブリーを改善するように改変される。

【0240】

デリバリーシステム

本開示は、本明細書のシステムおよび組成物の成分を細胞、組織、器官、または生命体に導入するためのデリバリーシステムも提供する。デリバリーシステムは、1つまたは複数のデリバリー媒体および／またはカーゴを含んでよい。

【0241】

カーゴ

デリバリーシステムは、1つまたは複数のカーゴを含んでよい。カーゴは、本明細書のシステムおよび組成物の1つまたは複数の成分を含んでよい。カーゴは、以下の、i) 1つまたは複数のCasタンパク質をコードするプラスミド、ii) 1つまたは複数のガイドRNAをコードするプラスミド、iii) 1つまたは複数のCasタンパク質のmRNA、iv) 1つまたは複数のガイドRNA、v) 1つまたは複数のCasタンパク質、vi) それらの任意の組合せの1つまたは複数を含んでよい。一部の例では、カーゴは、1つまたは複数のCasタンパク質および1つまたは複数の（例えば複数の）ガイドRNAをコードするプラスミドを含んでよい。一部の実施形態では、カーゴは、1つまたは複数のCasタンパク質および1つまたは複数のガイドRNAをコードするmRNAを含んでよい。

【0242】

一部の例では、カーゴは、1つまたは複数のCasタンパク質および1つまたは複数のガイドRNAを、例えばリボヌクレオプロテイン複合体(RNP)の形態で含んでよい。リボヌクレオプロテイン複合体は、本明細書の方法およびシステムによって送達してよい。一部の場合には、リボヌクレオプロテインは、ポリペプチド系のシャトル剤によって送達してよい。一例では、リボヌクレオプロテインは、例えばWO2016161516に記載されているように、細胞浸透ドメイン(CPD)に作動可能に連結されたエンドソームリーケージドメイン(ELD)を含む合成ペプチドを用いてヒスチジンリッチドメインおよびCPDに送達してよい。

【0243】

物理的デリバリー

一部の実施形態では、カーゴは、物理的デリバリー法によって細胞に導入してよい。物理的方法の例には、マイクロインジェクション、電気穿孔法、および水力学的デリバリーが含まれる。

【0244】

マイクロインジェクション

細胞へのカーゴの直接のマイクロインジェクションは、例えば90%超または約100%の高い効率を達成することができる。一部の実施形態では、マイクロインジェクションは、顕微鏡および細胞膜に穿刺して細胞内の目標部位にカーゴを直接送達するための針（例えば直径0.5～5.0 μm）を用いて実施してよい。マイクロインジェクションは、インビトロおよびエキスピボ（ex vivo）のデリバリーのために用いてよい。

【0245】

Casタンパク質および／もしくはガイドRNAをコードする配列、mRNA、および／またはガイドRNAを含むプラスミドをマイクロインジェクションしてよい。一部の場合には、マイクロインジェクションは、i) DNAを細胞核に直接送達するため、および／またはii) mRNA（例えばインビトロで転写された）を細胞核または細胞質に送達するために用いてよい。ある特定の例では、マイクロインジェクションは、sgRNAを核に直接送達し、CasをコードするmRNAを細胞質に送達して、例えば翻訳および核へのCasのシャトリングを容易にするために用いてよい。

【0246】

マイクロインジェクションは、遺伝的子改変された動物を生成するために用いてよい。例えば、遺伝子編集カーゴを接合体に注射して、効率的な生殖細胞系列改変を可能にしてよい。そのようなアプローチによって、所望の改変を有する正常な胚および満期の子マウスを得ることができる。マイクロインジェクションは、例えばCRISPRaおよびCRISPRiを用いて、細胞のゲノム内の特定の遺伝子を過渡的に上方制御または下方制御するために用いることもできる。

【0247】

電気穿孔法

一部の実施形態では、カーゴおよび／またはデリバリー媒体は、電気穿孔法によって送達してよい。電気穿孔法は、高圧パルス電流を用いて、緩衝液中に懸濁された細胞の細胞膜内にナノメートルサイズの細孔を過渡的に開け、数十ナノメートルの水力学的直径を有する成分を細胞内に流入させることを可能にする。一部の場合には、電気穿孔法は種々の細胞型で用いられ、カーゴを効率的に細胞内に移入する。電気穿孔法はインビトロおよびエキスピボのデリバリーで用いてよい。

【0248】

電気穿孔法は、特定の電圧および薬剤を適用することによって、例えばヌクレオフェクションによって、哺乳動物細胞の核に（to）カーゴを送達するために用いてもよい。そのようなアプローチには、Wu Y, ら（2015）. *Cell Res* 25:67～79ページ；Ye L, ら、（2014）. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:9591～6ページ；Choi PS, Meyerson M.（2014）. *Nat Commun* 5:3728ページ；Wang J, Quake SR.（2014）. *Proc Natl Acad Sci* 111:13157～62ページに記載されたものが含まれる。電気穿孔法は、例えばZuckermann M, ら（2015）. *Nat Commun* 6:7391ページに記載された方法によって、カーゴをインビボで送達するために用いてもよい。

【0249】

水力学的デリバリー

水力学的デリバリーも、カーゴを送達するため、例えばインビボのデリバリーのために用いてよい。一部の例では、水力学的デリバリーは、対象（例えば動物またはヒト）の血流に、例えばマウスについては尾静脈を通じて、遺伝子編集カーゴを含む大量（例えば体重の8～10%）の溶液を迅速に押し込むことによって実施してよい。血液は非圧縮性であるので、一度に注入された大量の液体は水力学的圧力の増大をもたらし、これが内皮細胞および実質細胞への透過性を一時的に増強し、通常は細胞膜を横断できないカーゴの細胞内への通過を可能にする。このアプローチは、裸のDNAプラスミドおよびタンパク質を送達するために用いてよい。送達されたカーゴは、肝臓、腎臓、肺、筋肉、および／または心臓で富化される。

【0250】

トランスフェクション

カーゴ、例えば核酸は、核酸を細胞内に導入するためのトランスフェクション法によって細胞に導入してよい。トランスフェクション法の例には、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、カチオン性トランスフェクション、リポソームトランスフェクション、デンドリマートランスフェクション、熱ショックトランスフェクション、マグネトフェクション、リポフェクション、インパレフェクション、光学的トランスフェクション、独自の薬剤によって強化された核酸の取り込みが含まれる。

【0251】

デリバリー媒体

デリバリーシステムは、1つまたは複数のデリバリー媒体を含んでよい。デリバリー媒体は、カーゴを細胞、組織、器官、または生命体（例えば動物または植物）に送達し得る。カーゴは、包装され、運搬され、またはその他の方法でデリバリー媒体に付随してよい。デリバリー媒体は、送達すべきカーゴの型に基づいて選択され、ならびに／またはデリバリーはインビトロおよび／もしくはインビボである。デリバリー媒体の例には、ベクター、ウイルス、非ウイルス性媒体、および本明細書に記載したその他のデリバリー剤が含まれる。

【0252】

本開示によるデリバリー媒体は100ミクロン（ μm ）未満の最大寸法（例えば直径）を有してよい。一部の実施形態では、デリバリー媒体は10 μm 未満の最大寸法を有する。一部の実施形態では、デリバリー媒体は2000ナノメートル（nm）未満の最大寸法を有してよい。一部の実施形態では、デリバリー媒体は1000ナノメートル（nm）未満の最大寸法を有してよい。一部の実施形態では、デリバリー媒体は900nm未満、800nm未満、700nm未満、600nm未満、500nm未満、400nm未満、300nm未満、200nm未満、150nm未満、または100nm未満、50nm未満の最大寸法（例えば直径）を有してよい。一部の実施形態では、デリバリー媒体は、25nm～200nmの範囲の最大寸法を有してよい。

【0253】

一部の実施形態では、デリバリー媒体は粒子であるか、粒子を含んでよい。例えば、デリバリー媒体は、ナノ粒子〔例えば1000nm以下の最大寸法（例えば直径）を有する粒子〕であるか、ナノ粒子を含んでよい。粒子は様々な形態、例えば固体粒子（例えば銀、金、鉄、チタン等の金属、非金属、液体系固体、ポリマー）、粒子の懸濁液、またはそれらの組合せとして供給してよい。金属、誘電体、および半導体の粒子、ならびにハイブリッド構造（例えばコアシェル粒子）を調製してよい。

