

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-531804

(P2021-531804A)

(43) 公表日 令和3年11月25日 (2021.11.25)

(51) Int. Cl.	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 1 O	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 0 O	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	4 C 0 8 6
A O 1 K 67/027 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/88 (2006.01)	A O 1 K 67/027	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 141 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2021-504770 (P2021-504770)	(71) 出願人	518196169
(86) (22) 出願日	令和1年7月30日 (2019.7.30)		インテリア セラピューティクス, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	令和3年3月25日 (2021.3.25)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/044080		2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0, スイート 1 3 0
(87) 国際公開番号	W02020/028327	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	令和2年2月6日 (2020.2.6)		弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	62/712, 904	(74) 代理人	100093676
(32) 優先日	平成30年7月31日 (2018.7.31)		弁理士 小林 純子
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100120134
(31) 優先権主張番号	62/738, 936		弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成30年9月28日 (2018.9.28)	(74) 代理人	100153693
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 岩田 耕一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 原発性高シュウ酸尿症 1 型 (PH 1) を治療するためのヒドロキシ酸オキシダーゼ 1 (HAO 1) 遺伝子編集のための組成物および方法

(57) 【要約】

HAO 1 遺伝子内で編集するための、例えば、二本鎖切断を導入するための組成物および方法が提供される。原発性高シュウ酸尿症 1 型 (PH 1) を有する対象を治療するための組成物および方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H A O 1 遺伝子内で二本鎖切断 (D S B) または一本鎖切断 (S S B) を誘導する方法であって、組成物を細胞に送達することを含み、前記組成物が、

a. ガイドRNAであって、

i. 配列番号 1 ~ 1 4 6 から選択されるガイド配列、または

i i. 配列番号 1 ~ 1 4 6 から選択される配列の少なくとも 1 7、1 8、1 9、もしくは 2 0 個の連続ヌクレオチド、または

i i i. 配列番号 1 ~ 1 4 6 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 4 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、もしくは 9 0 % 同一であるガイド配列、または

i v. 配列番号 4、5、6、8、2 2、3 5、3 8、3 9、5 6、7 3、8 4、1 0 0、1 0 5、1 1 3、1 1 7、1 2 9、1 4 5 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列、または

v. 配列番号 8、2 2、3 5、3 9、7 3、8 4、1 0 0、1 0 5、1 1 3、1 4 5 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列を含む、ガイドRNAと、任意選択で、

b. RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、を含む、方法。

【請求項 2】

H A O 1 遺伝子の発現を低減する方法であって、組成物を細胞に送達することを含み、前記組成物が、

a. ガイドRNAであって、

i. 配列番号 1 ~ 1 4 6 から選択されるガイド配列、または

i i. 配列番号 1 ~ 1 4 6 から選択される配列の少なくとも 1 7、1 8、1 9、もしくは 2 0 個の連続ヌクレオチド、または

i i i. 配列番号 1 ~ 1 4 6 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 4 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、もしくは 9 0 % 同一であるガイド配列、または

i v. 配列番号 4、5、6、8、2 2、3 5、3 8、3 9、5 6、7 3、8 4、1 0 0、1 0 5、1 1 3、1 1 7、1 2 9、1 4 5 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列、または

v. 配列番号 8、2 2、3 5、3 9、7 3、8 4、1 0 0、1 0 5、1 1 3、1 4 5 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列を含む、ガイドRNAと、任意選択で、

b. RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、を含む、方法。

【請求項 3】

原発性高シュウ酸尿症 1 型 (P H 1) を治療または予防する方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、前記組成物が、

a. ガイドRNAであって、

i. 配列番号 1 ~ 1 4 6 から選択されるガイド配列、または

i i. 配列番号 1 ~ 1 4 6 から選択される配列の少なくとも 1 7、1 8、1 9、もしくは 2 0 個の連続ヌクレオチド、または

i i i. 配列番号 1 ~ 1 4 6 から選択される配列に対して少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 4 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、もしくは 9 0 % 同一であるガイド配列、または

i v. 配列番号 4、5、6、8、2 2、3 5、3 8、3 9、5 6、7 3、8 4、1 0 0、1 0 5、1 1 3、1 1 7、1 2 9、1 4 5 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列、または

v. 配列番号 8、2 2、3 5、3 9、7 3、8 4、1 0 0、1 0 5、1 1 3、1 4 5 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列を含む、ガイドRNAと、任意選択で、

b. RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、を含み、それによってPH1を治療または予防する、方法。

【請求項4】

PH1によって引き起こされる末期腎疾患（ESRD）を治療または予防する方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、前記組成物が、

a. ガイドRNAであって、

i. 配列番号1～146から選択されるガイド配列、または

ii. 配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列、または

iv. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列、または

v. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、ガイドRNAと、任意選択で、

b. RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、を含み、それによって、PH1によって引き起こされる（ESRD）を治療または予防する、方法。

【請求項5】

シュウ酸カルシウム産生および沈着、高シュウ酸尿症、シュウ酸症、ならびに血尿のうちのいずれか1つを治療または予防する方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、前記組成物が、

a. ガイドRNAであって、

i. 配列番号1～146から選択されるガイド配列、または

ii. 配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列、または

iv. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列、または

v. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、ガイドRNAと、任意選択で、

b. RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、を含み、それによって、シュウ酸カルシウム産生および沈着、高シュウ酸尿症、シュウ酸症、ならびに血尿のうちのいずれか1つを治療または予防する、方法。

【請求項6】

血清グリコレート濃度を高める方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、前記組成物が、

a. ガイドRNAであって、

i. 配列番号1～146から選択されるガイド配列、または

ii. 配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列、または

iv. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、10

10

20

30

40

50

0、105、113、117、129、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列、または

v. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、ガイドRNAと、任意選択で、

b. RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、を含み、それによって血清グリコレート濃度を高める、方法。

【請求項7】

対象において尿内のオキシレートを低減する方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、前記組成物が、

a. ガイドRNAであって、

i. 配列番号1～146から選択されるガイド配列、または

ii. 配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列、または

iv. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列、または

v. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、ガイドRNAと、任意選択で、

b. RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、を含み、それによって対象の尿内のオキサレートを低減する、方法。

【請求項8】

RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸が投与される、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

組成物であって、

a. ガイドRNAであって、

i. 配列番号1～146から選択されるガイド配列、または

ii. 配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列、または

iv. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列、または

v. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、ガイドRNAと、任意選択で、

b. RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、を含む、組成物。

【請求項10】

短いシングルガイドRNA（短いsgRNA）を含む組成物であって、

a. ガイド配列であって、

i. 配列番号1～146から選択されるガイド配列のいずれか1つ、または

ii. 配列番号1～146から選択されるガイド配列のいずれか1つの少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であ

10

20

30

40

50

るか、または

i v. 配列番号 4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145 のうちのいずれか 1 つ、または

v. 配列番号 8、22、35、39、73、84、100、105、113、145 のうちのいずれか 1 つを含む、ガイド配列と、

b. ヘアピン領域を含む s g R N A の保存部分であって、前記ヘアピン領域が、少なくとも 5 ～ 10 個のヌクレオチドを欠失しており、任意選択で、前記短い s g R N A が、5' 末端修飾および 3' 末端修飾のうちの 1 つ以上を含む、保存部分と、を含む、組成物。

【請求項 11】

配列番号 202 の配列を含む、請求項 10 に記載の組成物。

10

【請求項 12】

5' 末端修飾を含む、請求項 10 または請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記短い s g R N A が、3' 末端修飾を含む、請求項 10 ～ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記短い s g R N A が、5' 末端修飾および 3' 末端修飾を含む、請求項 10 ～ 13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記短い s g R N A が、3' テールをさらに含む、請求項 10 ～ 14 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 16】

前記 3' テールが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のヌクレオチドを含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記 3' テールが、約 1 ～ 2、1 ～ 3、1 ～ 4、1 ～ 5、1 ～ 7、1 ～ 10、少なくとも 1 ～ 2、少なくとも 1 ～ 3、少なくとも 1 ～ 4、少なくとも 1 ～ 5、少なくとも 1 ～ 7、または少なくとも 1 ～ 10 個のヌクレオチドを含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記短い s g R N A が、3' テールを含まない、請求項 10 ～ 17 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 19】

前記ヘアピン領域内に修飾を含む、請求項 10 ～ 18 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

3' 末端修飾と、前記ヘアピン領域内の修飾と、を含む、請求項 10 ～ 19 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

3' 末端修飾と、前記ヘアピン領域内の修飾と、5' 末端修飾と、を含む、請求項 10 ～ 20 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

5' 末端修飾と、前記ヘアピン領域内の修飾と、を含む、請求項 10 ～ 21 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 23】

前記ヘアピン領域が、少なくとも 5 個の連続ヌクレオチドを欠失している、請求項 10 ～ 22 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 24】

前記少なくとも 5 ～ 10 個の欠失しているヌクレオチドが、

a. ヘアピン 1 内にある、

b. ヘアピン 1 およびヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」内にある、

c. ヘアピン 1 およびヘアピン 1 の直ぐ 3' 側の 2 個のヌクレオチド内にある、

50

- d. ヘアピン 1 の少なくとも一部を含む、
- e. ヘアピン 2 内にある、
- f. ヘアピン 2 の少なくとも一部を含む、
- g. ヘアピン 1 およびヘアピン 2 内にある、
- h. ヘアピン 1 の少なくとも一部を含み、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」を含む、
- i. ヘアピン 2 の少なくとも一部を含み、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」を含む、
- j. ヘアピン 1 の少なくとも一部を含み、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」を含み、ヘアピン 2 の少なくとも一部を含む、
- k. ヘアピン 1 もしくはヘアピン 2 内にあり、任意選択で、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」を含む、
- l. 連続している、
- m. 連続しており、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」を含む、
- n. 連続しており、少なくともヘアピン 1 の一部およびヘアピン 2 の一部に及ぶ、
- o. 連続しており、ヘアピン 1 の少なくとも一部およびヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」に及ぶ、
- p. 連続しており、ヘアピン 1 の少なくとも一部およびヘアピン 1 の直ぐ 3' 側の 2 個のヌクレオチドに及ぶ、
- q. 5～10 個のヌクレオチドからなる、
- r. 6～10 個のヌクレオチドからなる、
- s. 5～10 個の連続ヌクレオチドからなる、
- t. 6～10 個の連続ヌクレオチドからなる、または
- u. 配列番号 400 のヌクレオチド 54～58 からなる、請求項 10～23 のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

【請求項 25】

ネクサス領域を含む s g R N A の保存部分を含み、前記ネクサス領域が、少なくとも 1 個のヌクレオチドを欠失している、請求項 10～24 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 26】

- 前記ネクサス領域内で欠失している前記ヌクレオチドが、
- a. 前記ネクサス領域内の少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のヌクレオチド、
- b. 前記ネクサス領域内の少なくともまたは正確に 1～2 個のヌクレオチド、1～3 個のヌクレオチド、1～4 個のヌクレオチド、1～5 個のヌクレオチド、1～6 個のヌクレオチド、1～10 個のヌクレオチド、または 1～15 個のヌクレオチド、および
- c. 前記ネクサス領域内の各ヌクレオチドのうちのいずれか 1 つ以上を含む、請求項 25 に記載の組成物。

30

【請求項 27】

修飾シングルガイド RNA (s g R N A) を含む組成物であって、

- a. ガイド配列であって、
- i. 配列番号 1～146 から選択されるガイド配列のいずれか 1 つ、または
- ii. 配列番号 1～146 から選択されるガイド配列のいずれか 1 つの少なくとも 17、18、19、または 20 個の連続ヌクレオチド、または
- iii. 配列番号 1～146 から選択される配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または 90% 同一であるか、または
- iv. 配列番号 4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145 のうちのいずれか 1 つ、または
- v. 配列番号 8、22、35、39、73、84、100、105、113、145 のうちのいずれか 1 つを含む、ガイド配列を含み、さらに、

40

50

b. 以下

1. 1つ以上のガイド領域 Y A 部位における Y A 修飾、
2. 1つ以上の保存領域 Y A 部位における Y A 修飾、
3. 1つ以上のガイド領域 Y A 部位および1つ以上の保存領域 Y A 部位における Y A 修飾、
4. i) 2つ以上のガイド領域 Y A 部位における Y A 修飾、
 ii) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および10のうちの1つ以上における Y A 修飾、ならびに
 iii) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 のうちの1つ以上における Y A 修飾、または
5. i) 1つ以上のガイド領域 Y A 部位における Y A 修飾であって、前記ガイド領域 Y A 部位が、5'末端部の5'末端から8番目のヌクレオチド、またはその後にある、Y A 修飾、
 ii) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および10のうちの1つ以上における Y A 修飾、ならびに任意選択で、
 iii) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 のうちの1つ以上における Y A 修飾、または
6. i) 1つ以上のガイド領域 Y A 部位における Y A 修飾であって、前記ガイド領域 Y A 部位が、前記ガイド領域の3'末端部ヌクレオチドの13個のヌクレオチド内にある、Y A 修飾、
 ii) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および10のうちの1つ以上における Y A 修飾、ならびに
 iii) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 のうちの1つ以上における Y A 修飾、または
7. i) 5'末端修飾および3'末端修飾、
 ii) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および10のうちの1つ以上における Y A 修飾、ならびに
 iii) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 のうちの1つ以上における Y A 修飾、または
8. i) ガイド領域 Y A 部位における Y A 修飾であって、前記ガイド領域 Y A 部位の前記修飾が、前記ガイド領域 Y A 部位の5'に位置する少なくとも1個のヌクレオチドが含まない修飾を含む、Y A 修飾
 ii) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および10のうちの1つ以上における Y A 修飾、ならびに
 iii) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 のうちの1つ以上における Y A 修飾、または
9. i) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および10のうちの1つ以上における Y A 修飾、ならびに
 ii) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 における Y A 修飾、または
10. i) 1つ以上のガイド領域 Y A 部位における Y A 修飾であって、前記 Y A 部位が、前記5'末端部の8番目のヌクレオチド、またはその後にある、Y A 修飾、
 ii) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および10のうちの1つ以上における Y A 修飾、ならびに
 iii) H1-1 および H2-1 のうちの1つ以上における修飾、または
11. i) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および10のうちの1つ以上における Y A 修飾、ii) 保存領域 Y A 部位 1、5、6、7、8、および9のうちの1つ以上における Y A 修飾、ならびに iii) H1-1 および H2-1 のうちの1つ以上における修飾、または
12. i) Y A 修飾などの、前記5'末端部から6番目のヌクレオチド、またはその後位置する1つ以上のヌクレオチドにおける修飾、
 ii) 1つ以上のガイド配列 Y A 部位における Y A 修飾、
 iii) B3、B4、およびB5のうちの1つ以上における修飾であって、B6が、2'-OMe修飾を含まないか、もしくは2'-OMe以外の修飾を含む、修飾、
 iv) LS10における修飾であって、LS10が、2'-フルオロ以外の修飾を含む、修飾、ならびに／または

10

20

30

40

50

v) N 2、N 3、N 4、N 5、N 6、N 7、N 1 0、もしくはN 1 1における修飾、から選択される1つ以上の修飾を含み、
以下

i. 1つ以上のガイド領域Y A部位におけるY A修飾、
i i. 1つ以上の保存領域Y A部位におけるY A修飾、
i i i. 1つ以上のガイド領域Y A部位および1つ以上の保存領域Y A部位におけるY A修飾、

i v. 前記5'末端部の前記5'末端からのヌクレオチド8～11、13、14、17、または18のうちの少なくとも1つが、2'-フルオロ修飾を含まない、

v. 前記5'末端部の前記5'末端からのヌクレオチド6～10のうちの少なくとも1つが、ホスホロチオエート連結を含まない、

v i. B 2、B 3、B 4、もしくはB 5のうちの少なくとも1つが、2'-OMe修飾を含まない、

v i i. L S 1、L S 8、もしくはL S 10のうちの少なくとも1つが、2'-OMe修飾を含まない、

v i i i. N 2、N 3、N 4、N 5、N 6、N 7、N 1 0、N 1 1、N 1 6、もしくはN 1 7のうちの少なくとも1つが、2'-OMe修飾を含まない、

i x. H 1-1が、修飾を含む、

x. H 2-1が、修飾を含む、または

x i. H 1-2、H 1-3、H 1-4、H 1-5、H 1-6、H 1-7、H 1-8、H 1-9、H 1-10、H 2-1、H 2-2、H 2-3、H 2-4、H 2-5、H 2-6、H 2-7、H 2-8、H 2-9、H 2-10、H 2-11、H 2-12、H 2-13、H 2-14、もしくはH 2-15のうちの少なくとも1つが、ホスホロチオエート連結を含まない、のうちの少なくとも1つが真である、組成物。

【請求項28】

配列番号450を含む、請求項27に記載の組成物。

【請求項29】

細胞または対象において前記H A O 1遺伝子内で二本鎖切断(D S B)または一本鎖切断を誘導するために使用するための、請求項9～28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項30】

細胞または対象において前記H A O 1遺伝子の発現を低減するために使用するための、請求項9～28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項31】

対象においてP H 1を治療または予防するために使用するための、請求項9～28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項32】

対象において血清および／または血漿グリコレート濃度を高める際に使用するための、請求項9～28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項33】

対象において尿オキサレート濃度を低減するために使用するための、請求項9～28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項34】

オキサレート産生、臓器におけるシュウ酸カルシウム沈着、高シュウ酸尿症、全身性シュウ酸症を含むシュウ酸症、血尿、末期腎疾患(E S R D)を治療もしくは予防する、および／または腎臓もしくは肝臓移植の必要性を遅らせるか、もしくは改善する際に使用するための、請求項9～28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項35】

さらに、

a. 細胞または対象において前記H A O 1遺伝子内で二本鎖切断(D S B)を誘導すること、

10

20

30

40

50

- b. 細胞または対象において前記H A O 1 遺伝子の発現を低減すること、
- c. 対象においてP H 1 を治療または予防すること、
- d. 対象において血清および／または血漿グリコレート濃度を高めること、
- e. 対象において尿オキサレート濃度を低減すること、
- f. オキサレート産生を低減すること、
- g. 臓器におけるシュウ酸カルシウム沈着を低減すること、
- h. 高シュウ酸尿症を低減すること、
- i. 全身性シュウ酸症を含むシュウ酸症を治療または予防すること、
- j. 血尿を治療または予防すること、
- k. 末期腎疾患（E S R D）を予防すること、および／または

10

l. 腎臓または肝臓移植の必要性を遅らせるか、または改善すること、を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】

前記組成物が、血清および／または血漿グリコレートレベルを高める、請求項1～8または請求項29～35のいずれか一項に記載の方法または使用するための組成物。

【請求項37】

前記組成物が、前記H A O 1 遺伝子の編集を引き起こす、請求項1～8または請求項29～35のいずれか一項に記載の方法または使用するための組成物。

【請求項38】

前記編集が、編集される集団の割合（編集率）として計算される、請求項37に記載の方法または使用するための組成物。

20

【請求項39】

前記編集率が、前記集団の30～99%である、請求項38に記載の方法または使用するための組成物。

【請求項40】

前記編集率が、前記集団の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%である、請求項38に記載の方法または使用するための組成物。

【請求項41】

前記組成物が、尿オキサレート濃度を低減する、請求項1～8または請求項29～35のいずれか一項に記載の方法または使用するための組成物。

30

【請求項42】

尿オキサレートの減少が、腎臓結石および／または腎臓、肝臓、膀胱、心臓、皮膚、または眼におけるシュウ酸カルシウム沈着を減少させる、請求項41に記載の方法または使用するための組成物。

【請求項43】

前記ガイド配列が、

- a. 配列番号1～146、
- b. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145、および
- c. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145から選択される、請求項1～42のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

40

【請求項44】

前記組成物が、

- a. 配列番号151～168のうちのいずれか1つ、または
- b. 配列番号251～268のうちのいずれか1つ、または
- c. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145から選択されるガイド配列、または

50

d. 配列番号 8、22、35、39、73、84、100、105、113、145 から選択されるガイド配列、を含む sgRNA を含む、請求項 1～43 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 45】

前記標的配列が、前記ヒト HAO1 遺伝子のエクソン 1、3、4、5、6、または 8 の中にある、請求項 1～44 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 46】

前記標的配列が、前記ヒト HAO1 遺伝子のエクソン 1 の中にある、請求項 45 に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

10

【請求項 47】

前記標的配列が、前記ヒト HAO1 遺伝子のエクソン 3 の中にある、請求項 45 に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 48】

前記標的配列が、前記ヒト HAO1 遺伝子のエクソン 4 の中にある、請求項 45 に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 49】

前記標的配列が、前記ヒト HAO1 遺伝子のエクソン 6 の中にある、請求項 45 に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 50】

前記標的配列が、前記ヒト HAO1 遺伝子のエクソン 8 の中にある、請求項 45 に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

20

【請求項 51】

前記ガイド配列が、HAO1 のプラス鎖内の標的配列に対して相補的である、請求項 1～50 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 52】

前記ガイド配列が、HAO1 のマイナス鎖内の標的配列に対して相補的である、請求項 1～50 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 53】

前記第 1 のガイド配列が、前記 HAO1 遺伝子の前記プラス鎖内の第 1 の標的配列に対して相補的であり、前記組成物が、前記 HAO1 遺伝子の前記マイナス鎖内の第 2 の標的配列に対して相補的である第 2 のガイド配列をさらに含む、請求項 1～50 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

30

【請求項 54】

前記ガイド RNA が、配列番号 1～146 のうちのいずれか 1 つから選択されるガイド配列を含み、配列番号 200 のヌクレオチド配列をさらに含み、前記配列番号 200 のヌクレオチドが、その 3' 末端にある前記ガイド配列の後にある、請求項 1～53 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 55】

前記ガイド RNA が、配列番号 1～146 のうちのいずれか 1 つから選択されるガイド配列を含み、配列番号 201、配列番号 202、配列番号 203、または配列番号 400～450 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列をさらに含み、前記配列番号 201、配列番号 202、配列番号 203、または配列番号 400～450 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチドが、その 3' 末端にある前記ガイド配列の後にある、請求項 1～54 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

40

【請求項 56】

前記ガイド RNA が、シングルガイド (sgRNA) である、請求項 1～55 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 57】

前記 sgRNA が、配列番号 4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、

50

84、100、105、113、117、129、または145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、請求項56に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項58】

前記sgRNAが、配列番号151～168または251～268のうちのいずれか1つを含む、請求項56に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項59】

前記ガイドRNAが、配列番号300のパターンに従って修飾され、前記Nが、まとめて、表1のガイド配列（配列番号1～146）のうちのいずれか1つである、請求項1～58のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

10

【請求項60】

配列番号300の各Nが、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、前記Nが、前記ガイド配列を形成し、前記ガイド配列が、前記HAO1遺伝子に対してCas9を標的とする、請求項59に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項61】

前記sgRNAが、配列番号1～146の前記ガイド配列、および配列番号201、配列番号202、もしくは配列番号203の前記ヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む、請求項1～60のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項62】

前記sgRNAが、配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、請求項1～61のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

20

【請求項63】

前記sgRNAが、配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145、151～168、および251～268から選択される配列を含む、請求項62に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項64】

前記ガイドRNAが、少なくとも1つの修飾を含む、請求項1～63のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

30

【請求項65】

前記少なくとも1つの修飾が、2'-O-メチル（2'-O-Me）修飾ヌクレオチドを含む、請求項64に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項66】

ヌクレオチドの間にホスホロチオエート（PS）結合を含む、請求項63～65のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項67】

2'-フルオロ（2'-F）修飾ヌクレオチドを含む、請求項63～66のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項68】

前記ガイドRNAの5'末端での最初の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上における修飾を含む、請求項63～67のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

40

【請求項69】

前記ガイドRNAの3'末端での最後の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上における修飾を含む、請求項63～68のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項70】