【0254】

ベクター

システム、組成物、および／またはデリバリーシステムは、1つまたは複数のベクターを含んでよい。本開示はベクターシステムも含む。ベクターシステムは1つまたは複数のベクターを含んでよい。一部の実施形態では、ベクターは、それが連結された別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターは、一本鎖、二本鎖、または部分的二本鎖の核酸分子、1つまたは複数の遊離末端を含むか遊離末端を含まない（例えば環状の）核酸分子、DNA、RNA、またはその両方を含む核酸分子、および当技術で既知の他の種々のポリヌクレオチドを含む。ベクターは、プラスミド、例えば標準的な分子クローニング手法によってその中にさらなるDNAセグメントを挿入することができる環状二本鎖DNAループであってよい。ある種のベクターは、それが導入された宿主細胞における自己複製が可能であってよい（例えば、細菌の複製の起点を有する細菌性ベクターおよびエピソーマル哺乳動物ベクター）。一部のベクター（例えば非エピソーマル哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入に際して宿主細胞のゲノムの中に一体化され、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。ある特定の例では、ベクターは、例えばそれが作動可能に連結された遺伝子の発現を指令することができる発現ベクターであってよい。一部の場合

10

20

30

40

50

には、発現ベクターは、真核細胞における発現のためであってよい。組換えDNA手法において有用な一般的な発現ベクターはプラスミドの形態であることが多い。

【0255】

ベクターの例には、pGEX、pMAL、pRIT5、大腸菌 (*E. coli*) 発現ベクター (例えば pTrc、pET λ ld)、酵母発現ベクター (例えば pYepSec1、pMFA、pJRY88、pYES2、および p λ Z)、バキュロウイルスベクター (例えば SF9 細胞等の昆虫細胞内での発現のため) (例えば pAc シリーズおよび pVL シリーズ)、哺乳動物発現ベクター (例えば pCDM8 および pMT2PC) が含まれる。

【0256】

ベクターは、i) Cas コーディング配列、および／または ii) 単一の、もしくは少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも14、少なくとも16、少なくとも32、少なくとも48、少なくとも50のガイドRNA コーディング配列を含んでよい。単一のベクターにおいて、それぞれのRNA コーディング配列についてプロモーターが存在してよい。その代わりにまたはさらに、単一のベクターにおいて、多数のRNA コーディング配列を制御する (例えば転写および／または発現を駆動する) プロモーターが存在してもよい。

【0257】

制御エレメント

ベクターは、1つまたは複数の制御エレメントを含んでよい。制御エレメントは、Cas タンパク質、アクセサリタンパク質、ガイドRNA (例えばシングルガイドRNA、crRNA、および／または tracrRNA)、またはそれらの組合せのコーディング配列に作動可能に連結され得る。用語「作動可能に連結される」は、目的のヌクレオチド配列が、そのヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で制御エレメントに連結されていること (例えばインビトロの転写／翻訳システムで、またはベクターが宿主細胞に導入される場合には宿主細胞内で) を意味することを意図している。ある特定の例では、ベクターは、Cas タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された第1の制御エレメント、およびガイドRNAをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された第2の制御エレメントを含んでよい。

【0258】

制御エレメントの例には、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位 (IRES)、およびその他の発現制御エレメント (例えばポリアデニル化シグナルおよびポリU配列等の転写終止シグナル) が含まれる。そのような制御エレメントは、例えば Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif (1990) に記載されている。制御エレメントは、多くの型の宿主細胞内でヌクレオチド配列の構成的発現を指令する制御エレメント、およびある特定の宿主細胞内でのみヌクレオチド配列の発現を指令する制御エレメント (例えば組織特異的制御配列) を含む。組織特異的プロモーターは、主として所望の目的の組織、例えば筋肉、神経、骨、皮膚、血液、特定の器官 (例えば肝臓、脾臓)、または特定の細胞型 (例えばリンパ球) における発現を指令し得る。制御エレメントは、時間依存的な様式で、例えば細胞サイクル依存的または発達段階依存的な様式で、組織または細胞型に特異的であっても特異的でなくてもよい発現を指令し得る。

【0259】

プロモーターの例には、1つまたは複数の pol III プロモーター (例えば1、2、3、4、5、またはそれ以上の pol III プロモーター)、1つまたは複数の pol II プロモーター (例えば1、2、3、4、5、またはそれ以上の pol II プロモーター)、1つまたは複数の pol I プロモーター (例えば1、2、3、4、5、またはそれ以上の pol I プロモーター)、またはそれらの組合せが含まれる。pol

10

20

30

40

50

IIIプロモーターの例には、それだけに限らないが、U6およびHIプロモーターが含まれる。pol IIIプロモーターの例には、それだけに限らないが、レトロウイルス肉腫ウイルスプロモーター（RSV）LTRプロモーター（RSVエンハンサーを含んでもよい）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（CMVエンハンサーを含んでもよい）、SV40プロモーター、ジヒドロフォレートリダクターゼプロモーター、アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター、およびEF1aプロモーターが含まれる。

【0260】

ウイルスベクター

カーゴはウイルスによって送達してよい。一部の実施形態では、ウイルスベクターが用いられる。ウイルスベクターは、ウイルス（例えばレトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）中へのパッケージングのためのウイルス由来のDNAまたはRNA配列を含んでよい。ウイルスベクターは、宿主細胞へのトランスフェクションのためにウイルスによって運搬されるポリヌクレオチドも含む。ウイルスおよびウイルスベクターは、インビトロ、エクスピボ、および／またはインビボのデリバリーのために用いてよい。

【0261】

アデノ随伴ウイルス（AAV）

本明細書のシステムおよび組成物は、アデノ随伴ウイルス（AAV）によって送達してよい。AAVベクターをそのようなデリバリーのために用いてよい。デPENDウイルス属およびパルボビリダエファミリーのAAVは一本鎖DNAウイルスである。一部の実施形態では、AAVによって送達されたゲノム材料は、例えば外因性DNAとして細胞内に無期限に存在することができ、またはいくらかの改変を加えて宿主DNAに直接一体化することができるので、AAVは与えられたDNAの持続的な源を提供し得る。一部の実施形態では、AAVはヒトにおいて疾患を惹起せず、または疾患に関連しない。ウイルスそれ自体は、先天的もしくは適応的な免疫応答または付随する毒性を殆どまたは全く誘発せずに、細胞に効率的に感染することができる。

【0262】

本明細書で用いることができるAAVの例には、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-8、およびAAV-9が含まれる。AAVの型は標的とされる細胞に関して選択してよく、例えば脳または神経細胞を標的とするためにAAVの血清型1、2、5、またはハイブリッドカプシドAAV1、AAV2、AAV5、またはそれらの任意の組合せを選択することができ、心臓組織を標的とするためにはAAV4を選択することができる。AAV8は肝臓へのデリバリーのために有用である。AAV-2系ベクターは、もともとCFTRのCF気道へのデリバリーのために提案された。AAV-1、AAV-5、AAV-6、およびAAV-9等の他の血清型は、肺上皮組織の種々のモデルにおいて改善された遺伝子導入効率を呈する。AAVによって標的とされる細胞型の例は、全体が参照により本明細書に組み込まれるGrimm, D.ら、J. Virol. 82: 5887~5911 ページ (2008) およびWO 2021/183807 A1に記載されている。

【0263】

CRISPR-Cas AAV粒子は、HEK 293T細胞内で創成してよい。特定の向性を有する粒子が創成されれば、これらを用いて、天然のウイルス粒子と同じ方法で標的細胞株に感染させられる。これにより、感染した細胞型におけるCRISPR-Cas成分の持続的な存在が可能になり、このデリバリーのバージョンが長期発現の望ましい場合に特に適するようになる。用いることができるAAVの用量および処方の例には、米国特許第8,454,972号および第8,404,658号に記載されたものが含まれる。

【0264】

AAVを用いる本明細書のシステムおよび組成物によるデリバリーのために種々の戦略

が用いられる。一部の例では、CasおよびgRNAのコーディング配列が1つのDNAプラスミドベクターに直接パッケージングされ、1つのAAV粒子を介して送達される。一部の例では、Casを発現するように既に操作された細胞にgRNAを送達するためにAAVを用いてよい。一部の例では、CasおよびgRNAのコーディング配列が分離された2つのAAV粒子の中で作製され、これが標的細胞の共トランスフェクションのために用いられる。一部の例では、マーカー、タグ、およびその他の配列を、Casおよび／またはgRNAのコーディング配列として同じAAV粒子の中にパッケージングしてよい。

【0265】

レンチウイルス

本明細書のシステムおよび組成物は、レンチウイルスによって送達してよい。レンチウイルスベクターをそのようなデリバリーのために用いてよい。レンチウイルスは、有糸分裂細胞と有糸分裂後の細胞の両方に感染してそれらの遺伝子を発現する能力を有する複雑なレトロウイルスである。

【0266】

レンチウイルスの例には、他のウイルスのエンベロープ糖タンパク質を用いて広範囲の細胞型を標的とし得るヒト免疫不全ウイルス(HIV)、眼科の治療に用いられるウマ感染性貧血ウイルス(EIAV)系の最小非霊長類レンチウイルスベクターが含まれる。ある特定の実施形態では、HIV tat/revによって共有される共通のエクソンを標的とするsiRNA、核小体局在TARデコイ、および抗CCR5特異的ハンマーヘッドリボザイムを有する自己不活化レンチウイルスベクター[例えばDigustoら、(2010) Sci Transl Med 2:36ra43を参照]を、本明細書の核酸標的システムに用いて、および／または適合させてよい。

【0267】

レンチウイルスは、水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質等の他のウイルスタンパク質と疑似型化してよい。これを行なう場合、レンチウイルスの向細胞性を所望によって広くまたは狭くなるように変化させることができる。一部の場合には、安定性を改善するために、第2世代および第3世代のレンチウイルスシステムによって必須遺伝子を3つのプラスミドに分割してよく、これにより、細胞内での生きたウイルス粒子の偶発的な再構成の可能性が低減され得る。

【0268】

一部の例では、一体化能力を利用し、例えば遺伝子およびシグナル伝達経路のスクリーニングおよび／または研究のために、レンチウイルスを用いて種々の遺伝子改変を含む細胞のライブラリーを創成してよい。

【0269】

アデノウイルス

本明細書のシステムおよび組成物は、アデノウイルスによって送達してよい。アデノウイルスベクターをそのようなデリバリーのために用いてよい。アデノウイルスは、二本鎖DNAゲノムを含む20面体のヌクレオカプシドを有する非エンベロープウイルスを含む。アデノウイルスは、分裂性および非分裂性の細胞に感染し得る。一部の実施形態では、アデノウイルスは宿主細胞のゲノムに一体化されず、遺伝子編集の応用においてCRISPR-Casシステムのオフターゲット効果を制限するために用いてよい。

【0270】

非ウイルス媒体

デリバリー媒体は非ウイルス媒体を含んでよい。一般に、核酸および／またはタンパク質を送達することができる方法および媒体を、本明細書のシステム組成物を送達するために用いてよい。非ウイルス媒体の例には、脂質ナノ粒子、細胞浸透性ペプチド(CPP)、DNAナノクルー、金ナノ粒子、ストレプトリジン0、多機能性エンベロープ型ナノデバイス(MEND)、脂質コートメソポーラスシリカ粒子、およびその他の無機ナノ粒子が含まれる。

10

20

30

40

50

【0271】

脂質粒子

デリバリー媒体は、脂質粒子、例えば脂質ナノ粒子（LNP）およびリポソームを含んでよい。

【0272】

脂質ナノ粒子（LNP）

LNPは、カチオン性脂質粒子（例えばリポソーム）の中に核酸をカプセル化し、比較的容易に細胞へ送達され得る。一部の例では、脂質ナノ粒子はウイルス成分を何ら含まず、それにより、安全性および免疫原性の懸念を最小化することを助ける。脂質粒子は、インビトロ、エクスピボ、およびインビボのデリバリーのために用いてよい。脂質粒子は、種々のスケールの細胞集団に用いてよい。

10

【0273】

LNPは、当技術で既知の種々の方法、例えば有機相と水相を混合することによって、容易に調製することができる。2つの相の混合は、微小流体デバイスおよび衝突流反応器によって達成することができる。有機相と水相をより適切に混合することによって、LNPのより良い埋め込み速度と粒径分布が得られる。好ましくは、LNPの粒径は、有機相と水相の混合速度を変更することによって調節することができる。混合速度を速くすれば、より小さな粒径のLNPが調製される。埋め込み効率は、LNPシステムのN/P比を制御することによって最適化できる。一部の好ましい実施形態では、N/P比は1:1~9:1である。

20

【0274】

一部の例では、LNPは、DNA分子（例えばCasおよび／またはgRNAのコーディング配列を含むDNA分子）および／またはRNA分子（例えばCasのmRNA、gRNA）を送達するために用いてよい。ある特定の場合には、LNPは、Cas/gRNAのRNP複合体を送達するために用いてよい。

【0275】

一部の実施形態では、LNPは、mRNAおよびgRNA [例えばDNMT3A-DNMT3L (3A-3L)-dCas9-KRABを含むmRNA融合分子およびVEGFを標的とする少なくとも1つのsgRNA] を送達するために用いられる。

【0276】

LNPの成分は、カチオン性脂質、即ち1,2-ジリネオイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン（DLinDAP）、1,2-ジリノレイルオキシ-3-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLinDMA）、1,2-ジリノレイルオキシケトン-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン（DLinK-DMA）、1,2-ジリノレイル-4-（2-ジメチルアミノエチル）-を含んでよい。一部の実施形態では、LNPはイオン化可能な脂質を含んでよい。一部の実施形態では、イオン化可能な脂質には、それだけに限らないが、pH応答性のイオン化可能な脂質、熱応答性のイオン化可能な脂質、および光応答性のイオンが含まれる。一部の実施形態では、イオン化可能な脂質には、それだけに限らないが、pH、温度、または光等のある種の条件の下でイオン化されるカチオン性脂質およびアニオン性脂質が含まれる。一部の実施形態では、LNPのイオン化可能な脂質のモル比は、20%~70%（約20%~70%、約20%~65%、約20%~60%、約20%~55%、約20%~50%、約20%~45%、約20%~40%、約20%~35%、約20%~30%、約20%~25%、約30%~70%、約30%~65%、約30%~60%、約30%~55%、約30%~50%、約30%~45%、約30%~40%、約30%~35%、約40%~70%、約40%~65%、約40%~60%、約40%~55%、約40%~50%、約40%~45%、約50%~70%、約50%~65%、約50%~60%、約50%~55%、約60%~70%、または約60%~65%）である。

30

40

【0277】

一部の実施形態では、LNPは、PEG化された脂質を含んでよい。一部の実施形態で

50

は、LNP中のPEG化脂質のモル比は、0%～約30%（例えば約0%～約30%、約0%～約25%、約0%～約20%、約0%～約15%、約0%～約10%、約10%～約30%、約10%～約25%、約10%～約20%、約10%～約15%、約20%～約30%、または約20%～約25%）である。

【0278】

一部の実施形態では、LNPは支持脂質を含んでよい。一部の実施形態では、LNP中の支持脂質のモル比は、30%～約50%（例えば約30%～約50%、約30%～約45%、約30%～約40%、約30%～約35%、約40%～約50%、または約40%～約45%）である。

【0279】

一部の実施形態では、LNPはコレステロールを含んでよい。一部の実施形態では、LNP中のコレステロールのモル比は、10%～約50%（例えば約10%～約50%、約10%～約45%、約10%～約40%、約10%～約35%、約10%～約30%、約10%～約25%、約10%～約20%、約10%～約15%、約20%～約50%、約20%～約45%、約20%～約40%、約20%～約35%、約20%～約30%、約20%～約25%、約30%～約50%、約30%～約45%、約30%～約40%、約30%～約35%、約40%～約50%、または約40%～約45%）である。

【0280】

一部の実施形態では、LNPは、イオン化可能な脂質（モル比20%～70%）、PEG化された脂質（モル比0%～30%）、支持脂質（モル比30%～50%）、およびコレステロール（モル比10%～50%）の混合物を含んでよい。

【0281】

リポソーム

一部の実施形態では、脂質粒子はリポソームであってよい。リポソームは、内部の水性区画を取り囲む単層または多層の脂質二重層と、比較的透過性の外側親油性リン脂質二重層からなる球状の小胞構造である。一部の実施形態では、リポソームは、生体親和性、非毒性であり、親水性と親油性の両方の薬物分子を送達し、それらのカーゴを血漿酵素による分解から保護し、それらのロードを生物学的膜および血液脳関門（BBB）を通して輸送することができる。