前記ガイドRNAの最初の4個のヌクレオチドの間にPS結合を含む、請求項63～69のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

50

【請求項 7 1】

前記ガイドRNAの最後の4個のヌクレオチドの間にPS結合を含む、請求項63～70のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 7 2】

前記ガイドRNAの5'末端での最初の3個のヌクレオチドに2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む、請求項63～71のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 7 3】

前記ガイドRNAの3'末端での最後の3個のヌクレオチドに2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む、請求項63～72のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

10

【請求項 7 4】

前記ガイドRNAが、配列番号300の修飾ヌクレオチドを含む、請求項63～73のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 7 5】

前記組成物が、薬学的に許容可能な賦形剤をさらに含む、請求項1～74のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 7 6】

前記ガイドRNAが、脂質ナノ粒子(LNP)と会合している、請求項1～75のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

20

【請求項 7 7】

前記LNPが、陽イオン性脂質を含む、請求項76に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 7 8】

前記陽イオン性脂質が、(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエートであり、3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエノエートとも呼ばれる、請求項77に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

30

【請求項 7 9】

前記LNPが、中性脂質を含む、請求項76～78のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 8 0】

前記中性脂質が、DSPCである、請求項79に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 8 1】

前記LNPが、ヘルパー脂質を含む、請求項76～80のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

40

【請求項 8 2】

前記ヘルパー脂質が、コレステロールである、請求項81に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 8 3】

前記LNPが、ステルス脂質を含む、請求項76～82のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 8 4】

前記ステルス脂質が、PEG2k-DMGである、請求項83に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 8 5】

50

前記組成物が、RNAガイドDNA結合剤をさらに含む、請求項1～84のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項86】

前記組成物が、RNAガイドDNA結合剤をコードするmRNAをさらに含む、請求項1～85のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項87】

前記RNAガイドDNA結合剤が、Cas9である、請求項85または86に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項88】

前記組成物が、薬学的製剤であり、薬学的に許容可能な担体をさらに含む、請求項1～87のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

10

【請求項89】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号1である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項90】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号2である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項91】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号3である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

20

【請求項92】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号4である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項93】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号5である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項94】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号6である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項95】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号7である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

30

【請求項96】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号8である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項97】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号9である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項98】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号10である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

40

【請求項99】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号11である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項100】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号12である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項101】

配列番号1～146から選択される前記配列が、配列番号13である、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

配列番号 1 ～ 1 4 6 から選択される前記配列が、配列番号 3 0 である、請求項 1 ～ 8 8

【請求項 1 1 9】

【請求項 1 2 0】

【請求項 1 2 1】

10

【請求項 1 2 2】

【請求項 1 2 3】

【請求項 1 2 4】

【請求項 1 2 5】

20

【請求項 1 2 6】

【請求項 1 2 7】

【請求項 1 2 8】

30

【請求項 1 2 9】

【請求項 1 3 0】

【請求項 1 3 1】

40

【請求項 1 3 2】

【請求項 1 3 3】

【請求項 1 3 4】

【請求項 1 3 5】

配列番号 1 ～ 146 から選択される前記配列が、配列番号 63 である、請求項 1 ～ 88 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

配列番号 1 ~ 1 4 6 から選択される前記配列が、配列番号 8 0 である、請求項 1 ~ 8 8

【請求項 1 6 9】

【請求項 1 7 0】

【請求項 171】

10

【請求項 1 7 2】

【請求項 1 7 3】

【請求項 1 7 4】

【請求項 1 7 5】

20

【請求項 1 7 6】

【請求項 1 7 7】

【請求項 1 7 8】

30

【請求項 179】

【請求項 180】

【請求項 181】

40

【請求項 182】

【請求項 183】

【請求項 184】

【請求項 185】

配列番号 1～146 から選択される前記配列が、配列番号 113 である、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

50

【請求項 2 1 9】

【請求項 2 2 0】

【請求項 2 2 1】

10

【請求項 2 2 2】

【請求項 2 2 3】

【請求項 2 2 4】

【請求項 2 2 5】

20

【請求項 2 2 6】

【請求項 2 2 7】

【請求項 2 2 8】

30

【請求項 2 2 9】

【請求項 2 3 0】

【請求項 2 3 1】

40

【請求項 2 3 2】

【請求項 2 3 3】

【請求項 2 3 4】

【請求項 2 3 5】

配列番号 1 ～ 1 4 6 から選択される前記配列が、配列番号 1 4 6 である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 3 6】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 5 1 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 3 7】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 5 2 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 3 8】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 5 3 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。 10

【請求項 2 3 9】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 5 4 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 4 0】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 5 5 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 4 1】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 5 6 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。 20

【請求項 2 4 2】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 5 7 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 4 3】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 5 8 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 4 4】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 5 9 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 4 5】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 6 0 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。 30

【請求項 2 4 6】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 6 1 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 4 7】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 6 2 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 4 8】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 6 3 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。 40

【請求項 2 4 9】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 6 4 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 5 0】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 6 5 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 5 1】

前記ガイド RNA が、配列番号 2 6 6 を含む s g RNA である、請求項 1 ～ 8 8 のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。 50

【請求項 2 5 2】

前記ガイドRNAが、配列番号267を含むsgRNAである、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 5 3】

前記ガイドRNAが、配列番号268を含むsgRNAである、請求項1～88のいずれか一項に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

【請求項 2 5 4】

前記組成物が、単回用量として投与される、請求項1～253のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 2 5 5】

前記組成物が、一度投与される、請求項1～254のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 2 5 6】

前記単回用量または一度投与が、

- a. DSBを誘導する、および／または
- b. HAO1遺伝子の発現を低減する、および／または
- c. PH1を治療もしくは予防する、および／または
- d. PH1によって引き起こされるESRDを治療もしくは予防する、および／または
- e. シュウ酸カルシウム産生および沈着を治療もしくは予防する、および／または
- f. 高シュウ酸尿症を治療もしくは予防する、および／または
- g. シュウ酸症を治療もしくは予防する、および／または
- h. 血尿を治療もしくは予防する、および／または
- i. 血清グリコレート濃度を高める、および／または
- J. 尿内のオキシレートを低減する、請求項254または255のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 2 5 7】

前記単回用量または一度投与が、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15週間にわたって、a)～j)のうちのいずれか1つ以上を達成する、請求項256に記載の方法または組成物。

【請求項 2 5 8】

前記単回用量または一度投与が、永続的な効果を達成する、請求項256または257に記載の方法または組成物。

【請求項 2 5 9】

永続的な効果を達成することをさらに含む、請求項1～258のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 2 6 0】

前記永続的な効果が、少なくとも1ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも1年、または少なくとも5年持続する、請求項259に記載の方法または組成物。

【請求項 2 6 1】

前記組成物の投与によって、尿内のオキサレートの治療的に関連する減少がもたらされる、請求項1～260のいずれか一項一項に記載の方法または組成物。

【請求項 2 6 2】

前記組成物の投与によって、治療範囲内の尿オキサレートレベルがもたらされる、請求項1～261のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 2 6 3】

前記組成物の投与によって、正常範囲の100、120、または150%以内のオキサレートレベルがもたらされる、請求項1～262のいずれか一項に記載の方法または組成物。

【請求項 2 6 4】

PH1を有するヒト対象を治療するための医薬の調製のための、請求項9～263のい

10

20

30

40

50

ずれかに記載の組成物または製剤の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2018年7月31日に出願された米国仮特許出願第62/712,904号、2018年9月28日に出願された米国仮特許出願第62/738,936号、2019年4月15日に出願された米国仮特許出願第62/834,328号、および2019年5月1日に出願された米国仮特許出願第62/841,734号の利益を主張し、これらは各々、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

10

【背景技術】

【0002】

原発性高シュウ酸尿症1型(PH1)は、オキサレートの蓄積を特徴とする遺伝子障害である。PH1では、AGXT遺伝子によってコードされる酵素アラニングリオキシレートアミノトランスフェラーゼ(AGTまたはAGT1)内に突然変異がみられる。通常、AGTは、肝臓ペルオキシソーム中のグリオキシレートをグリシンに変換する。PH1を患う患者では、変異体AGTは、グリオキシレートを分解することができず、グリオキシレートおよびその代謝産物であるオキサレートのレベルが増加する。ヒトは、オキサレートを酸化することができず、PH1を患う対象における高レベルのオキサレートは、高シュウ酸尿症(尿内の異常に高レベルのオキサレート)を引き起こす。

20

【0003】

PH1では、過剰なオキサレートはまた、カルシウムと組み合わせて、腎臓および他の臓器内でシュウ酸カルシウムを形成し得る。シュウ酸カルシウムの沈着は、シュウ酸カルシウムの広範な沈着(腎石灰化症)または腎臓および膀胱結石の形成(尿路結石症)を生じさせ、腎臓損傷を引き起こすことがある。PH1における一般的な腎臓合併症としては、尿内の血液(血尿)、尿路感染症、腎臓損傷、および末期腎疾患(ESRD)が挙げられる。時間が経つにつれて、PH1を患う患者の腎臓は機能しなくなり始め、オキサレートのレベルが血中で上昇する場合がある。全身の組織中のオキサレートの沈着、例えば、全身性シュウ酸症は、高い血中オキサレートレベルに起因して起こる場合があり、骨、皮膚、および眼における合併症につながる場合がある。PH1を患う患者は、通常、若年齢で腎不全を患い、腎透析または二重腎臓/肝臓臓器移植が唯一の治療選択肢となる。

30

【0004】

ヒドロキシ酸オキシダーゼ1(HAO1、グリコレートオキシダーゼ[GOXまたはGO])としても知られる)は、グリコレートをグリオキシレートに変換する。PH1を患う個体におけるHAO1の阻害が、グリオキシレートの形成を遮断し、過剰なグリコレートが尿を介して排泄されることが提案されてきた。この仮説は、例えば、Salido EC, et al., PNAS 103(48):18249-18254(2006)に記載されるようなノックアウト動物モデルを用いて試験されてきた。PH1の治療のための臨床試験におけるRNAi治療薬であるルマシラン(ALN-GO1)は、HAO1 mRNAを標的とし、初期の臨床試験において、尿オキサレートレベルを下げることを示されている。

40

【0005】

HAO1の阻害によってPH1を治療するという考え方は、HAO1の異常なスプライスバリエントを有するヒト対象が、無症候性グリコール酸尿症を有し、それによって、明らかな腎臓病理を伴わない尿グリコール酸排泄の増加があったことを示すデータによってさらに裏付けられる(Frishberg Y et al., J Med Genet 51(8):526-9(2014)を参照)。したがって、PH1は、HAO1発現の阻害によって、グリオキシレートの産生を遮断することによって、したがって、その代謝産物であるオキサレートの産生を遮断することによって、治療することができる。

【0006】

50

破壊のためにH A O 1を標的とする低分子干渉R N A (s i R N A) ノックダウンまたはアンチセンスノックダウンを使用するアプローチも、現在研究されているが、H A O 1発現の短期間抑制に関する結果は、予備データを奨励することを示しており (L i e b o w e t a l . , J A m S o c N e p h r o l . 2 0 1 7 F e b ; 2 8 (2) : 4 9 4 - 5 0 3 を参照)、H A O 1の長期間続く抑制を生じさせることができる治療の必要性が存在する。本発明は、H A O 1遺伝子をノックアウトするためにC R I S P R / C a s系を使用し、それによってH A O 1タンパク質の産生を低減し、P H 1を患う対象におけるグリオキシレート産生を低減する組成物および方法を提供する。

【0007】

したがって、以下の実施形態が提供される。いくつかの実施形態では、本発明は、C R I S P R / C a s系等のR N AガイドD N A結合剤と共にガイドR N Aを用い、H A O 1遺伝子の発現を実質的に低減するか、またはノックアウトし、それによって、G Oタンパク質の産生を実質的に低減するか、またはなくす組成物および方法を提供する。H A O 1遺伝子の改変によってG Oタンパク質の産生を実質的に低減するか、またはなくすことは、長期的または永続的な治療となり得る。

【発明の概要】

【0008】

以下の実施形態が提供される。

実施形態1 H A O 1遺伝子内で二本鎖切断 (D S B) または一本鎖切断 (S S B) を誘導する方法であって、組成物を細胞に送達することを含み、組成物が、

a. ガイドR N Aであって、

i. 配列番号1～146から選択されるガイド配列、または

i i. 配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

i i i. 配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列、または

i v. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列、または

v. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、ガイドR N Aと、任意選択で、

b. R N AガイドD N A結合剤、またはR N AガイドD N A結合剤をコードする核酸と、を含む、方法。

実施形態2 H A O 1遺伝子の発現を低減する方法であって、組成物を細胞に送達することを含み、組成物が、

a. ガイドR N Aであって、

i. 配列番号1～146から選択されるガイド配列、または

i i. 配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

i i i. 配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列、または

i v. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列、または

v. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、ガイドR N Aと、任意選択で、

b. R N AガイドD N A結合剤、またはR N AガイドD N A結合剤をコードする核酸と、を含む、方法。

実施形態 3 原発性高シュウ酸尿症 1 型 (PH1) を治療または予防する方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、組成物が、

a. ガイド RNA であって、

i. 配列番号 1 ~ 146 から選択されるガイド配列、または

ii. 配列番号 1 ~ 146 から選択される配列の少なくとも 17、18、19、もしくは 20 個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号 1 ~ 146 から選択される配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは 90% 同一であるガイド配列、または

iv. 配列番号 4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列、または

v. 配列番号 8、22、35、39、73、84、100、105、113、145 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列を含む、ガイド RNA と、任意選択で、

b. RNA ガイド DNA 結合剤、または RNA ガイド DNA 結合剤をコードする核酸と、を含み、それによって PH1 を治療または予防する、方法。

実施形態 4 PH1 によって引き起こされる末期腎疾患 (ESRD) を治療または予防する方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、組成物が、

a. ガイド RNA であって、

i. 配列番号 1 ~ 146 から選択されるガイド配列、または

ii. 配列番号 1 ~ 146 から選択される配列の少なくとも 17、18、19、もしくは 20 個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号 1 ~ 146 から選択される配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは 90% 同一であるガイド配列、または

iv. 配列番号 4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列、または

v. 配列番号 8、22、35、39、73、84、100、105、113、145 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列を含む、ガイド RNA と、任意選択で、

b. RNA ガイド DNA 結合剤、または RNA ガイド DNA 結合剤をコードする核酸と、を含み、それによって、PH1 によって引き起こされる (ESRD) を治療または予防する、方法。

実施形態 5 シュウ酸カルシウム産生および沈着、高シュウ酸尿症、シュウ酸症、ならびに血尿のうちのいずれか 1 つを治療または予防する方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、組成物が、

a. ガイド RNA であって、

i. 配列番号 1 ~ 146 から選択されるガイド配列、または

ii. 配列番号 1 ~ 146 から選択される配列の少なくとも 17、18、19、もしくは 20 個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号 1 ~ 146 から選択される配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは 90% 同一であるガイド配列、または

iv. 配列番号 4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列、または

v. 配列番号 8、22、35、39、73、84、100、105、113、145 のうちのいずれか 1 つを含むガイド配列を含む、ガイド RNA と、任意選択で、

b. RNA ガイド DNA 結合剤、または RNA ガイド DNA 結合剤をコードする核酸と、を含み、それによって、シュウ酸カルシウム産生および沈着、高シュウ酸尿症、シュウ

10

20

30

40

50

酸症、ならびに血尿のうちのいずれか1つを治療または予防する、方法。

実施形態6 血清グリコレート濃度を高める方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、組成物が、

a. ガイドRNAであって、

i. 配列番号1～146から選択されるガイド配列、または

ii. 配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列、または

iv. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列、または

v. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、ガイドRNAと、任意選択で、

b. RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、を含み、それによって血清グリコレート濃度を高める、方法。

実施形態7 対象において尿内のオキシレートを低減する方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、組成物が、

a. ガイドRNAであって、

i. 配列番号1～146から選択されるガイド配列、または

ii. 配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列、または

iv. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列、または

v. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、ガイドRNAと、任意選択で、

b. RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、を含み、それによって対象の尿内のオキサレートを低減する、方法。

実施形態8 RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸が投与される、実施形態1～7のいずれか1つに記載の方法。

実施形態9 組成物であって、

a. ガイドRNAであって、

i. 配列番号1～146から選択されるガイド配列、または

ii. 配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列、または

iv. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列、または

v. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、ガイドRNAと、任意選択で、

b. RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、を含む、組成物。

10

20

30

40

50

実施形態 10 短いシングルガイド RNA（短い sgRNA）を含む組成物であって、

a. ガイド配列であって、

i. 配列番号 1～146 から選択されるガイド配列のいずれか 1 つ、または

ii. 配列番号 1～146 から選択されるガイド配列のいずれか 1 つの少なくとも 17、18、19、もしくは 20 個の連続ヌクレオチド、または

iii. 配列番号 1～146 から選択される配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは 90% 同一であるか、または

iv. 配列番号 4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145 のいずれか 1 つ、または

v. 配列番号 8、22、35、39、73、84、100、105、113、145 のいずれか 1 つを含む、ガイド配列と、

b. ヘアピン領域を含む sgRNA の保存部分であって、ヘアピン領域が、少なくとも 5～10 個のヌクレオチドを欠失しており、任意選択で、短い sgRNA が、5' 末端修飾および 3' 末端修飾のうちの 1 つ以上を含む、保存部分と、を含む、組成物。

実施形態 11 配列番号 202 の配列を含む、実施形態 10 に記載の組成物。

実施形態 12 5' 末端修飾を含む、実施形態 10 または実施形態 11 に記載の組成物。

実施形態 13 短い sgRNA が、3' 末端修飾を含む、実施形態 10～12 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 14 短い sgRNA が、5' 末端修飾および 3' 末端修飾を含む、実施形態 10～13 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 15 短い sgRNA が、3' テールをさらに含む、実施形態 10～14 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 16 3' テールが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のヌクレオチドを含む、実施形態 15 に記載の組成物。

実施形態 17 3' テールが、約 1～2、1～3、1～4、1～5、1～7、1～10、少なくとも 1～2、少なくとも 1～3、少なくとも 1～4、少なくとも 1～5、少なくとも 1～7、または少なくとも 1～10 を含む、実施形態 15 に記載の組成物。

実施形態 18 短い sgRNA が、3' テールを含まない、実施形態 10～17 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 19 ヘアピン領域内に修飾を含む、実施形態 10～18 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 20 3' 末端修飾と、ヘアピン領域内の修飾と、を含む、実施形態 10～19 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 21 3' 末端修飾と、ヘアピン領域内の修飾と、5' 末端修飾と、を含む、実施形態 10～20 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 22 5' 末端修飾と、ヘアピン領域内の修飾と、を含む、実施形態 10～21 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 23 ヘアピン領域が、少なくとも 5 個の連続ヌクレオチドを欠失している、実施形態 10～22 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 24 少なくとも 5～10 個の欠失しているヌクレオチドが、

a. ヘアピン 1 内にある、

b. ヘアピン 1 およびヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」内にある、

c. ヘアピン 1 およびヘアピン 1 の直ぐ 3' 側の 2 個のヌクレオチド内にある、

d. ヘアピン 1 の少なくとも一部を含む、

e. ヘアピン 2 内にある、

f. ヘアピン 2 の少なくとも一部を含む、

g. ヘアピン 1 およびヘアピン 2 内にある、

h. ヘアピン 1 の少なくとも一部を含み、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」を含む、

10

20

30

40

50

- i. ヘアピン 2 の少なくとも一部を含み、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」を含む、
 - j. ヘアピン 1 の少なくとも一部を含み、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」を含み、ヘアピン 2 の少なくとも一部を含む、
 - k. ヘアピン 1 もしくはヘアピン 2 内にあり、任意選択で、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」を含む、
 - l. 連続している、
 - m. 連続しており、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」を含む、
 - n. 連続しており、少なくともヘアピン 1 の一部およびヘアピン 2 の一部に及ぶ、
 - o. 連続しており、ヘアピン 1 の少なくとも一部およびヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「N」に及ぶ、
 - p. 連続しており、ヘアピン 1 の少なくとも一部およびヘアピン 1 の直ぐ 3' 側の 2 個のヌクレオチドに及ぶ、
 - q. 5～10 個のヌクレオチドからなる、
 - r. 6～10 個のヌクレオチドからなる、
 - s. 5～10 個の連続ヌクレオチドからなる、
 - t. 6～10 個の連続ヌクレオチドからなる、または
 - u. 配列番号 400 のヌクレオチド 54～58 からなる、実施形態 10～23 のいずれか 1 つに記載の組成物。
- 実施形態 25 ネクサス領域を含む sgRNA の保存部分を含み、ネクサス領域が、少なくとも 1 個のヌクレオチドを欠失している、実施形態 10～24 のいずれか 1 つに記載の組成物。
- 実施形態 26 ネクサス領域内で欠失しているヌクレオチドが、
- a. ネクサス領域内の少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のヌクレオチド、
 - b. ネクサス領域内の少なくともまたは正確に 1～2 個のヌクレオチド、1～3 個のヌクレオチド、1～4 個のヌクレオチド、1～5 個のヌクレオチド、1～6 個のヌクレオチド、1～10 個のヌクレオチド、または 1～15 個のヌクレオチド、および
 - c. ネクサス領域内の各ヌクレオチドのうちのいずれか 1 つ以上を含む、実施形態 25 に記載の組成物。
- 実施形態 27 修飾シングルガイド RNA (sgRNA) を含む組成物であって、
- a. ガイド配列であって、
 - i. 配列番号 1～146 から選択されるガイド配列のいずれか 1 つ、または
 - ii. 配列番号 1～146 から選択されるガイド配列のいずれか 1 つの少なくとも 17、18、19、もしくは 20 個の連続ヌクレオチド、または
 - iii. 配列番号 1～146 から選択される配列に対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは 90% 同一であるか、または
 - iv. 配列番号 4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145 のいずれか 1 つ、または
 - v. 配列番号 8、22、35、39、73、84、100、105、113、145 のいずれか 1 つを含む、ガイド配列を含み、さらに、
 - b. 以下
 - 1. 1 つ以上のガイド領域 YA 部位における YA 修飾、
 - 2. 1 つ以上の保存領域 YA 部位における YA 修飾、
 - 3. 1 つ以上のガイド領域 YA 部位および 1 つ以上の保存領域 YA 部位における YA 修飾、
 - 4. i) 2 つ以上のガイド領域 YA 部位における YA 修飾、
 - ii) 保存領域 YA 部位 2、3、4、および 10 のうちの 1 つ以上における YA 修飾、ならびに

i i i) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、
 5. i) 1 つ以上のガイド領域 Y A 部位における Y A 修飾であって、ガイド領域 Y A 部位が、5'末端部の 5'末端から 8 番目のヌクレオチド、またはその後にある、Y A 修飾、

i i) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および 10 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、ならびに任意選択で、

i i i) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、
 6. i) 1 つ以上のガイド領域 Y A 部位における Y A 修飾であって、ガイド領域 Y A 部位が、ガイド領域の 3'末端部ヌクレオチドの 13 個のヌクレオチド内にある、Y A 修飾、

i i) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および 10 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、ならびに

i i i) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、
 7. i) 5'末端修飾および 3'末端修飾、

i i) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および 10 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、ならびに

i i i) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、
 8. i) ガイド領域 Y A 部位における Y A 修飾であって、ガイド領域 Y A 部位の修飾が、ガイド領域 Y A 部位の 5'に位置する少なくとも 1 個のヌクレオチドが含まない修飾を含む、Y A 修飾、

i i) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および 10 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、ならびに

i i i) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、または
 9. i) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および 10 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、ならびに

i i) 保存領域 Y A 部位 1 および 8 における Y A 修飾、または
 10. i) 1 つ以上のガイド領域 Y A 部位における Y A 修飾であって、Y A 部位が、5'末端部の 8 番目のヌクレオチド、またはその後にある、Y A 修飾、

i i) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および 10 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、ならびに

i i i) H 1-1 および H 2-1 のうちの 1 つ以上における修飾、または
 11. i) 保存領域 Y A 部位 2、3、4、および 10 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、i i) 保存領域 Y A 部位 1、5、6、7、8、および 9 のうちの 1 つ以上における Y A 修飾、ならびに i i i) H 1-1 および H 2-1 のうちの 1 つ以上における修飾、または