【0282】

リポソームは、いくつかの異なる型の脂質、例えばリン脂質から作製することができる。リポソームは、1,2-ジステアロリル（stearoyl）-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン（DSPC）、スフィンゴミエリン、卵ホスファチジルコリン、モノシアロガングリオシド、またはそれらの任意の組合せ等の、天然のリン脂質および脂質を含んでよい。

【0283】

リポソームの構造および特性を改変するために、他のいくつかの添加物をリポソームに加えてもよい。例えば、リポソームは、例えば安定性を増大するため、および／またはリポソームの内部カーゴの漏洩を防止するために、コレステロール、スフィンゴミエリン、および／または1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（DOPE）をさらに含んでよい。

【0284】

安定な核酸-脂質粒子（SNALP）

一部の実施形態では、脂質粒子は、安定な核酸脂質粒子（SNALP）であってよい。SNALPは、イオン化可能な脂質（DLiDMA）（例えば低いpHでカチオン性）、中性ヘルパー脂質、コレステロール、拡散性のポリエチレングリコール（PEG）-脂質、またはそれらの任意の組合せを含んでよい。一部の例では、SNALPは、合成コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン、3-N-その他の脂質を含んでよい。

【0285】

脂質粒子は、他の1つまたは複数の型の脂質、例えばアミノ脂質2，2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-リポプレックスおよび／またはポリプレックス等のカチオン性脂質を含んでもよい。

【0286】

一部の実施形態では、デリバリー媒体は、リポプレックスおよび／またはポリプレックスを含む。リポプレックスは、陰性に荷電した細胞膜に結合し、細胞内にエンドサイトーシスを誘導する。リポプレックスの例には、脂質および非脂質成分を含む複合体があり得る。リポプレックスおよびポリプレックスの例には、FuGENE-6試薬、脂質およびその他の成分を含む非リポソーム溶液、両性イオン性アミノ脂質(ZAL)、Ca²⁺p（例えばDNA／Ca²⁺+ミクロ複合体を形成する）、ポリエテンイミン(PEI)（例えば分枝PEI）、およびポリ(L-リジン)(PLL)が含まれる。

【0287】

細胞浸透性ペプチド

一部の実施形態では、デリバリー媒体は細胞浸透性ペプチド(CPP)を含む。CPPは、種々の分子カーゴ（例えばナノサイズの粒子から小さな化学分子およびDNAの大きな断片まで）の細胞内取り込みを容易にする短いペプチドである。

【0288】

CPPは、様々な寸法、アミノ酸配列、および電荷であってよい。一部の例では、CPPは原形質膜を転位させ、種々の分子カーゴの細胞質またはオルガネラへのデリバリーを容易にすることができる。CPPは、様々な機構、例えば膜における直接浸透、エンドサイトーシスによって媒介される進入、および過渡的構造の形成による転位を介して、細胞内に導入してよい。

【0289】

CPPは、高い相対的存在量のリジンまたはアルギニン等の陽性荷電のアミノ酸を含むか、または極性／荷電アミノ酸と非極性で疎水性のアミノ酸の交互のパターンを含む配列を有するアミノ酸組成を有し得る。これら2つの型の構造は、それぞれポリカチオン性または両親媒性と称される。第3のクラスのCPPは、低い正味電荷を有し非極性残基のみを含む疎水性ペプチドであるか、または細胞への取り込みに重要な疎水性アミノ酸基を含む。もう一つの型のCPPは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)由来のトランス活性化転写アクチベーター(Tat)である。CPPの例には、ペネトラチン、Tat(48-60)、トランスポータン、および(R-Ahx-R4)(Ahxはアミノヘキサノイルを指す)が含まれる。CPPの例および関連する応用には、米国特許第8,372,951号に記載されたものも含まれる。

【0290】

CPPは、インビトロおよびエキスビボの仕事に極めて容易に用いることができ、それぞれのカーゴおよび細胞型のための広範囲の最適化が通常、必要である。一部の例では、CPPはCasタンパク質に直接共有結合してよく、これは次にgRNAと複合体を形成して細胞に送達される。一部の例では、多数の細胞へのCPP-CasとCPP-gRNAの個別のデリバリーを実施してよい。CPPはRNPを送達する(delivery)のために用いてもよい。

【0291】

DNAナノクルー

一部の実施形態では、デリバリー媒体は、DNAナノクルーを含む。DNAナノクルーは、球状構造のDNA（例えばヤムイモの球の形状をもっている）を指す。ナノクルーは、構造の自己集合において助けとなる回文配列によるローリングサークル増幅によって合成してよい。次いで球にペイロードをロードしてよい。DNAナノクルーの例は、Sun Wら、J Am Chem Soc. 2014 Oct 22; 136(42): 14722~5ページ；およびSun W et al., Angew Chem Int Ed Engl. 2015 Oct 5; 54(41): 12029~33ページに記載されている。DNAナノクルーは、Cas:gRNAリボヌクレオプロテイン複合体の中のgRNA

10

20

30

40

50

と部分的に相補的であるべき回文配列を有し得る。DNAナノクルーは、エンドソーム脱出を誘導するためにコーティング、例えばPEIによってコーティングしてよい。

【0292】

金ナノ粒子

一部の実施形態では、デリバリー媒体は、金ナノ粒子（AuNPまたはコロイド状金とも称する）を含む。金ナノ粒子は、カーゴ、例えばCas: gRNA RNPと複合体を形成し得る。金ナノ粒子は、コーティング、例えばシリケートおよびエンドソーム破壊ポリマーPA sp (DET) によるコーティングを行なってよい。金ナノ粒子の例には、A uraSense Therapeutics社のSpherical Nucleic Acid [SNA (商標)] コンストラクト、およびMout R, ら (2017). A CS Nano 11: 2452~8ページ; Lee K, ら (2017). Nat Biomed Eng 1: 889~901ページに記載されたものが含まれる。

10

【0293】

iTOP

一部の実施形態では、デリバリー媒体はiTOPを含む。iTOPは、いずれの形質導入ペプチドにも依存せずに、天然のタンパク質の細胞内への高度に効率的なデリバリーを駆動する小分子の組合せを指す。iTOPは、オスモサイトーシスおよびプロパンペタインによる形質導入の誘導に用いられ、NaClに媒介される高浸透圧と形質導入化合物（プロパンペタイン）の併用によって、細胞外高分子の細胞内へのマクロピノサイトーシスによる取り込みを誘発する。iTOP法および試薬の例には、D' Astolfo DS, Pagliero RJ, Pras Aら、(2015) Cell 161: 674~690ページに記載されたものが含まれる。

20

【0294】

ポリマー系粒子

一部の実施形態では、デリバリー媒体はポリマー系粒子（例えばナノ粒子）を含んでよい。一部の実施形態では、ポリマー系粒子は膜融合のウイルス機構を模倣し得る。ポリマー系粒子はインフルエンザウイルスの機構の合成コピーであってよく、酸性コンパートメントの形成が関与するプロセスであるエンドサイトーシス経路を介して細胞に取り込まれる種々の型の核酸（siRNA、miRNA、プラスミドDNA、またはshRNA、mRNA）とトランスフェクション複合体を形成する。後期エンドソームの低いpHは、粒子表面を疎水性にし、膜の横断を容易にする化学的スイッチとして作用する。いったんサイトゾルに入れば、粒子は細胞作用のためにそのペイロードを放出する。この活性エンドソーム脱出技術は天然の取り込み経路を用いているので、安全であり、トランスフェクション効率を最大化する。一部の実施形態では、ポリマー系粒子は、アルキル化およびカルボキシル化された分枝ポリエチレンイミンを含んでよい。一部の例では、ポリマー系粒子は、VIROMER、例えばVIROMER RNAi、VIROMER RED、VIROMER mRNA、VIROMER CRISPRである。本明細書のシステムおよび組成物を送達する方法の例には、Bawage SSら、Synthetic mRNA expressed Cas13a mitigates RNA virus infections, www.biorxiv.org/content/10.1101/370460、Viromer (登録商標) RED, a powerful tool for transfection of keratinocytes. doi:10.13140/RG.2.2.16993.61281、Viromer (登録商標) Transfection-Factbook 2018: technology, product overview, users' data., doi:10.13140/RG.2.2.23912.16642に記載されたものが含まれる。

30

40

【0295】

ストレプトリジンO (SLO)

デリバリー媒体はストレプトリジンO (SLO) であってよい。SLOは、哺乳動物の

50

細胞膜に細孔を創成することによって働く、グループAストレプトコッカスによって産生される毒素である。SLOは可逆的な様式で作用し、全体の生存率を犠牲にすることなく、細胞のサイトソルへのタンパク質（例えば100kDaまで）のデリバリーを可能にする。SLOの例には、Sierig Gら、(2003) *Infect Immun* 71: 446~55ページ; Walev Iら、(2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3185~90ページ; Teng KWら、(2017) *Elife* 6: e25460に記載されたものが含まれる。

【0296】

多機能性エンベロープ型ナノデバイス (MEND)

デリバリー媒体は多機能性エンベロープ型ナノデバイス (MEND) を含んでよい。MENDは、凝縮プラスミドDNA、PLLコア、および脂質フィルムシェルを含んでよい。MENDは、細胞浸透性ペプチド（例えばステアリルオクタアルギニン）をさらに含んでよい。細胞浸透性ペプチドは、脂質シェルの中に存在してよい。脂質エンベロープは、1つまたは複数の機能性成分、例えばポリエチレングリコール（例えば血管循環時間を増大させるため）、特定の組織／細胞を標的化するためのリガンド、さらなる細胞浸透性ペプチド（例えば細胞デリバリーをより大きくするため）、エンドソーム脱出を増強するための脂質、および核デリバリータグの1つまたは複数によって改変してもよい。一部の例では、MENDはテトラメラMEND (T-MEND) であってよく、これは細胞核およびミトコンドリアを標的とし得る。ある特定の例では、MENDはPEG-ペプチド-DOPEコンジュゲートMEND (PPD-MEND) であってよく、これは膀胱がん細胞を標的とし得る。MENDの例には、Kogure Kら、(2004) *J Control Release* 98: 317~23ページ; Nakamura Tら、(2012) *Acc Chem Res* 45: 1113~21ページに記載されたものが含まれる。

【0297】

脂質コートメソポーラスシリカ粒子

デリバリー媒体は脂質コートメソポーラスシリカ粒子を含んでよい。脂質コートメソポーラスシリカ粒子は、メソポーラスシリカナノ粒子コアおよび脂質膜シェルを含んでよい。シリカコアは大きな内部表面積を有し、高いカーゴローディング容量をもたらし得る。一部の実施形態では、細孔径、細孔化学、および全体の粒子サイズを、様々な型のカーゴをロードするために改変してよい。粒子の脂質コーティングは、カーゴローディングを最大化し、循環時間を増大させ、正確な標的化およびカーゴ放出を提供するために、改変してもよい。脂質コートメソポーラスシリカ粒子の例には、Du Xら、(2014) *Biomaterials* 35: 5580~90ページ; Durfee PNら、(2016) *ACS Nano* 10: 8325~45ページに記載されたものが含まれる。

【0298】

無機ナノ粒子

デリバリー媒体は無機ナノ粒子を含んでよい。無機ナノ粒子の例には、炭素ナノチューブ (CNT) [例えばBates Kand Kostarellos K. (2013) *Adv Drug Deliv Rev* 65: 2023~33ページに記載されている]、裸のメソポーラスシリカナノ粒子 (MSNP) [例えばLuo GFら、(2014) *Sci Rep* 4: 6064ページに記載されている]、および緻密なシリカナノ粒子 (SiNP) [Luo DおよびSaltzman WM. (2000) *Nat Biotechnol* 18: 893~5ページに記載されている] が含まれる。

【0299】

使用の方法

本明細書の組成物およびシステムは、植物および真菌等の非動物生命体の改変、および動物の改変、植物、動物、およびヒトにおける疾患の処置および診断を含む種々の適用のために用いてよい。一般に、組成物およびシステムを、細胞、組織、器官、または生命体に導入してよく、そこで1つまたは複数の遺伝子の発現および／または活性が改変される

。

【0300】

細胞および生命体

本開示は、操作された Cas タンパク質、CRISPR-Cas システム、CRISPR-Cas システムの1つまたは複数の成分をコードするポリヌクレオチド、および／またはポリヌクレオチドを含むベクターを含む細胞、組織、生命体を提供する。本開示は、本明細書に記載した方法または組成物のいずれかにおける真核生物または真核細胞における発現のためにコドン最適化されたエフェクタータンパク質をコードするヌクレオチド配列も提供する。本開示の一実施形態では、コドン最適化されたエフェクタータンパク質は、本明細書で論じる任意の Cas タンパク質であり、真核細胞または生命体、例えば本明細書の他の箇所で述べた細胞または生命体、例えば限定するものではないが酵母細胞またはマウス細胞、ラット細胞、およびヒト細胞を含む哺乳動物の細胞もしくは生命体または非ヒト真核生命体、例えば植物における作動可能性のためにコドン最適化される。

10

【0301】

ある特定の実施形態では、目的の標的遺伝子座の改変は、少なくとも1つの遺伝子産物の変化した発現を含む真核細胞、少なくとも1つの遺伝子産物の発現が増大している、少なくとも1つの遺伝子産物の変化した発現を含む真核細胞、少なくとも1つの遺伝子産物の発現が減少している、少なくとも1つの遺伝子産物の変化した発現を含む真核細胞、または編集されたゲノムを含む真核細胞をもたらし得る。

20

【0302】

ある特定の実施形態では、真核細胞は哺乳動物細胞またはヒト細胞であってよい。

【0303】

さらなる実施形態では、本明細書に記載した天然に存在しないもしくは操作された組成物、ベクターシステム、またはデリバリーシステムを、部位特異的遺伝子ノックアウト、部位特異的ゲノム編集、RNA 配列特異的干渉、またはマルチプレックスゲノム操作のために用いてよい。

【0304】

本明細書に記載した細胞、細胞株、または生命体からの遺伝子産物も提供される。ある特定の実施形態では、発現される遺伝子産物の量は、変化した発現または編集されたゲノムを有しない細胞からの遺伝子産物の量より多いことも少ないこともある。ある特定の実施形態では、遺伝子産物は、変化した発現または編集されたゲノムを有しない細胞からの遺伝子産物と比較して変化することがある。

30

【0305】

例示的な療法

本開示は、種々の疾患および障害における処置のための CRISPR-Cas システムの使用を提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載した本開示は、VEGF（例えば VEGFA）遺伝子を調節するために細胞が CRISPR または塩基エディターによってエクスピボで編集され、引き続いて編集された細胞がそれを必要とする患者に投与される、治療のための方法に関する。一部の実施形態では、編集は細胞内の VEGF（例えば VEGFA）遺伝子の発現をノッキングイン、ノッキングアウト、またはノッキングダウンすることを含む。

40

【0306】

一部の実施形態では、本明細書に記載した VEGFA を標的とする CRISPR-Cas システムは、VEGFA によって媒介される細胞プロセスを阻害するために有用であり、VEGFA または VEGFA 関連受容体の作用によって刺激される異常な血管新生および／またはリンパ管新生に付随する障害（例えば種々の眼科障害およびがん）の予防または治療のための適応を有する。

【0307】

少なくとも1つの DNA 結合性タンパク質および遺伝子発現の少なくとも1つのモジュレーターを含む融合分子、または融合分子をコードする核酸配列、および VEGF 遺伝子

50

の近傍および／または VEGF 制御エレメント内の DNA 配列を標的とするように設計された sgRNA を含む、本明細書に記載した VEGFA を標的とする CRISPR-Cas システムは、VEGF-A の除去、阻害、または低減によって改善され、改良され、阻害され、または防止される状態の任意の疾患を処置または防止するために治療的に有用である。

【0308】

VEGFA の阻害または低減によって改善される特定の条件の非網羅的なリストには、外傷、発作、もしくは腫瘍に伴う脳浮腫等の血管内皮細胞の過剰な増殖、血管透過性、浮腫、乾癬もしくはリウマチ性関節炎を含む関節炎等の炎症性障害に伴う浮腫、喘息、熱傷に伴う全身性浮腫、腫瘍、炎症、もしくは外傷に伴う腹水および胸水、慢性気道炎症、毛細血管漏出症候群、敗血症、タンパク質の漏出の増大に伴う腎疾患、ならびに加齢性黄斑変性症および糖尿病性網膜症等の眼科障害によって特徴付けられる臨床状態が含まれる。

10

【0309】

「新生血管障害」は、変化した、異常調節された、または調節されない血管新生によって特徴付けられる障害または疾患の状態である。新生血管障害の例には、新生形質転換（例えばがん）および糖尿病性網膜症および加齢性黄斑変性症を含む眼科の新生血管障害が含まれる。