12. i) 5'末端部から 6 番目のヌクレオチド、またはその後位置する 1 つ以上のヌクレオチドにおける修飾、例えば、Y A 修飾、

i i) 1 つ以上のガイド配列 Y A 部位における Y A 修飾、
 i i i) B 3、B 4、および B 5 のうちの 1 つ以上における修飾であって、B 6 が、2'-OMe 修飾を含まないか、または 2'-OMe 以外の修飾を含む、修飾、

i v) L S 10 における修飾であって、L S 10 が、2'-フルオロ以外の修飾を含む、修飾、および/または

v) N 2、N 3、N 4、N 5、N 6、N 7、N 10、または N 11 における修飾、から選択される 1 つ以上の修飾を含み、

以下

i. 1 つ以上のガイド領域 Y A 部位における Y A 修飾、
 i i. 1 つ以上の保存領域 Y A 部位における Y A 修飾、
 i i i. 1 つ以上のガイド領域 Y A 部位および 1 つ以上の保存領域 Y A 部位における Y A 修飾、

i v. 5'末端部の 5'末端からのヌクレオチド 8~11、13、14、17、

10

20

30

40

50

または 18 のうちの少なくとも 1 つが、2' -フルオロ修飾を含まない、

v. 5' 末端部の 5' 末端からのヌクレオチド 6 ~ 10 のうちの少なくとも 1 つが、ホスホロチオエート連結を含まない、

vi. B2、B3、B4、もしくは B5 のうちの少なくとも 1 つが、2' -OMe 修飾を含まない、

vii. LS1、LS8、もしくは LS10 のうちの少なくとも 1 つが、2' -OMe 修飾を含まない、

viii. N2、N3、N4、N5、N6、N7、N10、N11、N16、もしくは N17 のうちの少なくとも 1 つが、2' -OMe 修飾を含まない、

ix. H1-1 が、修飾を含む、

x. H2-1 が、修飾を含む、または

xi. H1-2、H1-3、H1-4、H1-5、H1-6、H1-7、H1-8、H1-9、H1-10、H2-1、H2-2、H2-3、H2-4、H2-5、H2-6、H2-7、H2-8、H2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、H2-14、もしくは H2-15 のうちの少なくとも 1 つが、ホスホロチオエート連結を含まない、のうちの少なくとも 1 つが真である、組成物。

実施形態 28 配列番号 450 を含む、実施形態 27 に記載の組成物。

実施形態 29 細胞または対象において HAO1 遺伝子内で二本鎖切断 (DSB) または一本鎖切断を誘導する際に使用するための、実施形態 9 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 30 細胞または対象において HAO1 遺伝子の発現を低減する際に使用するための、実施形態 9 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 31 対象において PH1 を治療または予防する際に使用するための、実施形態 9 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 32 対象において血清および／または血漿グリコレート濃度を高める際に使用するための、実施形態 9 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 33 対象において尿オキサレート濃度を低減する際に使用するための、実施形態 9 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 34 オキサレート産生、臓器におけるシュウ酸カルシウム沈着、高シュウ酸尿症、全身性シュウ酸症を含むシュウ酸症、血尿、末期腎疾患 (ESRD) を治療もしくは予防する、および／または腎臓もしくは肝臓移植の必要性を遅らせるか、もしくは改善する際に使用するための、実施形態 9 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の組成物。

実施形態 35 さらに、

a. 細胞または対象において HAO1 遺伝子内で二本鎖切断 (DSB) を誘導すること、

b. 細胞または対象において HAO1 遺伝子の発現を低減すること、

c. 対象において PH1 を治療または予防すること、

d. 対象において血清および／または血漿グリコレート濃度を高めること、

e. 対象において尿オキサレート濃度を低減すること、

f. オキサレート産生を低減すること、

g. 臓器におけるシュウ酸カルシウム沈着を低減すること、

h. 高シュウ酸尿症を低減すること、

i. 全身性シュウ酸症を含むシュウ酸症を治療または予防すること、

j. 血尿を治療または予防すること、

k. 末期腎疾患 (ESRD) を予防すること、および／または

l. 腎臓または肝臓移植の必要性を遅らせるか、または改善すること、を含む、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 36 組成物が、血清および／または血漿グリコレートレベルを高める、実施形態 1 ~ 8 または 29 ~ 35 のいずれか 1 つに記載の方法または使用するための組成物。

実施形態 37 組成物が、HAO1 遺伝子の編集を引き起こす、実施形態 1 ~ 8 または 2

10

20

30

40

50

9～35のいずれか1つに記載の方法または使用するための組成物。

実施形態38 編集が、編集される集団の割合（編集率）として計算される、実施形態37に記載の方法または使用するための組成物。

実施形態39 編集率が、集団の30～99%である、実施形態38に記載の方法または使用するための組成物。

実施形態40 編集率が、集団の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%である、実施形態38に記載の方法または使用するための組成物。

実施形態41 組成物が、尿オキサレート濃度を低減する、実施形態1～8または実施形態29～35のいずれか1つに記載の方法または使用するための組成物。

実施形態42 尿オキサレートの減少が、腎臓結石および／または腎臓、肝臓、膀胱、心臓、皮膚、または眼におけるシュウ酸カルシウム沈着を減少させる、実施形態41に記載の方法または使用するための組成物。

実施形態43 ガイド配列が、

a. 配列番号1～146、

b. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145、および

c. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145から選択される、実施形態1～42のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態44 組成物が、

a. 配列番号151～168のうちのいずれか1つ、または

b. 配列番号251～268のうちのいずれか1つ、または

c. 配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145から選択されるガイド配列、または

d. 配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145から選択されるガイド配列、を含むsgRNAを含む、実施形態1～43のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態45 標的配列が、ヒトHAO1遺伝子のエクソン1、3、4、5、6、または8の中にある、実施形態1～44のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態46 標的配列が、ヒトHAO1遺伝子のエクソン1の中にある、実施形態45に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態47 標的配列が、ヒトHAO1遺伝子のエクソン3の中にある、実施形態45に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態48 標的配列が、ヒトHAO1遺伝子のエクソン4の中にある、実施形態45に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態49 標的配列が、ヒトHAO1遺伝子のエクソン6の中にある、実施形態45に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態50 標的配列が、ヒトHAO1遺伝子のエクソン8の中にある、実施形態45に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態51 ガイド配列が、HAO1のプラス鎖内の標的配列に対して相補的である、実施形態1～50のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態52 ガイド配列が、HAO1のマイナス鎖内の標的配列に対して相補的である、実施形態1～50のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態53 第1のガイド配列が、HAO1遺伝子のプラス鎖内の第1の標的配列に対して相補的であり、組成物が、HAO1遺伝子のマイナス鎖内の第2の標的配列に対して相補的である第2のガイド配列をさらに含む、実施形態1～50のいずれか1つに記載の

方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 54 ガイドRNAが、配列番号1～146のうちのいずれか1つから選択されるガイド配列を含み、配列番号200のヌクレオチド配列をさらに含み、配列番号200のヌクレオチドが、その3'末端にある前記ガイド配列の後にある、実施形態1～53のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 55 ガイドRNAが、配列番号1～146のうちのいずれか1つから選択されるガイド配列を含み、配列番号201、配列番号202、配列番号203、または配列番号400～450のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列をさらに含み、配列番号201、配列番号202、配列番号203、または配列番号400～450のうちのいずれか1つのヌクレオチドが、その3'末端にあるガイド配列の後にある、実施形態1～54のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 56 ガイドRNAが、シングルガイド (sgRNA) である、実施形態1～55のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 57 sgRNAが、配列番号4、5、6、8、22、35、38、39、56、73、84、100、105、113、117、129、145のうちのいずれか1つを含むガイド配列を含む、実施形態56に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 58 sgRNAが、配列番号151～168または251～268のうちのいずれか1つを含む、実施形態56に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 59 ガイドRNAが、配列番号300のパターンに従って修飾され、Nが、まとめて、表1のガイド配列 (配列番号1～146) のうちのいずれか1つである、実施形態1～58のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 60 配列番号300の各Nが、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、Nが、ガイド配列を形成し、ガイド配列が、HAO1遺伝子に対してCas9を標的とする、実施形態59に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 61 sgRNAが、配列番号1～146のガイド配列のうちのいずれか1つと、配列番号201、配列番号202、または配列番号203のヌクレオチドと、を含み、配列番号201、配列番号202、または配列番号203のヌクレオチドが、その3'末端にあるガイド配列の後にある、実施形態1～60のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 62 sgRNAが、配列番号1～146から選択される配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、実施形態1～61のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 63 sgRNAが、配列番号8、22、35、39、73、84、100、105、113、145、151～168、および251～268から選択される配列を含む、実施形態62に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 64 ガイドRNAが、少なくとも1つの修飾を含む、実施形態1～63のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 65 少なくとも1つの修飾が、2'-O-メチル (2'-O-Me) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態64に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 66 ヌクレオチドの間にホスホロチオエート (PS) 結合を含む、実施形態63～65のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 67 2'-フルオロ (2'-F) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態63～66のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 68 ガイドRNAの5'末端での最初の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上における修飾を含む、実施形態63～67のいずれか1つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 69 ガイドRNAの3'末端での最後の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上における修飾を含む、実施形態63～68のいずれか1つに記載の方法、使用するための

10

20

30

40

50

組成物、または組成物。

実施形態 70 ガイド RNA の最初の 4 個のヌクレオチドの間に P S 結合を含む、実施形態 63 ~ 69 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 71 ガイド RNA の最後の 4 個のヌクレオチドの間に P S 結合を含む、実施形態 63 ~ 70 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 72 ガイド RNA の 5' 末端での最初の 3 個のヌクレオチドに 2'-O-Me 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 63 ~ 71 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 73 ガイド RNA の 3' 末端での最後の 3 個のヌクレオチドに 2'-O-Me 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 63 ~ 72 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

10

実施形態 74 ガイド RNA が、配列番号 300 の修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 63 ~ 73 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 75 組成物が、薬学的に許容可能な賦形剤をさらに含む、実施形態 1 ~ 74 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 76 ガイド RNA が、脂質ナノ粒子 (LNP) と会合している、実施形態 1 ~ 75 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 77 LNP が、陽イオン性脂質を含む、実施形態 76 に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 78 陽イオン性脂質が、(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエートであり、3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエノエートとも呼ばれる、実施形態 77 に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

20

実施形態 79 LNP が、中性脂質を含む、実施形態 76 ~ 78 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 80 中性脂質が、DSPC である、実施形態 79 に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

30

実施形態 81 LNP が、ヘルパー脂質を含む、実施形態 76 ~ 80 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 82 ヘルパー脂質が、コレステロールである、実施形態 81 に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 83 LNP が、ステルス脂質を含む、実施形態 76 ~ 82 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 84 ステルス脂質が、PEG 2k-DMG である、実施形態 83 に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 85 組成物が、RNA ガイド DNA 結合剤をさらに含む、実施形態 1 ~ 84 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

40

実施形態 86 組成物が、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする mRNA をさらに含む、実施形態 1 ~ 85 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 87 RNA ガイド DNA 結合剤が、Cas9 である、実施形態 85 または 86 に記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 88 組成物が、薬学的製剤であり、薬学的に許容可能な担体をさらに含む、実施形態 1 ~ 87 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 89 配列番号 1 ~ 146 から選択される配列が、配列番号 1 である、実施形態 1 ~ 88 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 90 配列番号 1 ~ 146 から選択される配列が、配列番号 2 である、実施形態

50

実施形態 1 1 5 配列番号 1 ～ 1 4 6 から選択される配列が、配列番号 2 7 である、実施

50

実施形態 140 配列番号 1 ~ 146 から選択される配列が、配列番号 52 である、実施

50

実施形態 165 配列番号 1 ~ 146 から選択される配列が、配列番号 77 である、実施

50

実施形態 190 配列番号 1 ~ 146 から選択される配列が、配列番号 102 である、実

50

実施形態 2 1 5 配列番号 1 ~ 1 4 6 から選択される配列が、配列番号 1 2 7 である、美

実施形態 3.4.9. バンド BNA が、配列番号 3.5.5 を含む。BNA である。実施形態 1

50

～ 88 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 241 ガイド RNA が、配列番号 256 を含む sgRNA である、実施形態 1～88 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 242 ガイド RNA が、配列番号 257 を含む sgRNA である、実施形態 1～88 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 243 ガイド RNA が、配列番号 258 を含む sgRNA である、実施形態 1～88 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 244 ガイド RNA が、配列番号 259 を含む sgRNA である、実施形態 1～88 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。

実施形態 245 ガイド RNA が、配列番号 260 を含む sgRNA である、実施形態 1～88 のいずれか 1 つに記載の方法、使用するための組成物、または組成物。 10

実施形態 246 組成物が、単回用量として投与される、実施形態 1～245 のいずれか 1 つに記載の方法または組成物。

実施形態 247 組成物が、一度投与される、実施形態 1～246 のいずれか 1 つに記載の方法または組成物。

実施形態 248 単回用量または一度投与が、

a. DSB を誘導する、および／または

b. HAO1 遺伝子の発現を低減する、および／または

c. PH1 を治療もしくは予防する、および／または

d. PH1 によって引き起こされる ESRD を治療もしくは予防する、および／または 20

e. シュウ酸カルシウム産生および沈着を治療もしくは予防する、および／または

f. 高シュウ酸尿症を治療もしくは予防する、および／または

g. シュウ酸症を治療もしくは予防する、および／または

h. 血尿を治療もしくは予防する、および／または

i. 血清グリコレート濃度を高める、および／または

j. 尿内のオキシレートを低減する、実施形態 246 または 247 のいずれか 1 つに記載の方法または組成物。

実施形態 249 単回用量または一度投与が、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または 15 週間にわたって、a)～j) のうちのいずれか 1 つ以上を達成する、実施形態 248 に記載の方法または組成物。 30

実施形態 250 単回用量または一度投与が、永続的な効果を達成する、実施形態 248 に記載の方法または組成物。

実施形態 251 永続的な効果を達成することをさらに含む、実施形態 1～250 のいずれか 1 つに記載の方法または組成物。

実施形態 252 永続的な効果が、少なくとも 1 ヶ月、少なくとも 3 ヶ月、少なくとも 6 ヶ月、少なくとも 1 年、または少なくとも 5 年持続する、実施形態 251 に記載の方法または組成物。

実施形態 253 組成物の投与によって、尿内のオキサレートの治療的に関連する減少がもたらされる、実施形態 1～252 のいずれか 1 つに記載の方法または組成物。

実施形態 254 組成物の投与によって、治療範囲内の尿オキサレートレベルがもたらされる、実施形態 1～253 のいずれか 1 つに記載の方法または組成物。 40

実施形態 255 組成物の投与によって、正常範囲の 100、120、または 150 % 以内のオキサレートレベルがもたらされる、実施形態 1～254 のいずれか 1 つに記載の方法または組成物。

実施形態 256 PH1 を有するヒト対象を治療するための医薬の調製のための、実施形態 9～255 のいずれかに記載の組成物または製剤の使用。

【0009】

PH1 を有するヒト対象を治療するための医薬の調製のための、上の実施形態のいずれかに記載の組成物または製剤の使用も開示される。PH1 を治療する際に使用するため、または HAO1 遺伝子を修飾する（例えば、その中にインデルを形成する、またはその中 50

にフレームシフトまたはナンセンス突然変異を形成する) 際に使用するための、上の組成物または製剤のいずれかも開示される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1A】HEK293 Cas9 (図1A)、HUH7 (図1B)、およびPCH (図1C) 編集とのPHHにおけるdgRNA編集%の相関を示す。

【図1B】上記と同様。

【図1C】上記と同様。

【図2】HAO1を標的とする特定のdgRNAのオフターゲット分析を示す。

【図3】HAO1を標的とする特定のsgRNAのオフターゲット分析を示す。

【図4】PHHにおけるHAO1を標的とする特定のsgRNAの編集%の用量応答曲線を示す。

【図5】PCHにおけるHAO1を標的とする特定のsgRNAの編集%の用量応答曲線を示す。

【図6】PHHにおけるHAO1を標的とする修飾sgRNA (表2に列举される) のウェスタンブロット分析を示す。

【図7】PCHにおけるHAO1を標的とする修飾sgRNA (表2に列举される) のウェスタンブロット分析を示す。

【図8】HAO1を標的とする修飾sgRNA (表2に列举される) で処理されたPHH由来のGOTタンパク質定量値およびインデル頻度を示す。

【図9】HAO1を標的とする修飾sgRNA (表2に列举される) で処理されたPCH由来のGOTタンパク質定量値およびインデル頻度を示す。

【図10】インビボでのマウスにおける様々な修飾sgRNA (表17に列举される) のHAO1編集率を示す。

【図11】5週間の試験において、インビボでのAGT欠損マウスにおける修飾sgRNA (表17に列举されるG723) を含むLNPで処理した後の尿オキサレートレベルを示す。

【図12】15週間の試験において、インビボでのAGT欠損マウスにおける修飾sgRNAを含むLNPで処理した後の尿オキサレートレベルを示す。

【図13】15週間の試験において、インビボでのAGT欠損マウスにおける修飾sgRNAを含むLNPで処理した後のウェスタンブロット分析を示す。

【図14】表20に示される編集レベルとタンパク質レベルとの間の相関を示す。

【図15】例示的なsgRNA配列 (配列番号201) における10個の保存領域YA部位を1~10でラベリングする。数字25、45、50、56、64、67、および83は、(N)xとして示されるガイド領域を有するsgRNA中のYA部位1、5、6、7、8、9、および10のピリミジンの位置を示し、例えば、xは、任意選択で、20である。

【図16】下部ステム、バルジ、上部ステム、ネクサス (そのヌクレオチドは、5'から3'方向で、それぞれN1~N18と称することができる)、ヘアピン1およびヘアピン2領域を含む、sgRNAの保存領域の個々のヌクレオチドを示すラベルが付けられた、可能な二次構造における例示的なsgRNA (配列番号401、全ての修飾は図示されていない) を示す。ヘアピン1とヘアピン2との間のヌクレオチドは、nとラベリングされる。ガイド領域は、sgRNA上に存在してもよく、この図ではsgRNAの保存領域の前に「(N)x」として示されている。

【発明を実施するための形態】

【0011】

ここで、本発明の特定の実施形態を詳細に参照し、本発明の実施形態の例は添付の図面で例示される。本発明は例示される実施形態と併せて説明されるが、それらは、本発明をそれらの実施形態に限定することを意図するものではないことが理解されるであろう。逆に、本発明は、添付の特許請求の範囲によって定義され、含まれる実施形態によって本発

10

20

30

40

50

明内に含まれ得る全ての代替物、改変物、および均等物を網羅することが意図される。

【0012】

本教示を詳細に説明する前に、本開示は、特定の組成物またはプロセスステップに限定されるものではなく、したがって変化し得ると理解されるべきである。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の参照物を含めることに留意されたい。したがって、例えば、「コンジュゲート(a conjugate)」への言及は、複数のコンジュゲートを含み、「細胞(a cell)」への言及は、複数の細胞を含む等。

【0013】

数値範囲には、その範囲を定義する数値が含まれる。測定値および測定可能な値は、有意な桁および測定に関連する誤差を考慮して、およそその値であると理解される。また、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、「含む(comprising)」、「含有する(contain)」、「含有する(contains)」、「含有する(containing)」、「含む(include)」、「含む(includes)」、および「含む(including)」の使用は、限定することを意図するものではない。上述の概略的な説明と、以下の詳細な説明はいずれも例示であり、単に説明するためのものであり、その教示を限定するものではないことが理解されるべきである。

【0014】

本明細書に特に記載されていない限り、様々な構成要素を「含む(comprising)」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「からなる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素を「含む(comprising)」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「から本質的になる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれらを「含む(comprising)」ものであると想定される(この互換性は、特許請求の範囲におけるこれらの用語の使用には適用されない)。「または」という用語は、文脈が別途明確に示さない限り、包括的な意味で、すなわち、「および/または」に等しい意味で使用される。

【0015】

本明細書で使用される章の見出しは、構成的な目的のみのためであり、所望の主題を決して限定するものとして解釈されるべきではない。参照により組み込まれる任意の材料が、本明細書で定義される任意の用語または本明細書の任意の他の明示的な内容と矛盾する場合、本明細書が優先する。本教示を様々な実施形態と併せて記載するが、本教示をそのような実施形態に限定することを意図するものではない。逆に、本教示は、当業者によって理解されるように、様々な代替、改変物、および均等物を包含する。

【0016】

I. 定義

特に明記しない限り、本明細書で使用される以下の用語および句は、以下の意味を有することを意図する。

【0017】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、骨格に沿って一緒に連結された窒素系複素環式塩基または塩基アナログを有するヌクレオシドまたはヌクレオシドアナログ(従来のRNA、DNA、混合RNA-DNA、およびそれらのアナログであるポリマーを含む)を含む多量体化合物を指すために本明細書で使用される。核酸「骨格」は、糖ホスホジエステル連結、ペプチド-核酸結合(「ペプチド核酸」またはPNA、PCT第WO95/32305号)、ホスホロチオエート連結、メチルホスホネート連結、またはそれらの組み合わせのうちの1つ以上を含む、様々な連結から構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または置換、例えば、2'メトキシまたは2'ハロゲン化物置換

10

20

30

40

50

を有する類似の化合物であり得る。窒素系塩基は、従来の塩基（A、G、C、T、U）、そのアナログ（例えば、5-メトキシウリジン、プソイドウリジン、もしくはN1-メチルプソイドウリジン等の修飾ウリジン）、イノシン、プリンもしくはピリミジンの誘導体（例えば、N⁴-メチルデオキシグアノシン、デアザーもしくはアザープリン、デアザーもしくはアザーピリミジン、5位もしくは6位に置換基を有するピリミジン塩基（例えば、5-メチルシトシン）、2、6、もしくは8位に置換基を有するプリン塩基、2-アミノ-6-メチルアミノプリン、O⁶-メチルグアニン、4-チオーピリミジン、4-アミノ-ピリミジン、4-ジメチルヒドラジン-ピリミジン、およびO⁴-アルキル-ピリミジン、米国特許第5,378,825号およびPCT第WO93/13121号）であってもよい。一般的な考察については、The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36、Adams et al. 編集、11th ed., 1992を参照）。核酸は、骨格がポリマーの位置（複数可）に窒素系塩基を含まない1つ以上の「脱塩基」残基を含み得る（米国特許第5,585,481号）。核酸は、従来のRNAもしくはDNA糖、塩基および連結のみを含んでいてもよく、または従来の構成要素および置換の両方（例えば、2'メトキシ連結を有する従来の塩基、または従来の塩基および1つ以上の塩基アナログの両方を含有するポリマー）を含むことができる。核酸は、RNA模倣糖構造にロックされた二環式フラノース単位を有し、相補的なRNAおよびDNA配列に対するハイブリダイゼーション親和性を高める、1つ以上のLNAヌクレオチドモノマーを含有するアナログである「ロックド核酸」（LNA）を含む（Vester and Wengel, 2004、Biochemistry 43（42）：13233-41）。RNAおよびDNAは異なる糖部分を有し、RNA内のウラシルもしくはそのアナログおよびDNA内のチミンもしくはそのアナログの存在によって異なり得る。

【0018】

「ガイドRNA」、「gRNA」、および単に「ガイド」は、crRNA（CRISPR RNAとしても知られる）、またはcrRNAおよびtrRNAの組み合わせ（tracrRNAとしても知られる）のいずれかを指すために、本明細書で互換的に使用される。crRNAおよびtrRNAは、一本鎖RNA分子（シングルガイドRNA、sgRNA）として会合し得るか、または2つの別々のRNA分子（デュアルガイドRNA、dgRNA）において会合し得る。「ガイドRNA」または「gRNA」は、各種類を指す。trRNAは、天然に存在する配列、または天然に存在する配列と比較して修飾もしくは変異を有するtrRNA配列であり得る。

【0019】

本明細書で使用される場合、「ガイド配列」は、標的配列に対して相補的であり、RNAガイドDNA結合剤による結合または修飾（例えば、開裂）のための標的配列に対してガイドRNAを指向させるように機能する、ガイドRNA内の配列を指す。「ガイド配列」は、「標的化配列」または「スペーサー配列」とも称され得る。ガイド配列は、例えば、Streptococcus pyogenes（すなわち、Spy Cas9）および関連するCas9ホモログ／オルソログの場合、20塩基対の長さであり得る。例えば、15、16、17、18、19、21、22、23、24、または25ヌクレオチド長のような、より短い配列またはより長い配列もまたガイドとして使用できる。例えば、いくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、標的配列は、例えば、遺伝子内または染色体上にあり、例えば、ガイド配列に対して相補的である。いくつかの実施形態では、ガイド配列とそれに対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号1～146から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチドに対して約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する配列を含む。い

くつかの実施形態では、ガイド配列と標的領域とは、100%相補的または同一であってもよい。他の実施形態では、ガイド配列と標的領域とは、少なくとも1個のミスマッチを含有していてもよい。例えば、ガイド配列および標的配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含有していてもよく、標的配列の全長は、少なくとも17、18、19、20個、またはそれ以上の塩基対である。いくつかの実施形態では、ガイド配列および標的領域は、1～4個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、少なくとも17、18、19、20個、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列および標的領域は、1、2、3、または4個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、20個のヌクレオチドを含む。

【0020】

RNAガイドDNA結合剤の核酸基質は二本鎖核酸であるので、RNAガイドDNA結合剤の標的配列は、ゲノムDNAのプラス鎖とマイナス鎖（すなわち、与えられる配列と、配列の逆相補体）の両方を含む。したがって、ガイド配列が、「標的配列に対して相補的」とあると言われる場合、標的配列の逆相補体に結合するようにガイドRNAを指向させ得ると理解されるべきである。したがって、いくつかの実施形態では、ガイド配列が、標的配列の逆相補体に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列におけるUのTへの置換を除いて、標的配列の特定のヌクレオチド（例えばPAMを含まない標的配列）と同一である。

【0021】

本明細書で使用される場合、「RNAガイドDNA結合剤」は、RNAおよびDNA結合活性を有するポリペプチドもしくはポリペプチドの複合体、またはそのような複合体のDNA結合サブユニットを意味し、DNA結合活性は、配列特異的であり、RNAの配列に依存する。例示的なRNAガイドDNA結合剤には、Casクリパーゼ（cleavage）／ニッカーゼおよびその不活性化形態（dCas DNA結合剤）が含まれる。本明細書で使用される「Casタンパク質」とも称される「Casヌクレアーゼ」には、Casクリパーゼ、Casニッカーゼ、およびdCas DNA結合剤が包含される。Casクリパーゼ／ニッカーゼおよびdCas DNA結合剤には、III型CRISPR系のCsmまたはCmr複合体、Cas10、Csm1、またはそのCmr2サブユニット、I型CRISPR系のカスケード複合体、そのCas3サブユニットおよびクラス2Casヌクレアーゼが含まれる。本明細書で使用される場合、「クラス2Casヌクレアーゼ」は、RNAガイドDNA結合活性を有する一本鎖ポリペプチドである。クラス2Casヌクレアーゼには、RNAガイドDNAクリパーゼもしくはニッカーゼ活性をさらに有するクラス2Casクリパーゼ／ニッカーゼ（例えば、H840A、D10A、またはN863Aバリエーション）、ならびに切断／ニッカーゼ活性が不活性化されたクラス2dCas DNA結合剤が含まれる。クラス2Casヌクレアーゼには、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9（例えば、N497A、R661A、Q695A、Q926Aバリエーション）、HypaCas9（例えば、N692A、M694A、Q695A、H698Aバリエーション）、eSPCas9（1.0）（例えば、K810A、K1003A、R1060Aバリエーション）、およびeSPCas9（1.1）（例えば、K848A、K1003A、R1060Aバリエーション）タンパク質、ならびにそれらの修飾が含まれる。Cpf1タンパク質（Zetsche et al., Cell, 163:1-13 (2015)）は、Cas9と相同性であり、RuvC様ヌクレアーゼドメインを含む。ZetscheのCpf1配列は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。例えば、Zetscheの表S1およびS3を参照。例えば、Makarov et al., Nat Rev Microbiol, 13(11):722-36 (2015)、Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015)を参照。

【0022】

本明細書で使用される場合、「リボ核タンパク質」（RNP）または「RNP複合体」は、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casヌクレアーゼ、例えば、Casクリパー

10

20

30

40

50

ゼ、Casニッカーゼ、またはdCas DNA結合剤（例えば、Cas9）と共に含むガイドRNAを指す。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、Cas9等のRNAガイドDNA結合剤を標的配列へと誘導し、ガイドRNAがこれとハイブリダイズし、この薬剤が標的配列と結合する。この薬剤がクリパーゼまたはニッカーゼである場合、結合の後に切断またはニッキングを行うことができる。

【0023】

本明細書で使用される場合、第2の配列に対する第1の配列のアライメントにより、第2の配列の位置の全体でのX%以上が第1の配列によって一致することが示される場合、第1の配列は、第2の配列と「少なくともX%の同一性を有する配列を含む」とみなされる。例えば、配列AAGAは、配列AAGと100%同一性を有する配列を含むが、その理由は、アラインメントは、第2の配列の3つの全ての位置において一致があるという点で100%同一性を与えるからである。RNAとDNAとの間の差（一般に、チミジンをウリジンに交換すること、またはその逆）、および修飾ウリジン等のヌクレオシドアナログの存在は、関連するヌクレオチド（チミジン、ウリジン、または修飾ウリジン等）が同じ相補体（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンの全てについてのアデノシン；別の例は、シトシンおよび5-メチルシトシンであり、これらの両方が相補体としてグアノシンまたは修飾グアノシンを有する）を有する限り、ポリヌクレオチド間の同一性または相補性の差に寄与しない。したがって、例えば、Xがいずれかの修飾ウリジン、例えば、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、または5-メトキシウリジンである配列5'-AXGは、両方とも同じ配列（5'-CAU）に完全に相補的である点において、AUGと100%同一であるとみなされる。例示的なアライメントアルゴリズムは、当該技術分野において周知である、Smith-WatermanおよびNeedleman-Wunschアルゴリズムである。当業者は、アライメントされる配列の所与の対について、どのようなアルゴリズムおよびパラメータ設定の選択が適切であることを理解するであろう。一般的に類似する長さおよび予想される同一性がアミノ酸については50%超の配列、またはヌクレオチドについては75%超の配列に関して、www.ebi.ac.ukウェブサーバでEBIによって提供されるNeedleman-Wunschアルゴリズムインターフェースのデフォルト設定を用いたNeedleman-Wunschアルゴリズムが一般的に適切である。

【0024】

「mRNA」は、DNAではなく、ポリペプチドへと翻訳することができる（すなわち、リボソームおよびアミノアシル化tRNAによる翻訳のための基質として機能し得る）オープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを指すために本明細書で使用される。mRNAは、リボース残基またはそのアナログを含むリン酸糖骨格（例えば、2'-メトキシリボース残基）を含むことができる。いくつかの実施形態では、mRNAリン酸糖骨格の糖は、リボース残基、2'-メトキシリボース残基、またはそれらの組み合わせから本質的になる。

【0025】

本明細書に記載のガイドRNA組成物および方法に有用なガイド配列を、表1および本出願全体に示す。

【0026】

本明細書で使用される場合、「インデル」は、標的核酸内の二本鎖切断（DSB）の部位において挿入されるか、または欠失するかのいずれかである多数のヌクレオチドからなる挿入／欠失突然変異を指す。

【0027】

本明細書で使用される場合、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物（例えば、タンパク質、mRNA、またはその両方）の発現の低減を指す。タンパク質のノックダウンは、目的の組織または細胞集団からタンパク質の総細胞量を検出することによって測定することができる。mRNAのノックダウンを測定する方法は既知であり、目的の組織または細胞集団から単離されたmRNAのシーケンシングを含む。いくつかの実施形態では、「

「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物の発現のいくつかの喪失、例えば、転写される mRNA の量の低減、または細胞集団（組織に見られるもの等のインビボ集団を含む）によって発現されるタンパク質の量の低減を指し得る。

【0028】

本明細書で使用される場合、「ノックアウト」は、細胞における特定のタンパク質の発現の喪失を指す。ノックアウトは、細胞、組織、または細胞集団におけるタンパク質の総細胞量を検出することのいずれかによって測定することができる。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、1つ以上の細胞において（例えば、組織内で見出されるもの等のインビボ集団を含む細胞の集団において）HAO1を「ノックアウトする」。いくつかの実施形態では、ノックアウトは、例えば、インデルによって作製される変異体HAO1タンパク質の形成ではなく、細胞内のHAO1タンパク質の発現の完全な喪失である。本明細書で使用される場合、「HAO1」は、HAO1遺伝子の遺伝子産物であるヒドロキシ酸オキシダーゼ1を指す。ヒト野生型HAO1配列は、NCBI Gene ID: 54363; Ensembl: ENSG00000101323で利用可能である。「GOX」および「GOX1」は、遺伝子シノニム（synonym）である。

【0029】

「原発性高シュウ酸尿症1型（PH1）」は、肝臓ペルオキシソームアラニンーグリオキシレートアミノトランスフェラーゼ（AGT）酵素をコードするAGXT遺伝子の突然変異に起因する常染色体劣性障害である。AGTは、グリオキシレートをグリシンへと代謝する。AGT活性の欠如、またはミトコンドリアに対する誤った標的化は、グリオキシレートからオキサレートへの酸化を可能にし、これは尿にのみ排泄することができる。高いオキサレートレベルによって、シュウ酸カルシウムの結石形成および腎実質損傷が起こり、これにより腎機能の進行的な悪化を引き起こし、最終的には、末期腎疾患を引き起こす。したがって、PH1の特徴は、腎臓および尿路における過剰なオキサレート産生およびシュウ酸カルシウム結晶の沈着である。オキサレートによる腎障害は、細管毒性、腎臓におけるシュウ酸カルシウム沈着、およびシュウ酸カルシウム結石による尿閉塞の組み合わせによって引き起こされる。過剰なオキサレートをもはや効果的に排泄することができないため、腎機能の低下は、疾患を悪化させ、骨、眼、皮膚、および心臓、ならびに重篤な疾病および死を引き起こす他の臓器におけるオキサレートのその後の蓄積および結晶化が起こる。腎不全および末期腎疾患が、特徴である。PH1のための承認された薬学的療法は存在しない。

【0030】

グリコレートオキシダーゼ（GO）は、AGTの上流にある肝臓ペルオキシソーム酵素であり、PH1において進行する病変を潜在的に予防するために、疾患肝臓からオキサレート合成のための基質を枯渇させるための1つの可能な機構である。ヒドロキシ酸オキシダーゼ（HAO1）遺伝子によってコードされるGOは、グリコレートからグリオキシレートへの酸化を触媒する。GO活性の抑制は、グリコレートの蓄積を引き起こしつつ、オキサレート産生を阻害すべきである。オキサレートとは異なり、グリコレートは可溶性であり、尿内に容易に排泄される。したがって、いくつかの実施形態では、GO活性を阻害する方法が提供され、阻害されたら、オキサレート産生が阻害され、グリコレート産生が増加する。

【0031】

グリオキシレートの酸化生成物であるオキサレートは、尿にのみ排泄することができる。尿内の高レベルのオキサレート（「高シュウ酸尿症」）は、PH1の症状である。したがって、尿内のオキサレートの増加は、PH1の症状である。オキサレートは、カルシウムと合わさり、腎臓および膀胱結石の主要な構成要素であるシュウ酸カルシウムを形成し得る。腎臓および他の組織中のシュウ酸カルシウムの沈着は、尿中の血液（血尿）、尿路感染症、腎臓損傷、末期腎疾患等を引き起こす場合がある。時間が経つにつれて、血液中のオキサレートレベルが上昇する場合があります、シュウ酸カルシウムが全身の他の臓器に沈着し得る（シュウ酸症または全身性シュウ酸症）。

【0032】

本明細書で使用される場合、「標的配列」は、gRNAのガイド配列に対して相補性を有する標的遺伝子内の核酸配列を指す。標的配列とガイド配列との相互作用により、RNAガイドDNA結合剤が、標的配列内で結合し、潜在的に（薬剤の活性に応じて）ニックを形成するか、または切断するように指向される。

【0033】

本明細書で使用される場合、「YA部位」は、5'-ピリミジン-アデニン-3'ジヌクレオチドを指す。「保存領域YA部位」は、sgRNAの保存領域内に存在する。「ガイド領域YA部位」は、sgRNAのガイド領域内に存在する。sgRNAにおける非修飾YA部位は、RNAse-A様エンドヌクレアーゼ、例えば、RNAse-Aによる切断を受けやすい場合がある。いくつかの実施形態では、sgRNAは、その保存領域内に約10個のYA部位を含む。いくつかの実施形態では、sgRNAは、その保存領域内に1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のYA部位を含む。例示的な保存領域YA部位を図15に示す。ガイド領域は、任意の数のYA部位を含む任意の配列であり得るため、例示的なガイド領域YA部位は図15に示されていない。いくつかの実施形態では、sgRNAは、図15に示されるYA部位のうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個を含む。いくつかの実施形態では、sgRNAは、以下の位置またはそのサブセットにおいて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のYA部位を含む。LS5-LS6、US3-US4、US9-US10、US12-B3、LS7-LS8、LS12-N1、N6-N7、N14-N15、N17-N18、およびH2-2~H2-3。いくつかの実施形態では、YA部位は修飾を含み、これは、YA部位のうちの少なくとも1個のヌクレオチドが修飾されていることを意味する。いくつかの実施形態では、YA部位のピリミジン（ピリミジン位置とも称される）は、修飾（ピリミジンの糖の直ぐ3'側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、YA部位のアデニン（アデニン位置とも称される）は、修飾（アデニンの糖の直ぐ3'側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、YA部位のピリミジン位置およびアデニン位置は、修飾を含む。

【0034】

本明細書で使用される場合、「治療」は、対象における疾患または障害のための投与または治療の任意の適用を指し、その疾患を阻害すること、その進行を止めること、その疾患の1つ以上の症状を緩和すること、その疾患を治癒させること、またはその疾患の1つ以上の症状の再発を予防することを含む。例えば、PH1の治療は、PH1の症状を緩和することを含んでいてもよい。

【0035】

本明細書で使用される場合、「オキサレートの治療的に関連する減少」または「治療範囲内のオキサレートレベル」という用語は、本明細書で使用される場合、ベースラインと比較して、尿オキサレート排泄の30%を超える減少を意味する。Leumann and Hoppe (1999) Nephrol Dial Transplant 14: 2556-2558 at 2557、second columnを参照。例えば、治療範囲内のオキサレートレベルを達成することは、ベースラインから30%を超える尿オキサレートの減少を意味する。いくつかの実施形態では、「正常なオキサレートレベル」または「正常なオキサレート範囲」は、オキサレート約80~約122 µg/クレアチニンのmg数である。Li et al. (2016) Biochim Biophys Acta 1862 (2): 233-239を参照。いくつかの実施形態では、オキサレートの治療的に関連する減少は、正常値の200%、150%、125%、120%、115%、110%、105%、または100%未満または以下のレベルを達成する。

【0036】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値について許容される誤差を意味し、これは、値がどのように測定または決定されるかに部分的に依存する。

10

20

30

40

50

【0037】

I I. 組成物

A. ガイドRNA (gRNA) を含む組成物

例えば、RNAガイドDNA結合剤（例えば、CRISPR/Cas系）を有するガイドRNAを使用して、HAO1遺伝子内で二本鎖切断（DSB）を誘導するのに有用な組成物が本明細書に提供される。組成物は、PH1を有するか、またはPH1を有する疑いのある対象に投与され得る。組成物は、尿オキサレート出力が増加しているか、または血清グリコレート出力が減少している対象に投与され得る。HAO1遺伝子を標的とするガイド配列を、表1に配列番号1～146で示す。

【0038】

表1に配列番号1～146で示される各々のガイド配列は、crRNAを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでもよく、例えば、その3'末端で、ガイド配列に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。5'から3'への配向で、GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG（配列番号200）。sgRNAの場合、上述のガイド配列は、sgRNAを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでもよく、例えば、ガイド配列の3'末端に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。5'から3'への配向で、GUUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCCGUUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCCGAGUCGGUGCUUUU（配列番号201）またはGUUUUAGAGCUAGAAAAUAGGCUAGUCCCGUUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCCGAGUCGGUGC（配列番号203、4個の末端部のUを含まない配列番号201である）。いくつかの実施形態では、配列番号201の4個の末端部のUは存在しない。いくつかの実施形態では、配列番号201の4個の末端部のUのうちの1、2、または3個のみが存在する。

【0039】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のガイド配列と、ヘアピン領域を含む「sgRNAの保存部分」とを含み、ヘアピン領域が、少なくとも5～10個のヌクレオチドまたは6～10個のヌクレオチドを欠いている、HAO1の短いシングルガイドRNA（HAO1の短いsgRNA）が提供される。特定の実施形態では、HAO1の短いシングルガイドRNAのヘアピン領域は、sgRNAの保存部分を参照して、5～10個のヌクレオチドを欠いている（例えば、表2BのH1-1～H2-15）。特定の実施形態では、HAO1の短いシングルガイドRNAのヘアピン1領域は、sgRNAの保存部分を参照して、5～10個のヌクレオチドを欠いている（例えば、表2BのH1-1～H1-12）。

【0040】

例示的な「sgRNAの保存部分」が表2Aに示されており、表2Aは、S. pyogenes Cas9（「spyCas9」（「spCas9」とも称される））sgRNAの保存領域を示す。1行目は、ヌクレオチドの番号付けを示し、2行目は、配列（例えば、配列番号400）を示し、3行目は、「ドメイン」を示す。Briner et al., Molecular Cell 56:333-339 (2014)は、本明細書で「ドメイン」と呼ばれるsgRNAの機能ドメインを記載しており、標的化を担う「スパーサー」ドメイン、「下部ステム」、「バルジ」、「上部ステム」（テトラループを含んでもよい）、「ネクサス」、ならびに「ヘアピン1」および「ヘアピン2」ドメインを含む。Briner et al. のページ334、図1Aを参照のこと。

【0041】

表2Bは、本明細書で使用するsgRNAのドメインの概略図を提供する。表2Bにおいて、領域間の「n」は、例えば、0～1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上の変数のヌクレオチドを表す。いくつかの実施形態では、nは0に等しい。いくつかの実施形態では、nは1に等しい。

【0042】

いくつかの実施形態では、HAO1 sgRNAは、*S. pyogenes* Cas9（「spyCas9」）またはspyCas9等価物由来である。いくつかの実施形態では、sgRNAは、*S. pyogenes* 由来ではない（「非spyCas9」）。いくつかの実施形態では、5～10個のヌクレオチドまたは6～10個のヌクレオチドが連続している。

【0043】

いくつかの実施形態では、HAO1の短いsgRNAは、表2Aに示されるように、*S. pyogenes* Cas9（「spyCas9」）sgRNAの保存部分の少なくともヌクレオチド54～58（AAAAA）を欠失している。いくつかの実施形態では、HAO1の短いsgRNAは、例えばペアワイズまたは構造アラインメントによって決定されるように、spyCas9の保存部分のヌクレオチド54～58（AAAAA）に対応するヌクレオチドを少なくとも欠失している非spyCas9 sgRNAである。いくつかの実施形態では、非spyCas9 sgRNAは、*Staphylococcus aureus* Cas9（「saCas9」）sgRNAである。

10

【0044】

いくつかの実施形態では、HAO1の短いsgRNAは、spyCas9 sgRNAの保存部分の少なくともヌクレオチド54～61（AAAAAGUG）を欠失している。いくつかの実施形態では、HAO1の短いsgRNAは、spyCas9 sgRNAの保存部分の少なくともヌクレオチド53～60（GAAAAAGU）を欠失している。いくつかの実施形態では、HAO1の短いsgRNAは、例えば、ペアワイズまたは構造アラインメントによって決定されるように、spyCas9 sgRNAの保存部分のヌクレオチド53～60（GAAAAAGU）もしくはヌクレオチド54～61（AAAAAGUG）の4、5、6、7、もしくは8個のヌクレオチド、または非spyCas9 sgRNAの保存部分の対応するヌクレオチドを欠いている。

20

【0045】

いくつかの実施形態では、sgRNAは、配列番号1～146のガイド配列のうちのいずれか1つと、crRNAを形成するための追加のヌクレオチドと、を含み、例えば、その3'末端で、ガイド配列に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。5'から3'への配向で、GUUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC（配列番号202）。配列番号202は、以下の野生型ガイドRNA保存配列を参照して、8個のヌクレオチドを欠いている。GUUUUAGAGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC（配列番号203）。

30

【0046】

【表 1 - 1】

表 1 : HAO1 を標的とする対照ガイド配列および染色体座標

ガイド ID	ガイド配列	エクソン ゲノム座標 (hg38)	配列 番号
CR002857	UAAUAGUCAUAUAUAGACUU	エクソン 1 chr20:7940342-7940362	1
CR002858	AAUCAUUGAUACAAAUUAGC	エクソン 1 chr20:7940391-7940411	2
CR002859	AUCAUUGAUACAAAUUAGCC	エクソン 1 chr20:7940392-7940412	3
CR002860	UCAUUGAUACAAAUUAGCCG	エクソン 1 chr20:7940393-7940413	4
CR002861	CAUUGAUACAAAUUAGCCGG	エクソン 1 chr20:7940394-7940414	5
CR002862	AGCCGGGGGAGCAUUUUCAC	エクソン 1 chr20:7940408-7940428	6
CR002863	GGCAAUUGAUGAAGAAACUU	エクソン 1 chr20:7940313-7940333	7
CR002864	AACCUGUGAAAAUUGCUCCCC	エクソン 1 chr20:7940413-7940433	8
CR002865	CACAUGAGCCAUGC GCUGCA	エクソン 2 chr20:7934508-7934528	9
CR002866	GCCGUAGCCCCACACAUAU	エクソン 2 chr20:7934530-7934550	10
CR002867	GAUCUGUUCAGCAACAUUC	エクソン 2 chr20:7934588-7934608	11
CR002868	GCAACAUUCGGAGCAUCCU	エクソン 2 chr20:7934599-7934619	12
CR002869	CAUGCAGCGCAUGGCUCAUG	エクソン 2 chr20:7934510-7934530	13
CR002870	GAUCUGUCGACUUCUGUUU	エクソン 2 chr20:7934572-7934592	14
CR002871	AGCUGUAUCCAAGGAUGCUC	エクソン 2 chr20:7934610-7934630	15
CR002872	CUAGAUGGAAGCUGUAUCCA	エクソン 2 chr20:7934619-7934639	16
CR002873	UGUGUCCACUGUCACAAUA	エクソン 3 chr20:7914225-7914245	17
CR002874	CGCCACUUCUCAAUUGAGG	エクソン 3 chr20:7914351-7914371	18
CR002875	CACUUCUCAAUUGAGGAGG	エクソン 3 chr20:7914354-7914374	19
CR002876	UCAACAUCAUGCCCGUUCCC	エクソン 3 chr20:7914386-7914406	20
CR002877	CAACAUCAUGCCCGUUCCCA	エクソン 3 chr20:7914387-7914407	21
CR002878	GCCCGUCCCAGGGACUGAC	エクソン 3 chr20:7914396-7914416	22
CR002879	ACAGUGGACACACCUUACCU	エクソン 3 chr20:7914217-7914237	23
CR002880	GACAGUGGACACACCUUACC	エクソン 3 chr20:7914218-7914238	24
CR002881	CAAGGCCAUAAUUGUGACAG	エクソン 3 chr20:7914233-7914253	25
CR002882	CUGGUCCUGAGGCACUUCGU	エクソン 3 chr20:7914327-7914347	26
CR002883	CACCUCCUCAAUUGAAGAAG	エクソン 3 chr20:7914356-7914376	27
CR002884	GGGCAUGAUGUUGAGUUCU	エクソン 3 chr20:7914380-7914400	28
CR002885	CGGGCAUGAUGUUGAGUUC	エクソン 3 chr20:7914381-7914401	29
CR002886	GCCUGUCAGUCCUGGGAAC	エクソン 3 chr20:7914400-7914420	30
CR002887	AGCCUGUCAGUCCUGGGAA	エクソン 3 chr20:7914401-7914421	31
CR002888	UUCUCAGCCUGUCAGUCCU	エクソン 3 chr20:7914406-7914426	32