【0310】

「眼科の新生血管障害」は、患者の眼における変化した、異常調節された、または調節されない血管新生によって特徴付けられる障害である。そのような障害には、視神経円板の血管新生、虹彩の血管新生、網膜の血管新生、脈絡膜の血管新生、角膜の血管新生、硝子体の血管新生、緑内障、パンヌス、翼状片、黄斑浮腫、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、血管性網膜症、網膜変性、ぶどう膜炎、網膜の炎症性疾患、および増殖性硝子体網膜症が含まれる。

20

【0311】

一部の実施形態では、本明細書で開示した組成物および方法によって処置されるべき疾患は、血管新生（血管の形成）を伴う。一部の実施形態では、疾患は新生血管障害、例えば加齢性黄斑変性（AMD）を含む眼科の血管新生障害であり、ドライ AMD およびウェット AMD を含む。

【実施例】

30

【0312】

【実施例 1】

融合分子プラスミドの構築およびノックダウン効率

【0313】

「EPICAS」システムを形成するために 2 つのプラスミドを構築した（図 1A）。「融合分子」または「触媒タンパク質」プラスミドは、dCas9、DNMT3A、DNMT3L、および KRAB ペプチドをコードする。融合した DNMT3A および DNMT3L（3A3L）ペプチドは dCas9 の N 末端に存在し、KRAB は dCas9 の C 末端に存在する。即ち、融合分子は、N 末端から C 末端へ、3A3L-dCas9-KRAB を有する。「sgRNA」プラスミドは、VEGFa 遺伝子を標的とする sgRNA 配列をコードする。「スカフォールド」は、VEGFA 遺伝子の遺伝子またはプロモーターの配列である。マウス VEGFa 遺伝子の転写開始部位（TSS）の上流および下流 250bp 以内の領域を標的とするために多数の sgRNA を設計した。具体的には、7 種の sgRNA（配列番号 29～35）を設計し、引き続くトランスフェクションのために対応する sgRNA プラスミドを生成した。

40

【0314】

個別の sgRNA プラスミドを、触媒タンパク質のプラスミドとともにマウス N2A 細胞株（National collection of Authenticated Cell cultures）に共トランスフェクトした。48 時間後、上位 10% の GFP+ および mCherry+ の細胞を FACS によって選別した。VEGFa の mRNA

50

A 発現レベルを評価するために RT-QPCR 実験を実施した。試験した 7 種の sgRNA 全てが、N2A 細胞内で有意に下方制御された VEGF の発現を示し、約 80% のノックダウン効率を示した。その中で、sgRNA 3、sgRNA 5、および sgRNA 7 をトランスフェクトした細胞が、約 84% に達する最良のノックダウン効果を示した (図 1 B)。

【0315】

次に、sgRNA 3、sgRNA 4、および sgRNA 5 を、長期にわたるノックダウン効果の保持をさらに試験するために選択した。sgRNA プラスミドを、触媒タンパク質のプラスミドとともにマウス N2A 細胞株に共トランスフェクトした。48 時間後に、上位 10% の GFP+ および mCherry+ の細胞を FACS によって選別し、培養を継続した。1 週間後に細胞を収集し、VEGF の mRNA 発現レベルを評価するために RT-QPCR 実験を実施した。結果は、遺伝子サイレンシング効果がトランスフェクションの 48 時間後と比較して保持され、改善さえされて、90% 超に達したことを示した (図 1 C)。VEGF mRNA は細胞内で比較的長い半減期を有し、既存の VEGF mRNA の分解および新たな VEGF mRNA の合成の妨害の両方が、1 週間後の VEGF mRNA の低いレベルに寄与していることが推測される。

10

【0316】

さらに、2 つ以上の sgRNA の組合せが N2A 細胞における VEGF の遺伝子発現レベルをさらに低減させ得るか否かを決定するために、sgRNA 3、sgRNA 4、および sgRNA 5 の組合せ (sgMix) を試験した。結果は、sgMix が VEGF の発現レベルを有意にノックダウンすることを示した (図 1 C)。

20

【実施例 2】

融合分子をコードする mRNA のインビトロ転写

【0317】

インビトロの転写および精製を用いて、EPICAS システムの融合分子または触媒タンパク質に対応する mRNA を産生した。最初に、5' UTR-DNMT3A-DNMT3L-dCas9-KRAB-3' UTR-ポリ A のカセットを含む融合分子エレメントの全てを含むプラスミドを構築した。プラスミド配列は、XbaI および BpiI 制限酵素消化によって直線化した (図 2 A)。直線化した DNA 鋳型、T7 RNA ポリメラーゼ、NTP、およびキャップアナログを含むインビトロ転写反応を実施して、N1-メチルプソイドウリジンを含む mRNA を産生した。DNase I によって DNA 鋳型を消化した後、mRNA 産生物を精製して緩衝液を交換し、最終 mRNA 産生物の純度をキャピラリーゲル電気泳動によって評価した (図 2 B)。100 マーの sgRNA は、市販供給元 (Genewiz 社) による固相合成条件の下での最小末端改変によって化学合成した。

30

【0318】

インビトロで転写された mRNA の機能を試験するため、HEK293T 細胞内で Snrpn-GFP レポーターシステムを構築した。レポーターシステムは、合成のメチル化センシングプロモーター (刷り込み遺伝子 Snrpn のプロモーター由来の保存された配列エレメント) を用いて、GFP の発現を制御する。このレポーターコンストラクトをゲノム遺伝子座に挿入することによって、近傍の配列のメチル化状態が示された。リポフェクタミンメッセンジャー MAX を用いて、上記のインビトロで転写された mRNA (GFP-P2A-Casoff mRNA) を、Snrpn 遺伝子を標的とする sgRNA とともにマウス一次肝細胞に共トランスフェクトした (図 2 C、左パネル)。FACS 解析によって、mRNA および sgRNA によるトランスフェクションの 72 時間後に GFP+ 細胞の割合が有意に増大することが示され、マウス肝細胞内でレポーターシステムが成功裡に確立されたことが示唆された (図 2 C、中央パネル)。さらに、トランスフェクションの 72 時間後の VEGF mRNA の発現レベルは明らかに低減していた (図 2 C、右パネル)。

40

【0319】

50

総合して、これらの結果は、E P I C A S mRNA が、過渡的トランスフェクションを用いて長期間にわたってV E G F A の発現をサイレンシングさせることができることを示している。

【実施例 3】

融合分子をコードするmRNA および sgRNA の脂質ナノ粒子カプセル化

【0320】

当技術で既知の標準的な方法を用いて、融合分子mRNA および sgRNA をマウス脈絡膜に送達するためのLNPを製剤化した。LNPは、融合分子mRNA およびV E G F A 遺伝子を標的とするsgRNA を1:1の重量比で含んでいた(図3A)。イオン化可能な脂質(モル比49.5%)、PEG化脂質(モル比2.5%)、支持脂質(DPPC)(モル比9.9%)、およびコレステロール(モル比38.1%)の混合物、即ち脂質ナノ粒子(LNP)を、適切に設計された衝突流反応器または微小流体デバイスを用いて製剤化した。イオン化可能な脂質の割合を変更することによって、sgRNA と mRNA の放出速度を改変することができる。イオン化可能な脂質の割合を多くすることによって(モル比55%超)、sgRNA は mRNA より速く放出された。透過型電子顕微鏡(TEM)画像により、LNPが球状でナノサイズの粒子であることが示された(図3B)。LNPは、動的光散乱(NanoS Z社、Malvern)を用いて、均一なサイズ(78.2 ± 5.2 nm、PDI < 0.10)を有していた(図3C)。

【0321】

LNPがインビボでmRNA を後網膜および脈絡膜の領域に成功裡に送達することができるか否かを試験するため、ルシフェラーゼmRNA を含むLNPを産生し、Ai9マウス(Jax Lab社)の眼に硝子体内注射によって投与した。EF1A-Cre-GFPを発現するAAV8ウイルスを陽性対照として用い、PBSを陰性対照として用いた。蛍光のインビボイメージング結果により、LNPはmRNA を極めて効率的な様式で網膜色素上皮(RPE)および脈絡膜に送達できることが示された(図3D)。陽性対照AAV8は、RPEおよび脈絡膜に効率的に感染できた。