10

20

30

40

【表 1 - 2】

ガイド ID	ガイド配列	エクソン ゲノム座標 (hg38)	配列 番号
CR002889	UUUCUCAGCCUGUCAGUCCC	エクソン 3 chr20:7914407-7914427	33
CR002890	AAAAUGCCCUUUGCAACAAU	エクソン 4 chr20:7906158-7906178	34
CR002891	AGGAGAAAAUGAUAAAGUAC	エクソン 4 chr20:7906289-7906309	35
CR002892	UCAUUGCCAAUUGUUGCAA	エクソン 4 chr20:7906167-7906187	36
CR002893	AUCAUUGCCAAUUGUUGCAA	エクソン 4 chr20:7906168-7906188	37
CR002894	UCAGCUGGGAAGAUUCAAA	エクソン 4 chr20:7906205-7906225	38
CR002895	AAUAGACCCAUCAUACAGCU	エクソン 4 chr20:7906219-7906239	39
CR002896	CAGUGGACUUGCUGCAUAUG	エクソン 4 chr20:7906249-7906269	40
CR002897	UUUUCUCCUGAGGAAAAUUU	エクソン 4 chr20:7906278-7906298	41
CR002898	UACUUUAUCAUUUUCUCCUG	エクソン 4 chr20:7906288-7906308	42
CR002899	CUGCCAAAACUCACAGUGGC	エクソン 5 chr20:7895118-7895138	43
CR002900	GCCAUGUUUAACAGCCUCCC	エクソン 5 chr20:7895192-7895212	44
CR002901	UGGGGCUCGACAACUCGAUG	エクソン 5 chr20:7895146-7895166	45
CR002902	AUGGGGCUCGACAACUCGAU	エクソン 5 chr20:7895147-7895167	46
CR002903	CAUGGGGCUCGACAACUCGA	エクソン 5 chr20:7895148-7895168	47
CR002904	GAUCUUGGUGUCGAAUCAUG	エクソン 5 chr20:7895164-7895184	48
CR002905	GGAUCUUGGUGUCGAAUCAU	エクソン 5 chr20:7895165-7895185	49
CR002906	GGGAUCUUGGUGUCGAAUCA	エクソン 5 chr20:7895166-7895186	50
CR002907	ACAUGGCUUGAAUGGGAUCU	エクソン 5 chr20:7895179-7895199	51
CR002908	CUGUUAACAUGGCUUGAAU	エクソン 5 chr20:7895186-7895206	52
CR002909	GCUGUUAACAUGGCUUGAA	エクソン 5 chr20:7895187-7895207	53
CR002910	GCCAGGGAGGCUGUUAAACA	エクソン 5 chr20:7895196-7895216	54
CR002911	UCCAGGUGAUGAUGCCAGGG	エクソン 5 chr20:7895209-7895229	55
CR002912	CUCUCCAGGUGAUGAUGCCA	エクソン 5 chr20:7895212-7895232	56
CR002913	UCLUCCAGGUGAUGAUGCC	エクソン 5 chr20:7895213-7895233	57
CR002914	UCLUCCCACAAACACAGCCU	エクソン 6 chr20:7885732-7885752	58
CR002915	CULUCCGCACACCCCCGUCC	エクソン 6 chr20:7885788-7885808	59
CR002916	GCGCCAAGGCUGUGUUUGUG	エクソン 6 chr20:7885738-7885758	60
CR002917	GGCGCCAAGGCUGUGUUUGU	エクソン 6 chr20:7885739-7885759	61
CR002918	UGGCGCCAAGGCUGUGUUUG	エクソン 6 chr20:7885740-7885760	62
CR002919	AGCUCUGGCUCUUGGCGCCA	エクソン 6 chr20:7885752-7885772	63
CR002920	GUUCUGAAAGCUCUGGCUCU	エクソン 6 chr20:7885760-7885780	64
CR002921	CACUGAUGUUCUGAAAGCUC	エクソン 6 chr20:7885767-7885787	65

10

20

30

40

【表 1 - 3】

ガイド ID	ガイド配列	エクソン ゲノム座標 (hg38)	配列 番号
CR002922	CUGGACGGGGGUGUGCGGAA	エクソン 6 chr20:7885790-7885810	66
CR002923	UCLUCCUGGACGGGGGUGUG	エクソン 6 chr20:7885795-7885815	67
CR002924	GUGGAAGUCUUCUGGACGG	エクソン 6 chr20:7885802-7885822	68
CR002925	GGUGGAAGUCUUCUGGACG	エクソン 6 chr20:7885803-7885823	69
CR002926	AGGUGGAAGUCUUCUGGAC	エクソン 6 chr20:7885804-7885824	70
CR002927	AAGGUGGAAGUCUUCUGGA	エクソン 6 chr20:7885805-7885825	71
CR002928	AGGGAAGGUGGAAGUCUUC	エクソン 6 chr20:7885809-7885829	72
CR002929	UGUUCUGCCAGAAAUUGUGG	エクソン 6 chr20:7885839-7885859	73
CR002930	UGAUGUUCUGCCAGAAAUUG	エクソン 6 chr20:7885842-7885862	74
CR002931	GGAAGAAUCCGGLUGGCCA	エクソン 7 chr20:7885532-7885552	75
CR002932	AGAUACUAAAGGAAGAAUUC	エクソン 7 chr20:7885542-7885562	76
CR002933	UCACUUGGUUAGGGGGAGAA	エクソン 7 chr20:7885582-7885602	77
CR002934	GCACUGUCAGAUCUUGGAAA	エクソン 8 chr20:7883586-7883606	78
CR002935	CAGAUCUUGGAAACGGCCAA	エクソン 8 chr20:7883593-7883613	79
CR002936	UGUCGAUGACUUUCACAUUC	エクソン 8 chr20:7883636-7883656	80
CR002937	UCAUCGACAAGACAUUGGUG	エクソン 8 chr20:7883625-7883645	81
CR002938	GAAAGUCAUCGACAAGACAU	エクソン 8 chr20:7883630-7883650	82
CR006092	AGUCUAAUAUGACUAAUAC	エクソン 1 chr20:7940341-7940361	83
CR006093	AUAUAUGACUAAUACAGGUC	エクソン 1 chr20:7940336-7940356	84
CR006094	UAUAUGACUAAUACAGGUCU	エクソン 1 chr20:7940335-7940355	85
CR006095	AUAUGACUAAUACAGGUCUG	エクソン 1 chr20:7940334-7940354	86
CR006096	AAAAAAUAAAUUUUCUACC	エクソン 1 chr20:7940266-7940286	87
CR006097	UUUUAUUUUUAAUUCUAGA	エクソン 2 chr20:7934634-7934654	88
CR006098	CGACUUCUGUUUAGGACAG	エクソン 2 chr20:7934565-7934585	89
CR006099	GACUUCUGUUUAGGACAGA	エクソン 2 chr20:7934564-7934584	90
CR006100	GGUCAGCAUGCCAAUAUGUG	エクソン 2 chr20:7934543-7934563	91
CR006101	GUCAGCAUGCCAAUAUGUGU	エクソン 2 chr20:7934542-7934562	92
CR006102	UCAGCAUGCCAAUAUGUGUG	エクソン 2 chr20:7934541-7934561	93
CR006103	CAGCAUGCCAAUAUGUGUGG	エクソン 2 chr20:7934540-7934560	94
CR006104	GCCAAUAUGUGUGGGGGCUA	エクソン 2 chr20:7934534-7934554	95
CR006105	GGCUACGGCCAUGCAGCGCA	エクソン 2 chr20:7934519-7934539	96
CR006106	CAGCGCAUGGCUCAUGUGGA	エクソン 2 chr20:7934506-7934526	97
CR006107	CUUCCUCCUACCUUCACAG	エクソン 2 chr20:7934472-7934492	98

10

20

30

40

【表 1 - 4】

ガイド ID	ガイド配列	エクソン ゲノム座標 (hg38)	配列 番号
CR006108	UUCAALUGAGGAGGUGGCCC	エクソン 3 chr20:7914360-7914380	99
CR006109	CUCCUCAAUUGAAGAAGUGG	エクソン 3 chr20:7914353-7914373	100
CR006110	UUCCGCCACUUCUCAAUUG	エクソン 3 chr20:7914348-7914368	101
CR006111	AUUGAAGAAGUGGCGGAAGC	エクソン 3 chr20:7914346-7914366	102
CR006112	AGUGGCGGAAGCUGGUCCUG	エクソン 3 chr20:7914338-7914358	103
CR006113	UGCAGCCAACGAAGUGCCUC	エクソン 3 chr20:7914319-7914339	104
CR006114	GCUGCAACUGUAUAUCUACA	エクソン 3 chr20:7914305-7914325	105
CR006115	CUAGCUUCUUGGUGACUUCU	エクソン 3 chr20:7914278-7914298	106
CR006116	AAGUCACCAAGAAGCUAGUG	エクソン 3 chr20:7914276-7914296	107
CR006117	CACCAAGAAGCUAGUGCGGC	エクソン 3 chr20:7914272-7914292	108
CR006118	UGCCUGCCGCACUAGCUUCU	エクソン 3 chr20:7914267-7914287	109
CR006119	AGUGCGGCAGGCAGAGAAGA	エクソン 3 chr20:7914260-7914280	110
CR006120	GUGCGGCAGGCAGAGAAGAU	エクソン 3 chr20:7914259-7914279	111
CR006121	GGCAGAGAAGAUGGGCUACA	エクソン 3 chr20:7914251-7914271	112
CR006122	ACCUUACCUGGGCAACCGUC	エクソン 3 chr20:7914206-7914226	113
CR006123	UCCAGACGGUUGCCCAGGUA	エクソン 3 chr20:7914202-7914222	114
CR006124	CAUCAUCCAGACGGUUGCCC	エクソン 3 chr20:7914197-7914217	115
CR006125	UGUUACGCACAUCAUCCAGA	エクソン 3 chr20:7914188-7914208	116
CR006126	CAUGGUUACCUGAGUUGUGG	エクソン 3 chr20:7914154-7914174	117
CR006127	GAUCAUGGUUACCUAGAUUG	エクソン 3 chr20:7914151-7914171	118
CR006128	UCGUCUCCAAAAUUUCCUC	エクソン 4 chr20:7906269-7906289	119
CR006129	GAAAAUUUUGGAGACGACAG	エクソン 4 chr20:7906266-7906286	120
CR006130	CAAUAGACCCAUCUAUCAGC	エクソン 4 chr20:7906220-7906240	121
CR006131	UAUCUUCUCCAGCUGAUAGAU	エクソン 4 chr20:7906210-7906230	122
CR006132	AUAUCUUCUCCAGCUGAUAGA	エクソン 4 chr20:7906209-7906229	123
CR006133	GCGUCUGCCAAAACUCACAG	エクソン 5 chr20:7895114-7895134	124
CR006134	GCCAGAAAUUGUGGAGGCUG	エクソン 6 chr20:7885833-7885853	125
CR006135	UCCACAGCCUCCACAAUUUC	エクソン 6 chr20:7885829-7885849	126
CR006136	GAAAUUGUGGAGGCUGUGGA	エクソン 6 chr20:7885829-7885849	127
CR006137	AAAUUGUGGAGGCUGUGGAA	エクソン 6 chr20:7885828-7885848	128
CR006138	UGUGGAGGCUGUGGAAGGGA	エクソン 6 chr20:7885824-7885844	129
CR006139	GGAGGCUGUGGAAGGGAAGG	エクソン 6 chr20:7885821-7885841	130
CR006140	UUGUGGGGAGACCAAUCGUU	エクソン 6 chr20:7885723-7885743	131

10

20

30

40

【表 1 - 5】

ガイド ID	ガイド配列	エクソン ゲノム座標 (hg38)	配列 番号
CR006141	UGUGGGGAGACCAAUCGUUU	エクソン 6 chr20:7885722-7885742	132
CR006142	GUGGGGAGACCAAUCGUUUG	エクソン 6 chr20:7885721-7885741	133
CR006143	AAAGCUAAGCCCCAAACGAU	エクソン 6 chr20:7885709-7885729	134
CR006144	CAUUCUUUGUCCAGUUAAC	エクソン 6 chr20:7885686-7885706	135
CR006145	UGUAUCUUUUCACUUGGUUA	エクソン 7 chr20:7885591-7885611	136
CR006146	GUAUCUUUUCACUUGGUUAG	エクソン 7 chr20:7885590-7885610	137
CR006147	UAUCUUUUCACUUGGUUAGG	エクソン 7 chr20:7885589-7885609	138
CR006148	AGAUGUCCUCGAGAUACUAA	エクソン 7 chr20:7885553-7885573	139
CR006149	AUUCUCCUUUAGUAUCUCG	エクソン 7 chr20:7885544-7885564	140
CR006150	ACUAAAGGAAGAAUCCGGU	エクソン 7 chr20:7885538-7885558	141
CR006151	CACUCAGAGCCAUGGCCAAC	エクソン 7 chr20:7885520-7885540	142
CR006152	AGUCUACCACUCAGAGCCA	エクソン 7 chr20:7885512-7885532	143
CR006153	AUGUAUGCAUUAUUUUUCA	エクソン 8 chr20:7883664-7883684	144
CR006154	AUUGGUGAGGAAAAAUCCUU	エクソン 8 chr20:7883612-7883632	145
CR006155	UAUUGUGCACUGUCAGAUCU	エクソン 8 chr20:7883580-7883600	146

【 0 0 4 7 】

10

20

【表 2 - 1】

表 2 : H A O 1 を標的とする c r R N A および s g R N A の命名法および配列

ガイド ID (crRNA)	ガイド ID (sgRNA)	sgRNA 配列-非修飾	sgRNA 配列-修飾
CR002864	G009428	AACCUGUGAAAAUGCUC CCGUUUUAGAGCUAGAA UAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 151)	mA*mA*mC*CUUGAAAAUGCUC CCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 251)
CR002929	G009429	UGUUCUGCCAGAAAUUGU GGGUUUUAGAGCUAGAA UAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 152)	mU*mG*mU*CUCUGCCAGAAAU GUGGGUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGUAAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配 列番号 252)
CR002878	G009430	GCCCGUUCCAGGGACUG ACGUUUUAGAGCUAGAA UAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 153)	mG*mC*mC*CGUUCCAGGGACUG ACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号 253)
CR002891	G009431	AGGAGAAAAUGAUAAAGU ACGUUUUAGAGCUAGAA UAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 154)	mA*mG*mG*AGAAAAUGAUAAAG UACGUUUUAGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCAAGUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列 番号 254)

10

20

30

40

【表 2 - 2】

CR002895	G009432	AAUAGACCCAUCUAUCAG CUGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 155)	mA*mA*mU*AGACCCAUCUAUCAG CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番 号 255)	10
CR006093	G009433	AUAUAUGACUAUUACAGG UCGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 156)	mA*mU*mA*UAUGACUAUUACAG GUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列 番号 256)	20
CR006109	G009434	CUCCUCAAUUGAAGAAGU GGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 157)	mC*mU*mC*CUCAAUUGAAGAAG UGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列 番号 257)	30
CR006114	G009435	GCUGCAACUGUAUAUCUA CAGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 158)	mG*mC*mU*GCAACUGUAUAUCU ACAGUUUUAGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列 番号 258)	40

【表 2 - 3】

CR006122	G009436	ACCUUACCUGGGCAACCG UCGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 159)	mA*mC*mC*UUACCUGGGCAACCG UCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番 号 259)	10
CR006154	G009437	AUUGGUGAGGAAAAAUCC UUGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 160)	mA*mU*mU*GGUGAGGAAAAAUC CUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列 番号 260)	20
CR002864	G013964	AACCUGUGAAAAUGCUCC CCGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 161)	mA*mA*mC*mCUG*U*fG*fA*fA*fA AfUfGCUfCfCCcmGUUUFUAGmAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CmAmAGUfUmAfAmAfAmUAmAmG mGmCmUmAGUmCmCGUfUAmUmC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U (配列番号 261)	30
CR002929	G013965	UGUUCUGCCAGAAAUUGU GGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 162)	mU*mG*mU*mUCU*G*fC*fC*fA*fG AfAfAUUfGfUGGmGUUUFUAGmAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CmAmAGUfUmAfAmAfAmUAmAmG mGmCmUmAGUmCmCGUfUAmUmC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U (配列番号 262)	40

【表 2 - 4】

CR002878	G013966	GCCCGUUCCCAGGGACUG ACGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 163)	mG*mC*mC*mCGU*U*fc*fc*fc*fA GfGfGACfUfGACmGUUUfUAGmAm GmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CmAmAGUfUmAfAmAfAmUAmAmG mGmCmUmAGUmCmCGUfUAmUmC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U (配列番号 263)	10
CR002895	G013967	AAUAGACCCAUCU AUCAG CUGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUU (配列番号 164)	mA*mA*mU*mAGA*C*fc*fc*fA*fU CfUfAUC*fAfGCUmGUUUfUAGmA mGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCmAmAGUfUmAfAmAfAmUAmAm GmGmCmUmAGUmCmCGUfUAmUm CmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU (配列番号 264)	20
CR002864	G013968	AACCUGUGAAAAUGCUC CCGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GGCACCGAGUCGGUGC (配 列番号 165)	mA*mA*mC*CUUGUGAAAAUGCUC CCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG GCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (配 列番号 265)	30
CR002929	G013969	UGUUCUGCCAGAAAUUGU GGGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GGCACCGAGUCGGUGC (配 列番号 166)	mU*mG*mU*UCUGCCAGAAAUUG UGGGUUUAGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (配 列番号 266)	40
CR002878	G013970	GCCCGUUCCCAGGGACUG ACGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GGCACCGAGUCGGUGC (配 列番号 167)	mG*mC*mC*CGUUCCCAGGGACUG ACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG GCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (配 列番号 267)	

【表 2 - 5】

CR002895	G013971	AAUAGACCCAUCUAUCAG CUGUUUUAGAGCUAGAAA UAGCAAGUUAUUUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUU GGCACCGAGUCGGUGC (配 列番号 168)	mA*mA*mU*AGACCCAUCUAUCAG CUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAUUUA AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUG GCACCGAGUCGG*mU*mG*mC (配 列番号 268)
----------	---------	--	---

【 0 0 4 8 】

【表 3】

表2A (s p y C a s 9 s g R . N . A の保存部分、配列番号 4 0 0)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
G	U	U	U	U	A	G	A	G	C	U	A	G	A	A	A	U	A	G	C	A	A	G	U	U	A	A	A	A	U
LS1-LS6						B1-B2		US1-US12								B2-B6		LS7-LS12											

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
A	A	G	G	C	U	A	G	U	C	C	G	U	U	A	U	C	A	A	C	U	U	G	A	A	A	A	A	G	U
ネグサス																	111-1~111-12												

61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
G	G	C	A	C	C	G	A	G	U	C	G	G	U	G	C
112-1~112-15															
N															

【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

表 2 B

[illegible]

いくつかの実施形態では、本発明は、ヌクレアーゼ（例えば、Cas9等のCasヌクレアーゼ）であってもよいRNAガイドDNA結合剤を、HAO1中の標的DNA配列に指向させるガイド配列を含む1つ以上のガイドRNA（gRNA）を含む組成物を提供する。gRNAは、表1に示されるガイド配列を含むcrRNAを含み得る。gRNAは、表1に示されるガイド配列の17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドを含む

c r R N Aを含み得る。いくつかの実施形態では、g R N Aは、表1に示されるガイド配列の少なくとも17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドに対して約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する配列を含むc r R N Aを含む。いくつかの実施形態では、g R N Aは、表1に示されるガイド配列に対して約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する配列を含むc r R N Aを含む。g R N Aは、t r R N Aをさらに含み得る。本明細書に記載される各々の組成物および方法の実施形態では、c r R N Aおよびt r R N Aは、シングルRNA (s g R N A) として会合していてもよく、または別個のRNA上にあってもよい (d g R N A)。s g R N Aの文脈において、c r R N Aおよびt r R N Aの構成要素は、例えば、ホスホジエステル結合または他の共有結合を介して共有結合され得る。

10

【0051】

本明細書に記載される各々の組成物、使用および方法の実施形態では、ガイドRNAは、「デュアルガイドRNA」または「d g R N A」として2つのRNA分子を含み得る。d g R N Aは、例えば、表1に示されるガイド配列を含むc r R N Aを含む第1のRNA分子と、t r R N Aを含む第2のRNA分子と、を含む。第1のRNA分子と第2のRNA分子は共有結合していなくてもよいが、c r R N Aとt r R N Aの部分の間の塩基対形成によってRNA二本鎖を形成してもよい。

【0052】

本明細書に記載される各々の組成物、使用および方法の実施形態では、ガイドRNAは、「シングルガイドRNA」または「s g R N A」としてシングルRNA分子を含み得る。s g R N Aは、t r R N Aに共有結合した表1に示されるガイド配列を含むc r R N A (またはその一部)を含み得る。s g R N Aは、表1に示されるガイド配列のも17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、c r R N Aおよびt r R N Aは、リンカーを介して共有結合される。いくつかの実施形態では、s g R N Aは、c r R N Aとt r R N Aの部分の間の塩基対形成によって、ステムループ構造を形成する。いくつかの実施形態では、c r R N Aおよびt r R N Aは、ホスホジエステル結合ではない1つ以上の結合を介して共有結合される。

20

【0053】

いくつかの実施形態では、t r R N Aは、天然に存在するC R I S P R / C a s系由来のt r R N A配列の全てまたは一部を含み得る。いくつかの実施形態では、t r R N Aは、先端切断または修飾された野生型t r R N Aを含む。t r R N Aの長さは、使用されるC R I S P R / C a s系に依存する。いくつかの実施形態では、t r R N Aは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100個より多いヌクレオチドを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、t r R N Aは、例えば1つ以上のヘアピン構造もしくはステムループ構造、または1つ以上のバルジ構造等の特定の二次構造を含み得る。

30

【0054】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号1~146のうちのいずれか1つのガイド配列を含む1つ以上のガイドRNAを含む組成物を提供する。

40

【0055】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号151~168または251~268のうちのいずれか1つを含む1つ以上のs g R N Aを含む組成物を提供する。

【0056】

一態様では、本発明は、配列番号1~146の核酸のうちのいずれかに対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一であるガイド配列を含むg R N Aを含む組成物を提供する。

【0057】

他の実施形態では、組成物は、配列番号1~146のガイド配列のうちのいずれか2つ

50

以上から選択されるガイド配列を含む少なくとも1つ、例えば、少なくとも2つのgRNAを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号1～146の核酸のうちのいずれかに対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一であるガイド配列を各々含む少なくとも2つのgRNAを含む。

【0058】

本発明のガイドRNA組成物は、HAO1遺伝子内の標的配列を認識する（例えばこれに対してハイブリダイズする）ように設計される。例えば、HAO1標的配列は、ガイドRNAを含む提供されるCas開裂によって認識され、切断され得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casクリパーゼは、ガイドRNAをHAO1遺伝子の標的配列に対して指向させてもよく、ガイドRNAのガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casクリパーゼは、標的配列を切断する。

【0059】

いくつかの実施形態では、1つ以上のガイドRNAの選択は、HAO1遺伝子内の標的配列に基づいて決定される。

【0060】

いかなる特定の理論にも拘束されることなく、遺伝子の特定の領域における突然変異（例えば、ヌクレアーゼ媒介性DSBの結果として生じるインデルに起因するフレームシフト変異）は、遺伝子の他の領域における突然変異よりも許容性が低くてもよく、したがって、DSBの位置は、もたらされ得るタンパク質ノックダウンの量または種類における重要な因子である。いくつかの実施形態では、HAO1内の標的配列に対して相補的であるか、または相補性を有するgRNAは、RNAガイドDNA結合剤をHAO1遺伝子内の特定の位置に指向させるために使用される。いくつかの実施形態では、gRNAは、HAO1のエクソン1、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、またはエクソン8内の標的配列に対して相補的であるか、または相補性を有するガイド配列を有するように設計されている。

【0061】

いくつかの実施形態では、ガイド配列は、ヒトHAO1遺伝子内に存在する標的配列に対して少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一である。いくつかの実施形態では、標的配列は、ガイドRNAのガイド配列に対して相補的であり得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNAのガイド配列とそれに対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であり得る。いくつかの実施形態では、標的配列とgRNAのガイド配列とは、100%相補的であるか、または同一であり得る。他の実施形態では、標的配列とgRNAのガイド配列は、少なくとも1個のミスマッチを含んでいてもよい。例えば、標的配列とgRNAのガイド配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含んでいてもよく、ここで、ガイド配列の全長は、約20である。いくつかの実施形態では、標的配列とgRNAのガイド配列は、1～4個のミスマッチを含んでいてもよく、ここで、ガイド配列は、20個のヌクレオチドである。

【0062】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の組成物または製剤は、RNAガイドDNA結合剤、例えば、本明細書に記載のCasヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレーム（ORF）を含むmRNAを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤、例えば、CasヌクレアーゼをコードするORFを含むmRNAが提供されるか、使用されるか、または投与される。

【0063】

B. 修飾gRNAおよびmRNA

いくつかの実施形態では、gRNAは、化学修飾されている。1つ以上の修飾ヌクレオ

10

20

30

40

50

シドまたはヌクレオチドを含む gRNA は、標準的な A、G、C、および U 残基の代わりに、またはそれらに加えて使用される 1 つ以上の非天然および／または天然に存在する成分または構造の存在を記載するために、「修飾」gRNA または「化学修飾」gRNA と呼ばれる。いくつかの実施形態では、修飾 gRNA は、非標準的なヌクレオシドまたはヌクレオチドを用いて合成され、本明細書では「修飾された」と呼ばれる。修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、(i) ホスホジエステル骨格結合における改変、例えば、非架橋のリン酸酸素の 1 つもしくは両方、および／または、架橋リン酸酸素の 1 つ以上の置き換え（例示的な骨格修飾）、(ii) リボース糖の成分、例えば、リボース糖の 2' ヒドロキシルの改変、例えば、置き換え（例示的な糖修飾）、(iii) リン酸部分の「脱リン酸型」リンカーによる大規模な置き換え（例示的な骨格修飾）、(iv) 非標準的な核酸塩基によるものを含め、天然に存在する核酸塩基の修飾または置き換え（例示的な塩基修飾）、(v) リボースリン酸骨格の置き換えまたは修飾（例示的な骨格修飾）、(vi) オリゴヌクレオチドの 3' 末端または 5' 末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾または置き換え、または部分、キャップ、またはリンカーのコンジュゲーション（そのような 3' または 5' のキャップ修飾は、糖および／または骨格の修飾を含み得る）、ならびに (vii) 糖の修飾または置き換え（例示的な糖修飾）の 1 つ以上を含み得る。

10

【0064】

上に列挙されるもの等の化学修飾を組み合わせて、2、3、4、またはそれ以上の修飾を有し得るヌクレオシドおよびヌクレオチド（まとめて「残基」）を含む修飾 gRNA および／または mRNA を提供することができる。例えば、修飾残基は、修飾糖および修飾核酸塩基を有し得る。いくつかの実施形態では、gRNA の各々の塩基は修飾され、例えば、全ての塩基がホスホロチオエート基等の修飾リン酸基を有する。特定の実施形態では、gRNA 分子のリン酸基の全て、または実質的に全てがホスホロチオエート基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、修飾 gRNA は、RNA の 5' 末端において、またはその近傍において少なくとも 1 つの修飾残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾 gRNA は、RNA の 3' 末端において、またはその近傍において少なくとも 1 つの修飾残基を含む。

20

【0065】

いくつかの実施形態では、gRNA は、1、2、3、またはそれ以上の修飾残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾 gRNA 内の位置の少なくとも 5%（例えば、少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100%）が、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドである。

30

【0066】

非修飾核酸は、例えば、細胞内ヌクレアーゼまたは血清中に見られるものによる分解を受けやすい場合がある。例えば、ヌクレアーゼは核酸のホスホジエステル結合を加水分解し得る。したがって、一態様では、本明細書に記載される gRNA は、例えば、細胞内または血清に由来するヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、1 つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾 gRNA 分子は、インビボとエクシボの両方において細胞集団に導入されるとき、低減した自然免疫応答を示し得る。「自然免疫応答」という用語は、サイトカイン（特にインターフェロン）発現および放出の誘導ならびに細胞死を含む、一本鎖核酸を含む外来性核酸に対する細胞応答を含む。

40

【0067】

骨格修飾のいくつかの実施形態では、修飾残基のリン酸基は、1 つ以上の酸素を異なる置換基によって置き換えることによって修飾され得る。さらに、修飾残基、例えば修飾核酸中に存在する修飾残基は、本明細書において記載されるように、非修飾リン酸部分の修飾リン酸基による大規模な置き換えを含み得る。いくつかの実施形態では、リン酸骨格の

50

骨格修飾は、帯電していないリンカーまたは非対称な電荷分布を有する帯電したリンカーのいずれかをもたらし改変を含み得る。

【0068】

修飾リン酸基の例は、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノリン酸、ボラノリン酸エステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、およびホスホトリエステルを含む。非修飾リン酸基中のリン酸原子は、アキラルである。しかしながら、非架橋酸素のうちの1つの、上述の原子または原子群のうちの1つによる置き換えは、リン原子をキラルにすることができる。立体リン原子は、「R」配置（本明細書においてRp）または「S」配置（本明細書においてSp）のいずれかを有し得る。骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素）の、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）による置き換えによってもまた修飾できる。置き換えは、いずれかの架橋酸素または両方の架橋酸素において生じ得る。

10

【0069】

リン酸基は、ある骨格修飾において、非リン含有連結基によって置き換えることができる。いくつかの実施形態では、帯電したリン酸基は、中性部分によって置き換えることができる。リン酸基を置き換えることのできる部分の例は、非限定的に、例えば、メチルホスホン酸、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリナー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ（methylenehydrazo）、メチレンジメチルヒドラゾ（methylenedimethylhydrazo）、メチレンオキシメチルイミノ（methyleneoxymethylimino）を含み得る。

20

【0070】

リン酸リンカーとリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチドの代替物によって置き換えられている核酸を模倣できるスキャフォールドもまた構築できる。そのような修飾は、骨格および糖修飾を含み得る。いくつかの実施形態において、核酸塩基は、代替骨格によって係留され得る。例は、非限定的に、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸（PNA）核酸塩基代替物を含み得る。

【0071】

修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、糖基に対する1つ以上の修飾、すなわち糖修飾を含み得る。例えば、2'ヒドロキシル基（OH）は、修飾されていてもよく、例えば、多くの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基によって置き換えることができる。いくつかの実施形態において、2'ヒドロキシル基に対する修飾は、ヒドロキシルが2'-アルコキシドイオンを形成するようにさらに脱プロトン化されることがもはや起こり得ないので、核酸の安定性を増強し得る。

30

【0072】

2'ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシまたはアリーロキシ（OR、式中「R」がアルキル、シクロアルキル、アリール、アラキル、ヘテロアリール、または糖であり得る）、ポリエチレングリコール（PEG）、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ であって式中Rが、例えば、Hまたは任意選択で置換されたアルキルであり、nが0~20の整数であり得るもの（例えば、0~4、0~8、0~10、0~16、1~4、1~8、1~10、1~16、1~20、2~4、2~8、2~10、2~16、2~20、4~8、4~10、4~16、および4~20）を含み得る。いくつかの実施形態では、2'ヒドロキシル基修飾は、2'-O-Meであり得る。いくつかの実施形態では、2'ヒドロキシル基修飾は、2'-ヒドロキシル基をフッ化物で置き換える2'-フルオロ修飾であり得る。いくつかの実施形態では、2'ヒドロキシル基修飾は、2'ヒドロキシルが、例えばC₁-₆アルキレンまたはC₁-₆ヘテロアルキレン架橋を介して同一のリボース糖の4'炭素へと接続し得る「ロックド」核酸（LNA）を含んでいてもよく、例示的な架橋としては、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋、O-アミノ（

40

50

ここで、アミノは、例えば、 NH_2 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る）、およびアミノアルコキシ、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n$ -アミノ（ここで、アミノは、例えば、 NH_2 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る）を含み得る。いくつかの実施形態では、2'ヒドロキシル基修飾は、リボース環がC2'-C3'結合を欠失している「アンロックド(unlocked)」核酸(UNA)を含み得る。いくつかの実施形態において、2'ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基(MOE)、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)$ 、例えばPEG誘導体)を含み得る。

10

【0073】

「デオキシ」2'修飾は、水素（すなわち、デオキシリボース糖、例えば、部分的なdsRNAの突出部分）、ハロ（例えば、ブromo、クロロ、フルオロ、またはヨード）、アミノ（ここでアミノは、例えば、 NH_2 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸であり得る）、 $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -アミノ（ここでアミノは、例えば、本明細書において記載されるようなものである）、 $-\text{NH}\text{C}(\text{O})\text{R}$ （ここでRは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖であり得る）、シアノ、メルカプト、アルキルチオールアルキル、チオアルコキシ、ならびにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルを含み得、任意選択で、例えば本明細書において記載されるようなアミノによって置換されていてもよい。

20

【0074】

糖修飾は、リボースにおける対応する炭素のものとは反対の立体化学配置を有する1つ以上の炭素を更に含む糖基を含み得る。したがって、修飾核酸は、糖として例えばアラビノースを含むヌクレオチドを含み得る。修飾核酸はまた、脱塩基糖をも含み得る。これらの脱塩基糖はまた、構成要素の糖原子の1つ以上においてさらに修飾され得る。修飾核酸はまた、L型である1つ以上の糖、例えばL-ヌクレオシドを含み得る。

【0075】

修飾核酸に組み込むことのできる本明細書において記載される修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、核酸塩基とも呼ばれる修飾塩基を含み得る。核酸塩基の例は、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、およびウラシル(U)を含むが、これらに限定されない。これらの核酸塩基は、修飾されて、または完全に置き換えられて、修飾核酸に組み込むことのできる修飾残基をもたらしことができる。ヌクレオチドの核酸塩基は、独立して、プリン、ピリミジン、プリンアナログ、またはピリミジンアナログから選択することができる。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、例えば、天然に存在する塩基、および塩基の合成誘導体を含み得る。

30

【0076】

デュアルガイドRNAを用いる実施形態において、crRNAとtracrRNAの各々は、修飾を含み得る。このような修飾は、crRNAおよび/またはtracrRNAの一方または両方の末端に存在してもよい。sgRNAを含む実施形態では、sgRNAの一方または両方の末端における1つ以上の残基は、化学修飾されていてもよく、および/または内部ヌクレオシドが修飾されていてもよく、および/またはsgRNA全体が化学修飾されていてもよい。特定の実施形態は、5'末端修飾を含む。特定の実施形態は、3'末端修飾を含む。

40

【0077】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるガイドRNAは、2017年12月8日に出願された「Chemically Modified Guide RNAs」という発明の名称のWO2018/107028(A1)に開示された修飾パターンの1つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの

50

実施形態では、本明細書において開示されるガイドRNAは、US20170114334号に開示された構造／修飾パターンの1つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、本明細書において開示されるガイドRNAは、WO2017/136794号に開示された構造／修飾パターンの1つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0078】

C. YA修飾

YA部位における修飾（本明細書でYA修飾とも称される）は、ヌクレオシド間連結の修飾、例えば、化学修飾、置換、または他の方法による、塩基（ピリミジンまたはアデニン）の修飾、および／または糖の修飾（例えば、2位での修飾、例えば、2'-O-アルキル、2'-F、2'-mo e、2'-Fアラビノース、2'-H（デオキシリボース）等）であり得る。いくつかの実施形態では、「YA修飾」は、例えば、RNaseによるYA部位の認識もしくは切断を妨害することによって、および／またはRNaseに対する切断部位の接近性を低減するRNA構造（例えば、二次構造）を安定化させることによって、RNAエンドヌクレアーゼ活性を低減するためにジヌクレオチドモチーフの構造を変化させる任意の修飾である。Peacock et al., J Org Chem. 76:7295-7300 (2011)、Behlke, Oligonucleotides 18:305-320 (2008)、Ku et al., Adv. Drug Delivery Reviews 104:16-28 (2016)、Ghidini et al., Chem. Commun., 2013, 49, 9036を参照のこと。Peacock et al., Behlke, KuおよびGhidiniは、YA修飾として好適な例示的な修飾を提供する。エンドヌクレオチド分解を低減するための当業者に既知の修飾が包含される。RNase切断に関与する2'ヒドロキシル基に影響を与える例示的な2'リボース修飾は、2'-Hおよび2'-O-アルキル（2'-O-Meを含む）である。YA部位における残基の二環式リボースアナログUNA、および修飾ヌクレオシド間連結等の修飾は、YA修飾であり得る。RNA構造を安定化させることができる例示的な塩基修飾は、プソイドウリジンおよび5-メチルシトシンである。いくつかの実施形態では、YA部位のうちの少なくとも1個のヌクレオチドが修飾されている。いくつかの実施形態では、YA部位のピリミジン（「ピリミジン位置」とも称される）は、修飾（ピリミジンの糖の直ぐ3'側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾、ピリミジン塩基の修飾、およびリボースの、例えばその2'位での修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、YA部位のアデニン（「アデニン位置」とも称される）は、修飾（ピリミジンの糖の直ぐ3'側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾、ピリミジン塩基の修飾、およびリボースの、例えばその2'位での修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、YA部位のピリミジンおよびアデニンは、修飾を含む。いくつかの実施形態では、YA修飾は、RNAエンドヌクレアーゼ活性を低減する。

【0079】

いくつかの実施形態では、短いsgRNAは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、またはそれ以上のYA部位における修飾を含む。いくつかの実施形態では、YA部位のピリミジンは、修飾（ピリミジンの糖の直ぐ3'側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、YA部位のアデニンは修飾（アデニンの糖の直ぐ3'側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、YA部位のピリミジンおよびアデニンは、糖、塩基、またはヌクレオシド間連結の修飾等の修飾を含む。YA修飾は、本明細書に記載されるいずれかの種類の修飾であり得る。いくつかの実施形態では、YA修飾は、ホスホロチオエート、2'-OMe、または2'-フルオロのうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、YA修飾は、ホスホロチオエート、2'-OMe、または2'-フルオロのうちの1つ以上を含むピリミジン修飾を含む。いくつかの実施形態では、YA修飾は、1つ以上のYA部位を含むRNA二本鎖領域内の二環式リボースアナログ（例えばLNA、BNA、またはENA）を含む。いくつかの実施形態では、YA修飾は、Y

A 部位を含む R N A 二本鎖領域内の二環式リボースアナログ（例えば、L N A、B N A、または E N A）を含み、Y A 修飾は、Y A 部位に対して遠位にある。

【0080】

いくつかの実施形態では、s g R N A は、ガイド領域の Y A 部位修飾を含む。いくつかの実施形態では、ガイド領域は、Y A 修飾を含み得る、1、2、3、4、5 個またはそれ以上の Y A 部位（「ガイド領域 Y A 部位」）を含む。いくつかの実施形態では、5' 末端部の 5' 末端から 5 末端、6 末端、7 末端、8 末端、9 末端、または 10 末端に位置する 1 つ以上の Y A 部位（「5 末端」等は、ガイド領域の 3' 末端に対して 5 位、すなわち、ガイド領域内の最も 3' のヌクレオチドを指す）は、Y A 修飾を含む。いくつかの実施形態では、5' 末端部の 5' 末端から 5 末端、6 末端、7 末端、8 末端、9 末端、または 10 末端に位置する 2 つ以上の Y A 部位が、Y A 修飾を含む。いくつかの実施形態では、5' 末端部の 5' 末端から 5 末端、6 末端、7 末端、8 末端、9 末端、または 10 末端に位置する 3 つ以上の Y A 部位が、Y A 修飾を含む。いくつかの実施形態では、5' 末端部の 5' 末端から 5 末端、6 末端、7 末端、8 末端、9 末端、または 10 末端に位置する 4 つ以上の Y A 部位が、Y A 修飾を含む。いくつかの実施形態では、5' 末端部の 5' 末端から 5 末端、6 末端、7 末端、8 末端、9 末端、または 10 末端に位置する 5 つ以上の Y A 部位が、Y A 修飾を含む。修飾ガイド領域 Y A 部位は、Y A 修飾を含む。

【0081】

いくつかの実施形態では、修飾ガイド領域 Y A 部位は、ガイド領域の 3' 末端部ヌクレオチドの 17、16、15、14、13、12、11、10、または 9 個のヌクレオチド内にある。例えば、修飾ガイド領域 Y A 部位が、ガイド領域の 3' 末端部ヌクレオチドの 10 個のヌクレオチド内にあり、ガイド領域が、20 個のヌクレオチド長である場合、修飾ガイド領域 Y A 部位の修飾ヌクレオチドは、11～20 位のいずれかに位置する。いくつかの実施形態では、Y A 修飾は、ガイド領域の 3' 末端部ヌクレオチドから Y A 部位の 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 個のヌクレオチド内に位置する。いくつかの実施形態では、Y A 修飾は、ガイド領域の 3' 末端部ヌクレオチドから 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 個のヌクレオチドに位置する。

【0082】

いくつかの実施形態では、修飾ガイド領域 Y A 部位は、5' 末端部の 5' 末端からのヌクレオチド 4、5、6、7、8、9、10、または 11 番目、またはその後である。

【0083】

いくつかの実施形態では、修飾ガイド領域 Y A 部位は、5' 末端修飾以外である。例えば、s g R N A は、本明細書に記載の 5' 末端修飾を含んでいてもよく、修飾ガイド領域 Y A 部位をさらに含んでいてもよい。あるいは、s g R N A は、非修飾 5' 末端と、修飾ガイド領域 Y A 部位と、を含むことができる。あるいは、s g R N A は、修飾 5' 末端と、非修飾ガイド領域 Y A 部位と、を含むことができる。

【0084】

いくつかの実施形態では、修飾ガイド領域 Y A 部位は、ガイド領域 Y A 部位の 5' に位置する少なくとも 1 個のヌクレオチドを含まない修飾を含む。例えば、ヌクレオチド 1～3 がホスホロチオエートを含み、ヌクレオチド 4 が 2'-OMe 修飾のみを含み、ヌクレオチド 5 が Y A 部位のピリミジンであり、ホスホロチオエートを含む場合、修飾ガイド領域 Y A 部位は、ガイド領域 Y A 部位の 5' に位置する少なくとも 1 個のヌクレオチド（ヌクレオチド 4）を含まない修飾（ホスホロチオエート）を含む。別の例では、ヌクレオチド 1～3 がホスホロチオエートを含み、ヌクレオチド 4 が Y A 部位のピリミジンであり、2'-OMe を含む場合、修飾ガイド領域 Y A 部位は、ガイド領域 Y A 部位の 5' に位置する少なくとも 1 個のヌクレオチド（ヌクレオチド 1～3 のいずれか）を含まない修飾（2'-OMe）を含む。この条件はまた、非修飾ヌクレオチドが修飾ガイド領域 Y A 部位の 5' に位置する場合には、常に満たされる。

【0085】

いくつかの実施形態では、修飾ガイド領域 Y A 部位は、上の Y A 部位について記載される修飾を含む。

【0086】

ガイド領域 Y A 部位修飾の追加の実施形態は、上記の概要に示される。本開示の他の箇所に記載される任意の実施形態は、実現可能な範囲で、先行実施形態のいずれかと組み合わせ得る。

【0087】

いくつかの実施形態では、s g R N A は、保存領域 Y A 部位修飾を含む。保存領域 Y A 部位 1 ~ 10 を図 15 に示す。いくつかの実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個の保存領域 Y A 部位は、修飾を含む。

10

【0088】

いくつかの実施形態では、保存領域 Y A 部位 1、8、または 1 および 8 は、Y A 修飾を含む。いくつかの実施形態では、保存領域 Y A 部位 1、2、3、4、および 10 は、Y A 修飾を含む。いくつかの実施形態では、Y A 部位 2、3、4、8、および 10 は、Y A 修飾を含む。いくつかの実施形態では、保存領域 Y A 部位 1、2、3、および 10 は、Y A 修飾を含む。いくつかの実施形態では、Y A 部位 2、3、8、および 10 は、Y A 修飾を含む。いくつかの実施形態では、Y A 部位 1、2、3、4、8、および 10 は、Y A 修飾を含む。いくつかの実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、または 8 つの追加の保存領域 Y A 部位は、Y A 修飾を含む。

20

【0089】

いくつかの実施形態では、1、2、3、または 4 つの保存領域 Y A 部位 2、3、4、および 10 は、Y A 修飾を含む。いくつかの実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、または 8 つの追加の保存領域 Y A 部位は、Y A 修飾を含む。

【0090】

いくつかの実施形態では、修飾保存領域 Y A 部位は、上記 Y A 部位について記載される修飾を含む。

【0091】

保存領域 Y A 部位修飾のさらなる実施形態は、上記の概要に示される。本開示の他の箇所に記載される任意の実施形態は、実現可能な範囲で、先行実施形態のいずれかと組み合わせ得る。

30

【0092】

いくつかの実施形態では、s g R N A は、以下の表 3 に示される修飾パターンのいずれかを含み、ここで、N は、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、N の全体は、表 1 で本明細書に記載される H A O 1 ガイド配列を含む。表 3 は、s g R N A のガイド配列部分を示していない。修飾は、ガイドのヌクレオチドに対する N の置換にもかかわらず、表 3 に示されるように残っている。すなわち、ガイドのヌクレオチドは「N」を置き換えるが、表 3 に示されるようにヌクレオチドが修飾される。

【0093】

【表 5 - 1】

表 3 : H A O 1 s g R N A 修飾パターン。ガイド配列は示されず、その 5' 末端に、示される配列を付加する。

配列 番号	名称	配列
400	G000262-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAAAAAGUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU*mU*mU*mU
401	G000263-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
402	G000264-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAmGmAmAmAUAGCAAGUUAUUAAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU* U
403	G000265-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAGAAAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU *mU*U
404	G000266-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC mU*mU*mU*U
405	G000267-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
406	G000331-修飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
407	G000332-修飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
408	G000333-修飾のみ	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U
409	G000334-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAm AmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U