【実施例 4】

マウスにおける融合分子をコードするmRNA および sgRNA のLNPデリバリーを用いるV E G F 遺伝子のサイレンシング

【0322】

LNPによって送達されるmRNA および sgRNA がV E G F a mRNA のレベルを成功裡にノックダウンできるか否かを試験するため、E P I C A S mRNA および sgRNA 3を含むLNPを産生し、Ai9マウスの眼に硝子体内注射によって投与した。注射の5日後にマウスを安楽死させ、網膜および脈絡膜を取得して、mRNA の精製のために処理した。RT-QPCR実験を実施して、V E G F a の mRNA 発現レベルを評価した。

【0323】

結果は、対照PBS群と比較して、脈絡膜におけるV E G F a の有意に下方制御された発現を示し(図3E)、インビボにおけるV E G F 遺伝子発現をサイレンシングするE P I C A S システムの有効性が示された。他方、網膜におけるV E G F a の発現の低減は対照群と比較して有意ではなく、遺伝子発現の低減における脈絡膜の潜在的な選好性が示された。

【実施例 5】

ウサギ細胞におけるウサギV E G F 遺伝子のサイレンシング

【0324】

ウサギV E G F a sgRNA (配列番号60~84)をスクリーニングするためのレポーターシステムを確立した。ウサギV E G F a 遺伝子の転写開始部位(TSS)の上流500bpから第1エクソンまでおよび第1エクソンのC末端のGFPを含む人工配列を構築した(図4A)。ピギーバックトランスポゾンシステムを用いて、人工配列を293T細胞のゲノムに一体化した。GFPを安定的にトランスフェクトした細胞株が得られ、

これを s g R N A のスクリーニングに用いた。この実験において、レポーター細胞を E P I C A S プラスミドおよび s g R N A でトランスフェクトし、72 時間後にレポーター細胞の蛍光強度を検出した。フローサイトメトリー解析の結果は、大部分の s g R N A が G F P の強度を有意に低下させたことを示した (図 4 B)。良好なノックダウン効果を有していた s g R N A の 6 種のうち 4 種を、E P I C A S プラスミドとともにウサギ R K - 1 3 細胞にトランスフェクトし、ウサギ細胞内の内因性遺伝子 V E G F A を標的とした。Q P C R の結果は、これらの s g R N A が R K - 1 3 細胞内の V E G F A の m R N A 発現を有意に低減させたことを示した (図 4 C)。

【実施例 6】

ヒト細胞株におけるヒト V E G F 遺伝子のサイレンシング

10

【0325】

ヒト細胞株における V E G F 遺伝子サイレンシングの有効性を試験するため、レポーター細胞株を構築した。C M V プロモーターで駆動されるカセットを有するようにプラスミドを構築した。ここでカセットは以下のエレメントを 5' から 3' の方向で有していた。5' - p C M V - 300 b p - T S S - + 300 b p - V E G F エクソン 1 - 2 A - G F P - 3'。このレポーターシステムにおいて、C M V プロモーターは V E G F および G F P 蛍光の発現を駆動する。V E G F がサイレンシングされれば、G F P の転写が終止する。ピギーバックトランスポザーゼ (P B a s e) プラスミドとともに、レポータープラスミドを H E K 293 T 細胞にトランスフェクトした。レポーターカセットの一体化に成功した細胞を、G F P 蛍光の発現によって F A C S で選別した。

20

【0326】

サルおよびヒトの V E G F 遺伝子の転写開始部位 (T S S) の上流および下流の 300 b p 内の相同領域を標的とするように多数の s g R N A を設計した (図 5 A)。23 個の s g R N A (配列番号 36 ~ 58) を、s g R N A のそれぞれ 1 つをコードするプラスミドの構築のために選択した。個別の s g R N A プラスミドを、触媒タンパク質 (D N M T 3 A - D N M T 3 L - d C a s 9 - K R A B) プラスミドとともに H E K 293 T 細胞に共トランスフェクトした。48 時間または 96 時間後、G F P + および m C h e r r y + 二重陽性細胞を F A C S によって選別した。R T - Q P C R 実験を実施して、V E G F a の m R N A 発現レベルを評価した。

【0327】

30

試験した大部分の s g R N A は、293 T 細胞内で有意に下方制御された V E G F a の発現を示した (図 5 B)。s g R N A 10、s g R N A 19、s g R N A 20、s g R N A 21、s g R N A 22、および s g R N A 23 をトランスフェクトした細胞が、48 時間後に 50% を超える V E G F a の下方制御をもたらした。96 時間後には V E G F A の発現レベルは低くなり、s g R N A 19、s g R N A 20、および s g R N A 22 は 80% を超える下方制御に達した。

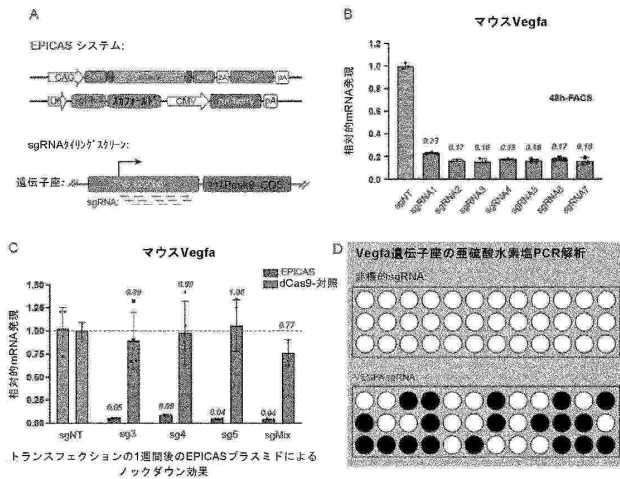
【0328】

総合して、これらの結果は、E P I C A S システムが、マウス細胞とヒト細胞の両方において高い効率および持続性で V E G F A の発現を成功裡にサイレンシングしたことを示し、遺伝子外編集による V E G F 遺伝子の発現のサイレンシングを支持している。L N P は、E P I C A S システムをインピボで成功裡に送達するために用いられた。したがって、E P I C A S システムの L N P 製剤は、A M D 等の V E G F 関連疾患の処置に用いることができる。