10

20

30

40

【表 5 - 2】

410	G000335-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfA mAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
411	G000336-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAf AmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U
412	G000337-修 飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAA AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU
413	G000338-修 飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAf AfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU
414	G000339-修 飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfA mAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU
415	G000340-修 飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmA AAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU
416	G000341-修 飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAf AfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU
417	G000342-修 飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAf AmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU
418	G000343-修 飾のみ	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

10

20

30

40

【表 5 - 3】

419	G000344-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U
420	G000345-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
421	G000346-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
422	G000347-修 飾のみ	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAmG mUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU
423	G000348-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
424	G000349-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
425	G000350-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
426	G000351-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCm AfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mU
427	G000352-修 飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
428	G000353-修 飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
429	G000354-修 飾のみ	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U

10

20

30

40

【表 5 - 4】

430	G000355-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAm AmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U
431	G000356-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfA mAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU* mU
432	G000357-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAf AmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U
433	G000358-修 飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAA AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU
434	G000359-修 飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAf AfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU
435	G000360-修 飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfA mAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU
436	G000361-修 飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmA AAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU
437	G000362-修 飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAf AfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU
438	G000363-修 飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAf AmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU

10

20

30

40

【表 5 - 5】

439	G000364-修 飾のみ	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
440	G000365-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U
441	G000366-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
442	G000367-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
443	G000368-修 飾のみ	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmG mUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU
444	G000369-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
445	G000370-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
446	G000371-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
447	G000372-修 飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCm AfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mU
450	G013968/G 013969/G01 3970/G0139 71-修飾の み	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

10

20

30

40

【表 5 - 6】

448	G013964/G 013965/G01 3966/-ガイ ド領域修飾 のみ	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNNfNfNNN
449	G013967-ガイ ド領域修 飾のみ	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNN*fNfNNN

10

【0094】

いくつかの実施形態では、修飾 s g R N A は、以下の配列 m N * m N * m N * N N N N N N N N N N N N N N N G U U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U (配列番号 300) を含み、ここで、「N」は、任意の天然または非天然ヌクレオチドであってもよく、Nの全体は、表1に記載される H A O 1 ガイド配列を含む。例えば、本明細書に包含されるのは、配列番号 300 であり、ここで、Nは、表1において本明細書で開示されるガイド配列（配列番号 1 ~ 146）のいずれかに置き換えられる。

20

【0095】

以下に記載される修飾 (m o d i f i f i c a t i o n) のいずれも、本明細書に記載される g R N A および m R N A 内に存在し得る。

【0096】

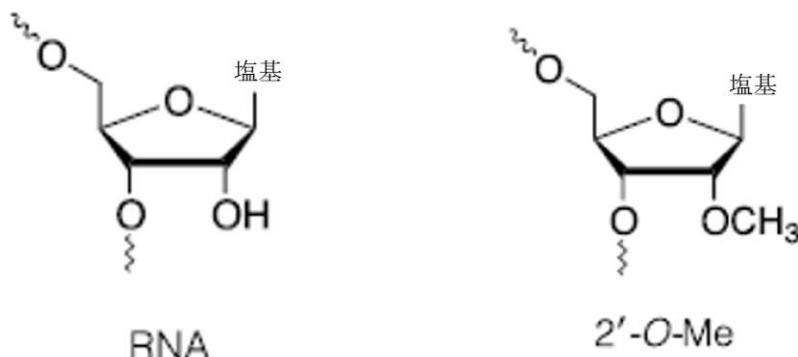
「mA」、「mC」、「mU」、または「mG」という用語は、2'-O-Meによって修飾されているヌクレオチドを表すために使用され得る。

【0097】

2'-O-メチルの修飾は、以下のように描写され得る。

30

【化1】



40

【0098】

ヌクレオチド糖環に影響を及ぼすことが示されている別の化学修飾は、ハロゲン置換である。例えば、ヌクレオチド糖環上の 2'-フルオロ (2'-F) 置換は、オリゴヌクレオチド結合親和性およびヌクレアーゼ安定性を増加させることができる。

【0099】

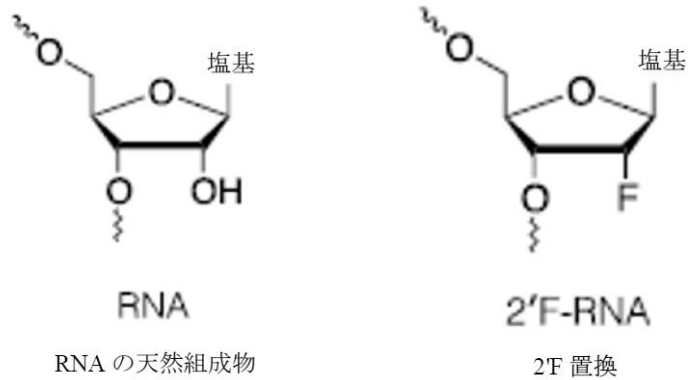
本出願において、「fA」、「fC」、「fU」、または「fG」という用語は、2'-Fで置換されたヌクレオチドを表すために使用され得る。

【0100】

2'-Fの置換は、以下のように描写され得る。

50

【化 2】



10

【0101】

ホスホロチオエート（PS）連結または結合とは、ホスホジエステル連結、例えばヌクレオチド塩基間の結合での 1 個の非架橋リン酸酸素を硫黄が置換する結合を指す。ホスホロチオエートを使用してオリゴヌクレオチドを生成する場合、修飾オリゴヌクレオチドは S-オリゴとも称され得る。

【0102】

PS 修飾を示すために、「*」を使用し得る。本出願では、用語 A*、C*、U*、または G* を使用して、PS 結合で次の（例えば 3'）ヌクレオチドに連結されているヌクレオチドを示すことができる。

20

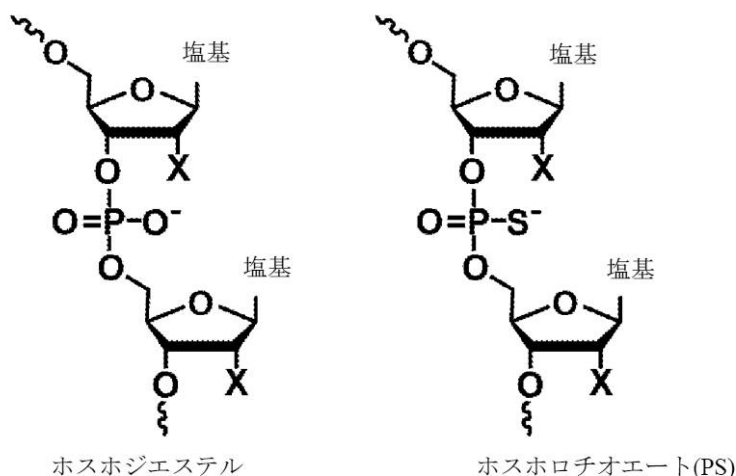
【0103】

本出願では、用語「mA*」、「mC*」、「mU*」、または「mG*」を使用して、2'-O-Me で置換され、PS 結合で次の（例えば 3'）ヌクレオチドに連結されているヌクレオチドを示すことができる。

【0104】

以下の図は、非架橋リン酸酸素への S- の置換を示し、ホスホジエステル結合の代わりに PS 結合を生じる。

【化 3】



30

40

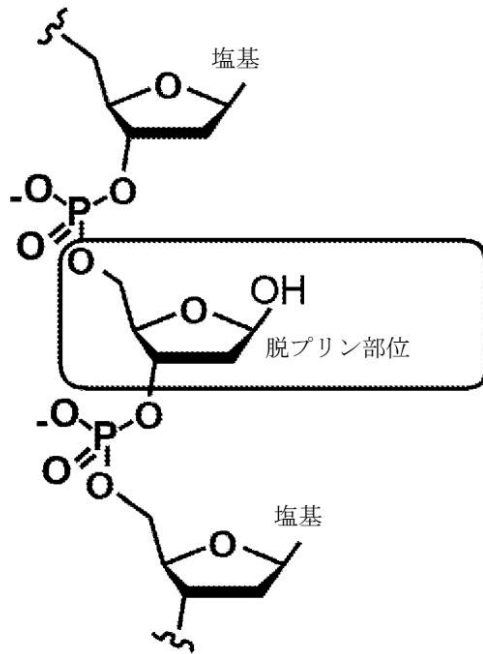
RNA の天然ホスホジエステル連結

修飾ホスホロチオエート(PS)結合

【0105】

脱塩基ヌクレオチドは、窒素系塩基を欠いているものを指す。以下の図は、塩基を欠く脱塩基（脱プリンとしても知られる）部位を有するオリゴヌクレオチドを描写する。

【化 4】

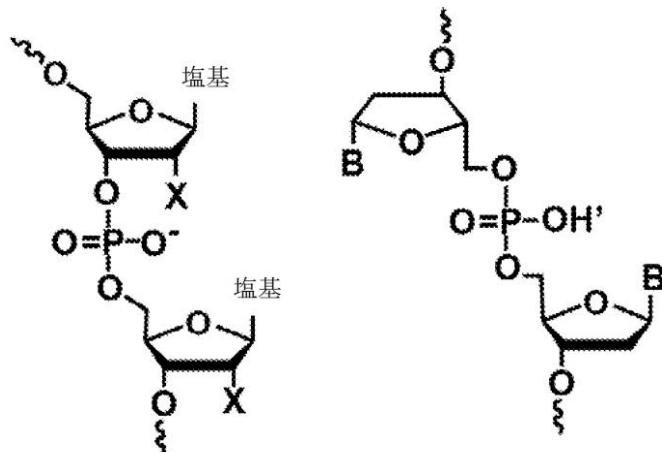


10

【0106】

反転した塩基は、通常の 5' から 3' への連結とは反転した連結を有するものを指す（すなわち、5' から 5' への連結または 3' から 3' への連結のいずれか）。例えば、

【化 5】



30

通常のオリゴヌクレオチド連結

反転オリゴヌクレオチド連結

【0107】

脱塩基ヌクレオチドは、反転した連結と接続することができる。例えば、脱塩基ヌクレオチドは、5' - 5' 連結を介して末端部の 5' ヌクレオチドに接続してもよく、または脱塩基ヌクレオチドは、3' - 3' 連結を介して末端部の 3' ヌクレオチドに接続してもよい。末端部の 5' または 3' ヌクレオチドのいずれかにおける反転した脱塩基ヌクレオチドはまた、反転した脱塩基末端キャップと称され得る。

【0108】

いくつかの実施形態では、5' 末端部における最初の 3、4、または 5 個のヌクレオチドのうちの 1 つ以上、および 3' 末端部における最後の 3、4、または 5 個のヌクレオチドのうちの 1 つ以上が修飾されている。いくつかの実施形態では、修飾は、2' - O - Me、2' - F、反転した脱塩基ヌクレオチド、PS 結合、または安定性および／もしくは性能を増加させることが当該技術分野において周知の他のヌクレオチド修飾である。

【0109】

50

いくつかの実施形態では、5'末端部における最初の4個のヌクレオチド、および3'末端部における最後の4個のヌクレオチドは、ホスホロチオエート（PS）結合を用いて連結される。

【0110】

いくつかの実施形態では、5'末端部における最初の3個のヌクレオチド、および3'末端部における最後の3個のヌクレオチドは、2'-O-メチル（2'-O-Me）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、5'末端部における最初の3個のヌクレオチド、および3'末端部における最後の3個のヌクレオチドは、2'-フルオロ（2'-F）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、5'末端部における最初の3個のヌクレオチド、および3'末端部における最後の3個のヌクレオチドは、反転した脱塩基ヌクレオチドを含む。

10

【0111】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、修飾sgRNAを含む。いくつかの実施形態では、sgRNAは、配列番号201、202、または203に示される修飾パターンを含み、ここで、Nは、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、Nの全体は、HAO1内の標的配列に対してヌクレアーゼを指向させるガイド配列（例えば、表1に示されるような）を含む。

【0112】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号151～168または251～268のうちのいずれか1つに示されるsgRNAを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号1～146のガイド配列のうちのいずれか1つと、配列番号201、202、または203のヌクレオチドと、を含むsgRNAを含み、配列番号201、202、または203のヌクレオチドは、ガイド配列の3'末端にあり、sgRNAは、表3または配列番号300に示されるように修飾され得る。

20

【0113】

上述のように、いくつかの実施形態では、本明細書に開示の組成物または製剤は、RNAガイドDNA結合剤、例えば、本明細書に記載のCasヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレーム（ORF）を含むmRNAを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤、例えば、CasヌクレアーゼをコードするORFを含むmRNAが提供されるか、使用されるか、または投与される。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNAヌクレアーゼをコードするORFは、「修飾RNAガイドDNA結合剤ORF」または単に「修飾ORF」であり、ORFが修飾されていることを示すための略語として使用される。

30

【0114】

いくつかの実施形態では、修飾ORFは、少なくとも1つ、複数、または全てのウリジン位置に、修飾ウリジンを含み得る。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで、5位で修飾されたウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで、1位で修飾されたプソイドウリジンである。修飾ウリジンは、例えば、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、5-メトキシウリジン、5-ヨードウリジン、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、5-メトキシウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、5-ヨードウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、N1-メチルプソイドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンとN1-メチルプソイドウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンと5-メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、N1-メチルプソイドウリジンと5-メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、5-ヨードウリジンとN1-メチルプソイドウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンと5-ヨードウリジン

40

50

の組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、5-ヨードウリジンと5-メトキシウリジンの組み合わせである。

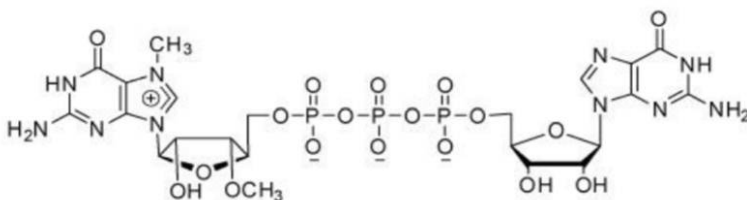
【0115】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるmRNAは、5'キャップ、例えば、Cap0、Cap1、またはCap2を含む。5'キャップは、一般に、mRNAの5'-3'鎖の第1のヌクレオチド（すなわち、第1のキャップ近位のヌクレオチド）の5'位に対して5'-トリホスフェートを介して連結した7-メチルグアニンリボヌクレオチド（例えば、ARCAに関して、以下に記載されるようにさらに修飾されてもよい）である。Cap0において、mRNAの第1および第2のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、2'-ヒドロキシルを含む。Cap1において、mRNAの第1および第2の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ、2'-メトキシおよび2'-ヒドロキシルを含む。Cap2において、mRNAの第1および第2のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、2'-メトキシを含む。例えば、Katibah et al. (2014) Proc Natl Acad Sci USA 111(33): 12025-30、Abbas et al. (2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(11): E2106-E2115を参照のこと。ヒトmRNA等の哺乳動物mRNAを含む、ほとんどの内因性の高級真核生物mRNAは、Cap1またはCap2を含む。Cap0、ならびにCap1およびCap2とは異なる他のキャップ構造は、IFIT-1およびIFIT-5等の自然免疫系の構成要素によって「非自己」として認識されるため、ヒト等の哺乳動物において免疫原性である場合があり、I型インターフェロンを含むサイトカインレベルの上昇を引き起こし得る。IFIT-1およびIFIT-5等の自然免疫系の構成要素はまた、Cap1またはCap2以外のキャップとのmRNAの結合についてeIF4Eと競合する場合があり、mRNAの翻訳を潜在的に阻害する。

【0116】

キャップは、共転写的に含めることができる。例えば、ARCA（抗逆キャップアナログ（anti-reverse cap analog）、Thermo Fisher Scientific カタログ番号AM8045）は、グアニンリボヌクレオチドの5'位に連結する7-メチルグアニン 3'-メトキシ-5'-トリホスフェートを含むキャップアナログであり、開始時にインビトロで転写物に組み込むことができる。ARCAは、第1のキャップ近位のヌクレオチドの2'位がヒドロキシルであるCap0キャップをもたらす。例えば、Stepinski et al., (2001)「Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG」、RNA 7:1486-1495を参照のこと。ARCAの構造を以下に示す。

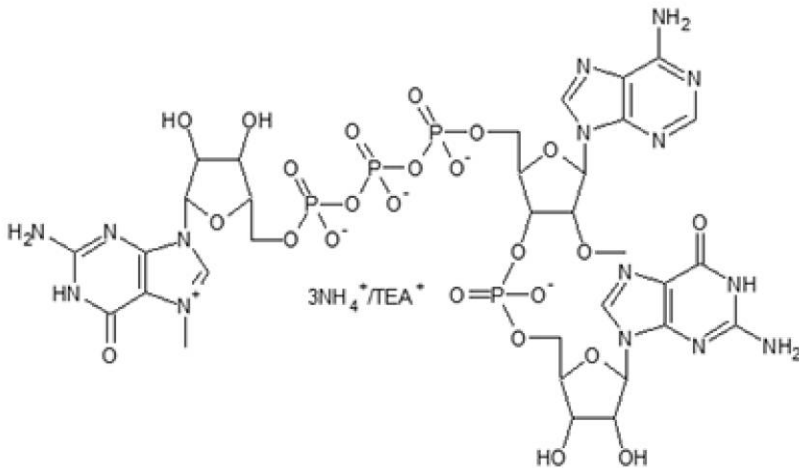
【化6】



【0117】

CleanCap（商標）AG（m7G（5'）ppp（5'）（2'OMeA）pG、TriLink Biotechnologies カタログ番号N-7113）またはCleanCap（商標）GG（m7G（5'）ppp（5'）（2'OMeG）pG、TriLink Biotechnologies カタログ番号N-7133）を使用して、Cap1の構造を共転写的に提供することができる。CleanCap（商標）

AGおよびCleanCap（商標）GGの3'-O-メチル化変形も、それぞれ、カタログ番号N-7413およびN-7433としてTriLink Biotechnologiesから入手可能である。CleanCap（商標）AGの構造を以下に示す。
【化7】



10

【0118】

あるいは、転写後に、キャップをRNAに付加することができる。例えば、Vacciniaキャッピング酵素は市販されており（New England Biolabs カタログ番号M2080S）、そのD1サブユニットによって与えられるRNAトリホスファターゼおよびグアニリルトランスフェラーゼ活性と、そのD12サブユニットによって与えられるグアニンメチルトランスフェラーゼを有する。したがって、S-アデノシルメチオニンおよびGTPの存在下で、Cap0を与えるように、7-メチルグアニンをRNAに付加することができる。例えば、Guo, P. and Moss, B. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4023-4027、Mao, X. and Shuman, S. (1994) J. Biol. Chem. 269, 24472-24479を参照のこと。

20

【0119】

いくつかの実施形態では、mRNAは、ポリアデニル化（ポリ-A）テールをさらに含む。いくつかの実施形態では、ポリ-Aテールは、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、または100個のアデニンを含み、任意選択で、300個までのアデニンを含む。いくつかの実施形態では、ポリ-Aテールは、95、96、97、98、99、または100個のアデニンヌクレオチドを含む。

30

【0120】

D. リボ核タンパク質複合体

いくつかの実施形態では、表1からの1つ以上のガイド配列を含む1つ以上のgRNA、または表2からの1つ以上のsgRNA、およびRNAガイドDNA結合剤、例えば、ヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9を含む組成物を包含する。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、切断活性を有し、これは二本鎖エンドヌクレアーゼ活性とも称され得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、Casヌクレアーゼを含む。Cas9ヌクレアーゼの例としては、S. pyogenes、S. aureus、および他の原核生物のII型CRISPR系のもの（例えば、次の段落のリストを参照のこと）、ならびにそれらの修飾（例えば、操作型または変異体）態様が挙げられる。例えば、US2016/0312198（A1）、US2016/0312199（A1）を参照のこと。Casヌクレアーゼの他の例としては、III型CRISPR系のCsmもしくはCmr複合体、またはCas10、Csm1、もしくはそのCmr2サブユニット、およびI型CRISPR系のカスケード複合体、またはそのCas3サブユニットが挙げられる。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、IIA型、IIB型、またはIIC型の系に由来していてもよい。様々なCRI

40

50

S P R系およびC a sヌクレアーゼの考察については、例えば、M a k a r o v a e t a l . , N A T . R E V . M I C R O B I O L . 9 : 4 6 7 - 4 7 7 (2 0 1 1) 、 M a k a r o v a e t a l . , N A T . R E V . M I C R O B I O L . 1 3 : 7 2 2 - 3 6 (2 0 1 5) 、 S h m a k o v e t a l . , M O L E C U L A R C E L L , 6 0 : 3 8 5 - 3 9 7 (2 0 1 5) を参照のこと。

【0121】

C a sヌクレアーゼの由来となり得る非限定的な例示的な種としては、S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s 、 S t r e p t o c o c c u s t h e r m o p h i l u s 、 S t r e p t o c o c c u s s p . 、 S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s 、 L i s t e r i a i n n o c u a 、 L a c t o b a c i l l u s g a s s e r i 、 F r a n c i s e l l a n o v i c i d a 、 W o l i n e l l a s u c c i n o g e n e s 、 S u t t e r e l l a w a d s w o r t h e n s i s 、 G a m m a p r o t e o b a c t e r i u m 、 N e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s 、 C a m p y l o b a c t e r j e j u n i 、 P a s t e u r e l l a m u l t o c i d a 、 F i b r o b a c t e r s u c c i n o g e n e 、 R h o d o s p i r i l l u m r u b r u m 、 N o c a r d i o p s i s d a s s o n v i l l e i 、 S t r e p t o m y c e s p r i s t i n a e s p i r a l i s 、 S t r e p t o m y c e s v i r i d o c h r o m o g e n e s 、 S t r e p t o m y c e s v i r i d o c h r o m o g e n e s 、 S t r e p t o s p o r a n g i u m r o s e u m 、 S t r e p t o s p o r a n g i u m r o s e u m 、 A l i c y c l o b a c i l l u s a c i d o c a l d a r i u s 、 B a c i l l u s p s e u d o m y c o i d e s 、 B a c i l l u s s e l e n i t i r e d u c e n s 、 E x i g u o b a c t e r i u m s i b i r i c u m 、 L a c t o b a c i l l u s d e l b r u e c k i i 、 L a c t o b a c i l l u s s a l i v a r i u s 、 L a c t o b a c i l l u s b u c h n e r i 、 T r e p o n e m a d e n t i c o l a 、 M i c r o s c i l l a m a r i n a 、 B u r k h o l d e r i a l e s b a c t e r i u m 、 P o l a r o m o n a s n a p h t h a l e n i v o r a n s 、 P o l a r o m o n a s s p . 、 C r o c o s p h a e r a w a t s o n i i 、 C y a n o t h e c e s p . 、 M i c r o c y s t i s a e r u g i n o s a 、 S y n e c h o c o c c u s s p . 、 A c e t o h a l o b i u m a r a b a t i c u m 、 A m m o n i f e x d e g e n s i i 、 C a l d i c e l u l o s i r u p t o r b e c s c i i 、 C a n d i d a t u s D e s u l f o r u d i s 、 C l o s t r i d i u m b o t u l i n u m 、 C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e 、 F i n e g o l d i a m a g n a 、 N a t r a n a e r o b i u s t h e r m o p h i l u s 、 P e l o t o m a c u l u m t h e r m o p r o p i o n i c u m 、 A c i d i t h i o b a c i l l u s c a l d u s 、 A c i d i t h i o b a c i l l u s f e r r o o x i d a n s 、 A l l o c h r o m a t i u m v i n o s u m 、 M a r i n o b a c t e r s p . 、 N i t r o s o c o c c u s h a l o p h i l u s 、 N i t r o s o c o c c u s w a t s o n i 、 P s e u d o a l t e r o m o n a s h a l o p l a n k t i s 、 K t e d o n o b a c t e r r a c e m i f e r 、 M e t h a n o h a l o b i u m e v e s t i g a t u m 、 A n a b a e n a v a r i a b i l i s 、 N o d u l a r i a s p u m i g e n a 、 N o s t o c s p . 、 A r t h r o s p i r a m a x i m a 、 A r t h r o s p i r a p l a t e n s i s 、 A r t h r o s p i r a s p . 、 L y n g b y a s p . 、 M i c r o c o l e u s c h t h o n o p l a s t e s 、 O s c i l l a t o r i a s p . 、 P e t r o t o g a m o b i l i s 、 T h e r m o s i p h o a f r i c a n u s 、 S t r e p t o c o c c u s p a s t e u r i a n u s 、 N e i s s e r i a c i n e r e a 、 C a m p y l o b a c t e r l a r i 、 P a r v i b a c u l u m l a v a m e n t i v o r a n s 、 C o r y n e b a c t e r i u m d i p h t h e r i a 、 A c i d a m i n o c o c c u s s p . 、 L a c h n o s p i r a c e a e b a c t e r i u m N D 2 0 0 6 、 および A c a r y o c h l o r i s m a r i n a が挙げられる。