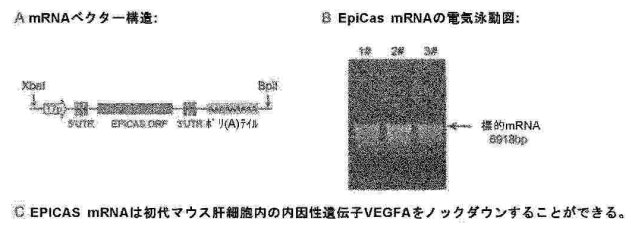
40

【図面】

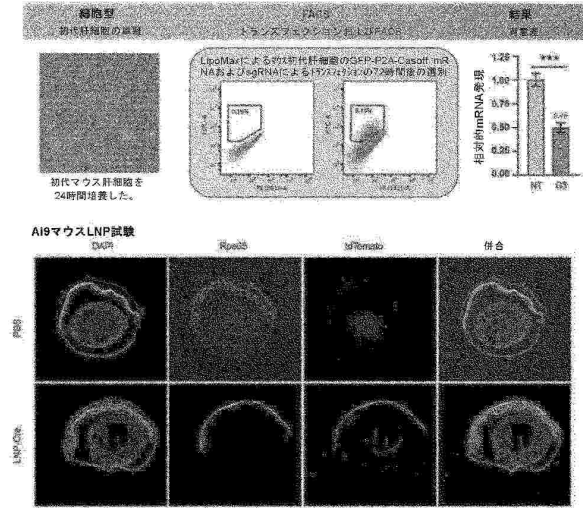
【図 1】



【図 2】

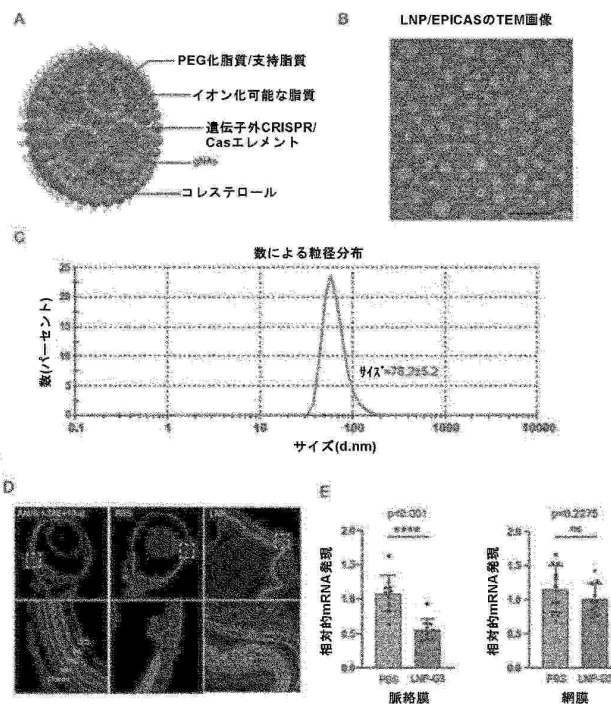


10

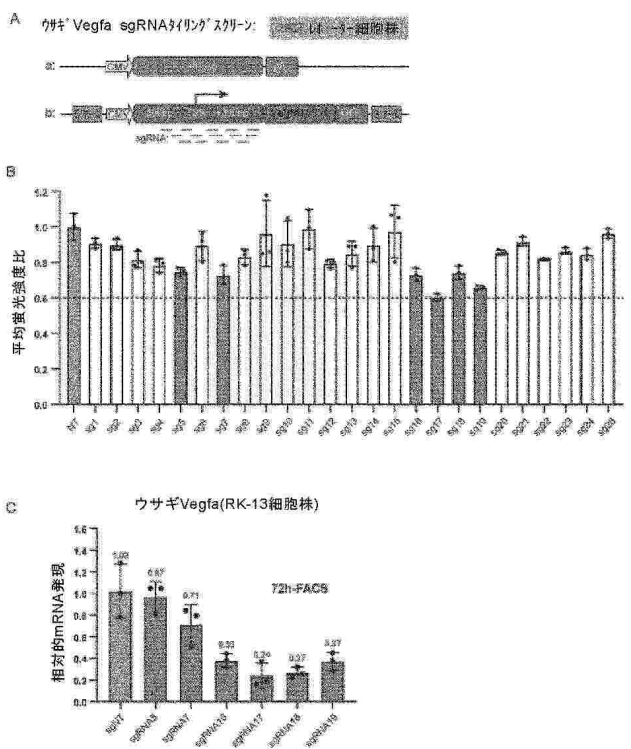


20

【図 3】



【図 4】

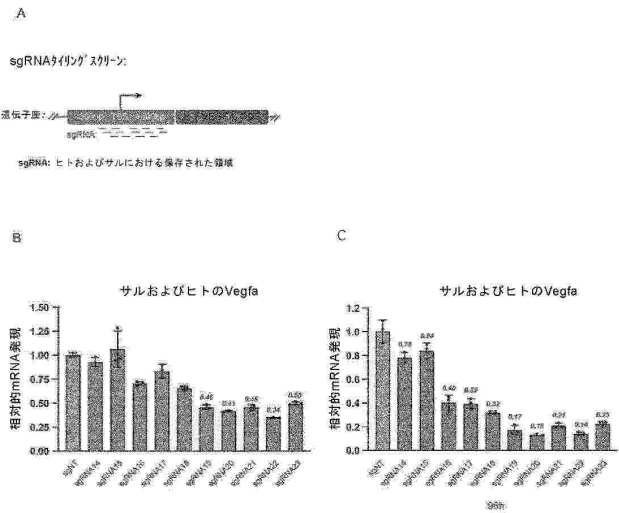


30

40

50

【図 5】



10

【配列表】

2025502346000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/071521

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/113(2010.01)i;C12N 9/22(2006.01)i;C07K 14/515(2006.01)i;A61P 27/02(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N, C07K, A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, WPABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, ENTXT, CNKI, WANFANG DATABASE, WEB OF SCIENCE, PUBMED: fusion, DNA binding protein, modulator of gene expression, VEGF, regulatory, modification, DNMT, methyltransferase, demethylase, Cas9, Cpf1, ZNF, TALEN, tcagctcgccccagtgccg; GENBANK +EMBL+Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent: SEQ ID No: 29.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021243105 A1 (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA) 02 December 2021 (2021-12-02) see claims 1-24, paragraphs 97, 104, 127, 128, 164-169, 173	1-57 (all partial)
A	CN 111748583 A (CHI J, et al.) 09 October 2020 (2020-10-09) see claims 1-10	1-57 (all partial)
A	US 2003044404 A1 (SANGAMO BIOSCIENCES INC) 06 March 2003 (2003-03-06) see claims 1-95	1-57 (all partial)
A	Mengran Shi, et al. "CRISPR/Cas9 technology in disease research and therapy: a review" <i>Chinese Journal of Biotechnology</i> , 25 April 2021 (2021-04-25), pages 1205-1228, see the abstract	1-57 (all partial)
A	Sikai Ling, et al. "Lentiviral delivery of co-packaged Cas9 mRNA and a Vegfa-targeting guide RNA prevents wet age-related macular degeneration in mice" <i>Nature Biomedical Engineering</i> , 28 February 2021 (2021-02-28), pages 144-156, see the abstract	1-57 (all partial)
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 April 2023		Date of mailing of the international search report 02 May 2023
Name and mailing address of the ISA/CN CHINA NATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY ADMINISTRATION 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China		Authorized officer WU,TingChen Telephone No. (+86) 010-62089319

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/071521

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/071521

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **46-53**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claims 46-53 relates to a method for treatment of the human or animal body by therapy, thus these claims do not meet the requirements of rule39.1(iv). The search report and opinion of claims 46-53 are based on the subject matter of "use of the composition of any one of claims 1-40 and 44 in the manufacture of the medicament for treating or alleviating a symptom of a VEGF related disorder in a subject".
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

Inventions 1-55: claims 1-57 (all partial), relates to a sgRNA, a nucleic acid molecule encoding the sgRNA, relevant composition and use thereof, wherein the nucleic acid sequence of the sgRNA is any one of SEQ ID NOs: 29-58 and 60-84, respectively.

There is no common or corresponding special technical feature among inventions 1-55. The reasons are as follows: "the sgRNA" among inventions 1-55 comprises any one of the nucleic acid sequence of SEQ ID NOs: 29-58 and 60-84, respectively. Since the nucleic acid sequences of SEQ ID NOs: 29-58 and 60-84 and the structure units of the sgRNA are different, the common or corresponding technical feature among inventions 1-55 is "the sgRNA". However, such technical feature has been disclosed by the prior art and can not be acted as a special technical feature. Therefore, inventions 1-55 are not linked by a single general inventive concept, hence do not meet the requirements of unity of invention as defined in PCT Rule 13.1.

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/071521

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-57 (all partial), related to a sgRNA involving SEQ ID NO:29, a nucleic acid molecule encoding the sgRNA, relevant composition and use thereof.**

- Remark on Protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members					International application No. PCT/CN2023/071521		
Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
WO	2021243105	A1	02 December 2021	None			
CN	111748583	A	09 October 2020	None			
US	2003044404	A1	06 March 2003	JP	2008150374	A 03 July 2008	
				JP	4931246	B2 16 May 2012	
				US	7067317	B2 27 June 2006	
				JP	2011254819	A 22 December 2011	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z
C 1 2 N	9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22	
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z

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

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 ジョウ, チャンヤン

中華人民共和国 2 0 0 1 3 1 シャンハイ、プドン・ニュー・エリア、チャイナ・(シャンハイ)・パイロット・フリー・トレード・ゾーン、バーション・ロード、ナンバー 1 6 0、ビルディング 4、ユニット 1、フロア 5

(72)発明者 スン, イーディー

中華人民共和国 2 0 0 1 3 1 シャンハイ、プドン・ニュー・エリア、チャイナ・(シャンハイ)・パイロット・フリー・トレード・ゾーン、バーション・ロード、ナンバー 1 6 0、ビルディング 4、ユニット 1、フロア 5

(72)発明者 マオ, シャオシュアイ

中華人民共和国 2 0 0 1 3 1 シャンハイ、プドン・ニュー・エリア、チャイナ・(シャンハイ)・パイロット・フリー・トレード・ゾーン、バーション・ロード、ナンバー 1 6 0、ビルディング 4、ユニット 1、フロア 5

(72)発明者 ポン, ウェンボー

中華人民共和国 2 0 0 1 3 1 シャンハイ、プドン・ニュー・エリア、チャイナ・(シャンハイ)・パイロット・フリー・トレード・ゾーン、バーション・ロード、ナンバー 1 6 0、ビルディング 4、ユニット 1、フロア 5

F ターム (参考) 4C084 AA13 DC01 MA24 MA41 MA58 MA66 NA14 ZA331 ZA332 ZB211
ZB212

4C087 BC83 CA12 MA24 MA41 MA66 NA14 ZA33 ZB21