【0122】

いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Streptococcus pyogenes* 由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Streptococcus thermophilus* 由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Neisseria meningitidis* 由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Staphylococcus aureus* 由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Francisella novicida* 由来のCpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Acidaminococcus* sp. 由来のCpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Lachnospiraceae* 細菌ND2006由来のCpf1ヌクレアーゼである。さらなる実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Francisella tularensis*、*Lachnospiraceae bacterium*、*Butyrivibrio proteoclasticus*、*Peregrinibacteria bacterium*、*Parcubacteria bacterium*、*Smithella*、*Acidaminococcus*、*Candidatus Methanoplasma termitum*、*Eubacterium eligens*、*Moraxella bovoculi*、*Leptospira inadai*、*Porphyromonas crevioricanis*、*Prevotella disiens*、または*Porphyromonas macacae*由来のCpf1ヌクレアーゼである。特定の実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Acidaminococcus* または *Lachnospiraceae* 由来のCpf1ヌクレアーゼである。

【0123】

いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤と共に含むgRNAは、リボ核タンパク質複合体(RNP)と呼ばれる。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、Casヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼと共に含むgRNAは、Cas RNPと呼ばれる。いくつかの実施形態では、RNPは、I型、II型、またはIII型の構成要素を含む。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、II型CRISPR/Cas系由来のCas9タンパク質である。いくつかの実施形態では、Cas9と共に含むgRNAは、Cas9 RNPと呼ばれる。

【0124】

野生型Cas9は、2つのヌクレアーゼドメインRuvCおよびHNHを有する。RuvCドメインは、非標的DNA鎖を切断し、HNHドメインは、DNAの標的鎖を切断する。いくつかの実施形態では、Cas9タンパク質は、1個より多いRuvCドメインおよび/または1個より多いHNHドメインを含む。いくつかの実施形態では、Cas9タンパク質は、野生型Cas9である。組成物、使用および方法の実施形態の各々において、Casは、標的DNAにおける二本鎖切断を誘導する。

【0125】

いくつかの実施形態では、キメラCasヌクレアーゼが使用され、タンパク質の1つのドメインまたは領域が、異なるタンパク質の一部によって置き換えられている。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼドメインは、FokI等の異なるヌクレアーゼ由来のドメインで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、修飾ヌクレアーゼであってもよい。

【0126】

他の実施形態では、Casヌクレアーゼは、I型CRISPR/Cas系由来であり得る。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、I型CRISPR/Cas系のカスケード複合体の構成要素であり得る。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、Cas3タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、II型CRISPR/Cas系由来であり得る。いくつかの実施形態では、Casヌクレ

アーゼは、RNA切断活性を有し得る。

【0127】

いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、一本鎖ニッカーゼ活性を有し、すなわち、1つのDNA鎖を切断して一本鎖切断（「ニック」としても知られる）を生成することができる。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、Casニッカーゼを含む。ニッカーゼは、dsDNA内でニックを作製する酵素であり、すなわち、DNA二重らせんの一方の鎖を切断するが、他方の鎖を切断しない。いくつかの実施形態では、Casニッカーゼは、例えば、触媒ドメイン内の1つ以上の改変（例えば、点変異）によって、エンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化されたCasヌクレアーゼ（例えば、上述のCasヌクレアーゼ）の一態様である。例えば、Casニッカーゼおよび例示的な触媒ドメイン改変の考察については、米国特許第8,889,356号を参照のこと。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼ等のCasニッカーゼは、不活性化されたRuvCまたはHNHドメインを有する。

10

【0128】

いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、1個の機能的ヌクレアーゼドメインのみを含むように修飾される。例えば、薬剤タンパク質は、その核酸切断活性を低下させるために、ヌクレアーゼドメインの1つが突然変異されるか、または完全もしくは部分的に欠失するように修飾されてもよい。いくつかの実施形態では、活性が低下したRuvCドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、不活性なRuvCドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、活性が低下したHNHドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、不活性なHNHドメインを有するニッカーゼが使用される。

20

【0129】

いくつかの実施形態では、Casタンパク質ヌクレアーゼドメイン内の保存アミノ酸は、ヌクレアーゼ活性を低下させるか、または変化させるように置換される。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、RuvCまたはRuvC様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。RuvCまたはRuvC様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、D10A（*S. pyogenes* Cas9タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Zetsche et al. (2015) Cell Oct 22:163(3):759-771を参照のこと。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、HNHまたはHNH様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。HNHまたはHNH様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、E762A、H840A、N863A、H983A、およびD986A（*S. pyogenes*のCas9タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Zetsche et al. (2015)を参照のこと。さらなる例示的なアミノ酸置換としては、D917A、E1006A、およびD1255A（*Francisella novicida* U112 Cpf1（FnCpf1）配列（UniProtKB-A0Q7Q2（Cpf1_FRN）に基づく）が挙げられる。

30

【0130】

いくつかの実施形態では、ニッカーゼをコードするmRNAは、それぞれ、標的配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖に対して相補的な一对のガイドRNAと組み合わせて提供される。この実施形態では、ガイドRNAは、標的配列の反対側の鎖にニックを作成することによって（すなわち、二重ニックング）、ニッカーゼを標的配列に指向させ、DSBを導入する。いくつかの実施形態では、二重ニックングの使用は、特異性を改善し、オフターゲット効果を低減し得る。いくつかの実施形態では、ニッカーゼは、DNAの反対側の鎖を標的とする2つの別個のガイドRNAと共に使用され、標的DNA内に二重ニックを生成する。いくつかの実施形態では、ニッカーゼは、ごく接近した位置にあるように選択された2つの別個のガイドRNAと共に使用され、標的DNA内に二重ニックを生成する。

40

【0131】

50

いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、切断およびニッカーゼ活性を欠いている。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、dCas DNA結合ポリペプチドを含む。dCasポリペプチドは、触媒（切断／ニッカーゼ）活性を本質的に欠く一方で、DNA結合活性を有する。いくつかの実施形態では、dCasポリペプチドは、dCas9ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、切断およびニッカーゼ活性を欠くRNAガイドDNA結合剤、またはdCas DNA結合ポリペプチドは、例えば、その触媒ドメイン内の1つ以上の改変（例えば、点変異）によって、そのエンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化されたCasヌクレアーゼ（例えば、上述のCasヌクレアーゼ）の一態様である。例えば、US 2014/0186958（A1）、US 2015/0166980（A1）を参照のこと。

10

【0132】

いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、1つ以上の異種機能ドメインを含む（例えば、融合ポリペプチドであるか、または融合ポリペプチドを含む）。

【0133】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の細胞核への輸送を促進し得る。例えば、異種機能ドメインは、核局在化シグナル（NLS）であり得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、1～10個のNLS（複数可）と融合され得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、1～5個のNLS（複数可）と融合され得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、1個のNLSと融合され得る。1個のNLSが使用される場合、NLSは、RNAガイドDNA結合剤の配列のN末端部またはC末端部で連結され得る。これをRNAガイドDNA結合剤の配列内に挿入することもできる。他の実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、1個より多いNLSと融合され得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、2、3、4、または5個のNLSと融合され得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、2個のNLSと融合され得る。特定の状況では、2個のNLSは、同じ（例えば、2個のSV40 NLS）であってもよく、または異なってもよい。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、カルボキシ末端部で連結された2個のSV40 NLSの配列に融合される。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、2個のNLSと融合していてもよく、1つはN末端部に連結しており、1つはC末端部に連結している。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、3個のNLSと融合され得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、NLSなしで融合され得る。いくつかの実施形態では、NLSは、単節型配列、例えば、SV40 NLS、PKKKRKV（配列番号600）またはPKKKRRV（配列番号601）であってもよい。いくつかの実施形態では、NLSは、双節型配列、例えば、ヌクレオプラスミンのNLSであるKRPAATKKAQAKKKK（配列番号602）であってもよい。特定の実施形態では、単一のPKKKRKV（配列番号600）NLSは、RNAガイドDNA結合剤のC末端部で連結され得る。1つ以上のリンカーは、任意選択で、融合部位に含まれる。

20

30

【0134】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の細胞内半減期を修飾することができる。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤の半減期が増加し得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤の半減期が低減し得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の安定性を増加させることができる。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の安定性を低減させることができる。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、タンパク質分解のシグナルペプチドとして機能し得る。いくつかの実施形態では、タンパク質分解は、例えば、プロテアソーム、リソソームプロテアーゼ、またはカルペインプロテアーゼ等のタンパク質分解酵素によって媒介され得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、PEST配列を含み得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、ユビキチンまたはポリユビキチン鎖の付加によって修飾さ

40

50

れ得る。いくつかの実施形態では、ユビキチンは、ユビキチン様タンパク質 (UBL) であってもよい。ユビキチン様タンパク質の非限定的な例としては、小さなユビキチン様修飾因子 (SUMO)、ユビキチン交差反応性タンパク質 (UCRP、インターフェロン刺激遺伝子-15 (ISG15) としても知られる)、ユビキチン関連修飾因子-1 (URM1)、神経前駆細胞が発現する発達の下方制御されたタンパク質-8 (NEDD8、*S. cerevisiae*においてRub1とも呼ばれる)、ヒト白血球抗原F関連 (FAT10)、オートファジー-8 (ATG8) および-12 (ATG12)、Fauユビキチン様タンパク質 (FUB1)、膜固定UBL (MUB)、ユビキチン折りたたみ修飾因子-1 (UFM1)、およびユビキチン様タンパク質-5 (UBL5) が挙げられる。

【0135】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、マーカードメインであってもよい。マーカードメインの非限定的な例としては、蛍光タンパク質、精製タグ、エピトープタグ、およびレポーター遺伝子配列が挙げられる。いくつかの実施形態では、マーカードメインは、蛍光タンパク質であってもよい。好適な蛍光タンパク質の非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質 (例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、sfGFP、EGFP、Emerald、Azami Green、Monomeric Azami Green、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1)、黄色蛍光タンパク質 (例えば、YFP、EYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1)、青色蛍光タンパク質 (例えば、EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、T-sapphire)、シアン蛍光タンパク質 (例えば、ECFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan)、赤色蛍光タンパク質 (例えば、mKate、mKate2、mPlum、DsRedモノマー、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred)、および橙色蛍光タンパク質 (mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato)、または任意の他の適切な蛍光タンパク質が挙げられる。他の実施形態では、マーカードメインは、精製タグおよび/またはエピトープタグであってもよい。非限定的な例示的なタグとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、キチン結合タンパク質 (CBP)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシン (TRX)、ポリ (NANP)、タンデムアフィニティ精製 (TAP) タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、HA、nus、Softag1、Softag3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、6xHis、8xHis、ビオチンカルボキシル担体タンパク質 (BCCP)、ポリ-His、およびカルモジュリンが挙げられる。非限定的な例示的なレポーター遺伝子としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質が挙げられる。

【0136】

さらなる実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤を特異的なオルガネラ、細胞型、組織、または器官に標的化し得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤をミトコンドリアに標的化し得る。

【0137】

さらなる実施形態では、異種機能ドメインは、エフェクタードメインであってもよい。RNAガイドDNA結合剤がその標的配列に指向されるとき、例えば、Casヌクレアーゼが、gRNAによって標的配列に指向されるとき、エフェクタードメインは、標的配列を修飾するか、または影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、エフェクタードメインは、核酸結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン (例えば、非Casヌクレアーゼドメイ

10

20

30

40

50

ン)、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写抑制ドメインから選択され得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ヌクレアーゼ、例えばFokIヌクレアーゼである。例えば、米国特許第9,023,649号を参照のこと。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、転写活性化因子または転写抑制因子である。例えば、Qi et al., 「Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression」、Cell 152:1173-83 (2013)、Perez-Pinera et al., 「RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors」、Nat. Methods 10:973-6 (2013)、Mali et al., 「CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering」、Nat. Biotechnol. 31:833-8 (2013)、Gilbert et al., 「CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes」、Cell 154:442-51 (2013)を参照のこと。したがって、RNAガイドDNA結合剤は、本質的に、ガイドRNAを使用して所望の標的配列に結合するように指向され得る転写因子になる。

10

20

【0138】

E. gRNAの有効性の決定

いくつかの実施形態では、gRNAの有効性は、送達されたとき、またはRNPを形成する他の構成要素と共に発現されたときに決定される。いくつかの実施形態では、gRNAは、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casタンパク質、例えば、Cas9と共に発現される。いくつかの実施形態では、gRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼまたはニッカーゼ、例えば、Cas9ヌクレアーゼまたはニッカーゼを既に安定に発現する細胞株に送達されるか、またはその細胞株において発現される。いくつかの実施形態では、gRNAは、RNPの一部として細胞に送達される。いくつかの実施形態では、gRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼまたはニッカーゼ、例えば、Cas9ヌクレアーゼまたはニッカーゼをコードするmRNAと共に細胞に送達される。

30

【0139】

本明細書に記載される場合、本明細書に開示されるRNAガイドDNAヌクレアーゼおよびガイドRNAの使用は、DNAにおいて二本鎖切断を生じる場合があり、細胞機構による修復時に挿入／欠失（インデル）突然変異の形態でエラーを生じ得る。インデルに起因する多くの突然変異は、リーディングフレームを変化させるか、または未成熟終止コドンを導入し、したがって、非機能性タンパク質を産生する。

【0140】

いくつかの実施形態では、特定のgRNAの有効性は、インビトロモデルに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、Cas9を安定して発現するHEK293細胞である（HEK293_Cas9）。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、HUH7ヒト肝癌細胞である。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、HepG2細胞である。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、初代ヒト肝細胞である。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、初代カニクイザル肝細胞である。初代ヒト肝細胞を使用することに関して、市販の初代ヒト肝細胞を使用して、実験間のより高い一貫性を提供することができる。いくつかの実施形態では、インビトロモデルにおいて（例えば、初代ヒト肝細胞において）欠失または挿入が起こるオフターゲット部位の数は、例えば、インビトロでCas9 mRNAおよびガイドRNAでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノムDNAを分析することによって、決定される

40

50

。いくつかの実施形態では、そのような決定は、インビトロで Cas 9 mRNA、ガイド RNA、およびドナーオリゴヌクレオチドでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノム DNA を分析することを含む。そのような決定のための例示的な手順を以下の作業実施例に提供する。

【0141】

いくつかの実施形態では、特定の gRNA の有効性は、gRNA 選択プロセスのための複数のインビトロ細胞モデルにわたって決定される。いくつかの実施形態では、選択された gRNA とのデータの細胞株比較が行われる。いくつかの実施形態では、複数の細胞モデルで交差スクリーニングを実施する。

【0142】

いくつかの実施形態では、特定の gRNA の有効性は、インビボモデルに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、インビボモデルは、げっ歯類モデルである。いくつかの実施形態では、げっ歯類モデルは、Hao1 遺伝子を発現するマウスである。いくつかの実施形態では、げっ歯類モデルは、ヒト HAO1 遺伝子を発現するマウスである。いくつかの実施形態では、インビボモデルは、非ヒト霊長類、例えばカニクイザルである。

【0143】

いくつかの実施形態では、ガイド RNA の有効性は、HAO1 の編集率によって測定される。いくつかの実施形態では、HAO1 の編集率を、例えば、インビトロモデルの場合は全細胞溶解物から、またはインビボモデルの場合は組織内において、HAO1 タンパク質のノックダウンを達成するために必要な編集率と比較する。

【0144】

いくつかの実施形態では、ガイド RNA の有効性は、標的細胞型のゲノム内のオフターゲット配列におけるインデルの数および／または頻度によって測定される。いくつかの実施形態では、細胞集団において、および／または標的部位におけるインデル生成の頻度と比較して、非常に低い頻度（例えば、5%未満）で、オフターゲット部位でインデルを生成する有効なガイド RNA が提供される。したがって、本開示は、標的細胞型（例えば、肝細胞）においてオフターゲットインデル形成を示さないか、または細胞集団において、および／もしくは標的部位でのインデル生成の頻度と比較して、オフターゲットインデル形成の頻度が 5%未満であるガイド RNA を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、標的細胞型（例えば、肝細胞）において任意のオフターゲットインデル形成を示さないガイド RNA を提供する。いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載される 1 つ以上の方法によって評価される場合、5 個未満のオフターゲット部位においてインデルを生成するガイド RNA が提供される。いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に記載される 1 つ以上の方法によって評価される場合、4、3、2、または 1 個未満または以下のオフターゲット部位においてインデルを生成するガイド RNA が提供される。いくつかの実施形態では、オフターゲット部位（複数可）は、標的細胞（例えば、肝細胞）ゲノム内のタンパク質コード領域内では発生しない。

【0145】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集事象を検出すること、例えば、挿入／欠失（「インデル」）突然変異の形成、および標的 DNA における相同性誘導修復（HDR）事象は、タグ化プライマーを用いた線形増幅およびタグ化増幅産物の単離を利用する（本明細書ではこれ以降、「LAM-PCR」または「線形増幅（LA）」法と呼ばれる）。

【0146】

いくつかの実施形態では、ガイド RNA の有効性は、血清、血漿、血液、または尿等の体液等の試料中のグリコレートのレベルおよび／またはオキサレートのレベルを測定することによって測定される。いくつかの実施形態では、ガイド RNA の有効性は、血清または血漿中のグリコレートのレベルおよび／または尿内のオキサレートのレベルを測定することによって測定される。血清または血漿中のグリコレートのレベルの増加、および／または尿内のオキサレートのレベルの減少は、有効なガイド RNA の指標である。いくつかの実施形態では、尿オキサレートは、0.7 mmol / 24 時間 / 1.73 m² 未満まで

10

20

30

40

50

減少する。いくつかの実施形態では、グリコレートおよびオキサレートのレベルは、細胞培地または血清または血漿を用いた酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）を用いて測定される。いくつかの実施形態では、グリコレートおよびオキサレートのレベルは、編集を測定するために使用されるのと同じインビトロまたはインビボ系またはモデルにおいて測定される。いくつかの実施形態では、グリコレートおよびオキサレートのレベルは、細胞、例えば、初代ヒト肝細胞において測定される。いくつかの実施形態では、グリコレートおよびオキサレートのレベルは、H U H 7 細胞において測定される。いくつかの実施形態では、グリコレートおよびオキサレートのレベルは、H e p G 2 細胞において測定される。

【0147】

10

I I I . 治療方法

本明細書に開示される g R N A ならびに関連する方法および組成物は、P H 1 を治療および予防し、P H 1 の症状を予防するのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される g R N A は、シュウ酸カルシウム産生、臓器におけるシュウ酸カルシウム沈着、高シュウ酸尿症、全身性シュウ酸症を含むシュウ酸症、および血尿を治療および予防するのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される g R N A は、腎臓または肝臓移植の必要性を遅らせるか、または改善するのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される g R N A は、末期腎疾患（E S R D）の予防に有用である。本明細書に開示される g R N A の投与は、尿内に排泄されるオキサレートが少なくなるように、血清または血漿グリコレートを高め、オキサレートの産生または蓄積を低減する。したがって、一態様では、治療／予防の有効性は、血清または血漿グリコレートを測定することによって評価することができ、グリコレートレベルの増加が有効性を示す。いくつかの実施形態では、治療／予防の有効性は、試料内のオキサレート（例えば、尿オキサレート）を測定することによって評価することができ、尿オキサレートの減少が有効性を示す。

20

【0148】

健康な対象の尿における正常な1日のオキサレート排泄は、24時間あたり10～40 mg の範囲であり、一方、24時間あたり40～45 mg を超える濃度は、臨床的な高シュウ酸尿症であるとみなされる（例えば、B h a s i n e t a l . , W o r l d J N e p h r o l 2015 May 6 ; 4 (2) : 235-244 を参照）。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される g R N A および組成物の投与は、臨床的な高シュウ酸尿症に関連する尿オキサレートのレベルを対象がもはや示さないように、オキサレートのレベルを減少させるのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される g R N A および組成物の投与は、24時間以内に対象の尿オキサレートを40 mg 未満に減少させる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される g R N A および組成物の投与は、24時間以内に対象の尿オキサレートを35 mg 未満、30 mg 未満、25 mg 未満、20 mg 未満、15 mg 未満、または10 mg 未満に減少させる。

30

【0149】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される g R N A 、組成物、または薬学的製剤のうちのいずれか1つ以上は、対象において疾患または障害を治療または予防するための医薬を調製するために使用するためのものである。いくつかの実施形態では、治療および／または予防は、医薬／組成物の単回用量、例えば、一度治療によって達成される。いくつかの実施形態では、疾患または障害は、P H 1 である。

40

【0150】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載される g R N A 、組成物、または薬学的製剤のうちのいずれか1つ以上を投与することを含む、対象において疾患または障害を治療または予防する方法を含む。いくつかの実施形態では、疾患または障害は、P H 1 である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される g R N A 、組成物、または薬学的製剤は、例えば、一度に単回用量として投与される。いくつかの実施形態では、単回用量は、永続的な治療および／または予防を達成する。いくつかの実施形態では、本方法

50

は、永続的な治療および／または予防を達成する。永続的な治療および／または予防は、本明細書で使用される場合、少なくとも i) 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15週間、ii) 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、24、30、もしくは36ヶ月間、またはiii) 1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10年間続く治療および／または予防を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される gRNA、組成物、または薬学的製剤の単回用量は、対象の生存期間にわたって本明細書に記載される適応症のいずれかを治療および／または予防するのに十分である。

【0151】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載される gRNA、組成物、または薬学的製剤のうちのいずれか1つ以上を投与または送達することを含む、標的DNAを修飾する（例えば、二本鎖切断を作成する）方法または使用を含む。いくつかの実施形態では、標的DNAは、HAO1遺伝子である。いくつかの実施形態では、標的DNAは、HAO1遺伝子のエクソン内にある。いくつかの実施形態では、標的DNAは、HAO1遺伝子のエクソン1、2、3、4、5、6、7、または8の中にある。

【0152】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載される gRNA、組成物、または薬学的製剤のうちのいずれか1つ以上を投与または送達することを含む、標的遺伝子の調節のための方法または使用を含む。いくつかの実施形態では、調節は、HAO1標的遺伝子の編集である。いくつかの実施形態では、調節は、HAO1標的遺伝子によってコード

10

20

【0153】

いくつかの実施形態では、方法または使用は、遺伝子編集をもたらす。いくつかの実施形態では、方法または使用は、標的HAO1遺伝子内の二本鎖切断をもたらす。いくつかの実施形態では、方法または使用は、DSBの非同源性末端結合中にインデル変異の形成をもたらす。いくつかの実施形態では、方法または使用は、標的HAO1遺伝子におけるヌクレオチドの挿入または欠失をもたらす。いくつかの実施形態では、標的HAO1遺伝子におけるヌクレオチドの挿入または欠失は、非機能性タンパク質をもたらすフレームシフト突然変異または未成熟終止コドンをもたらす。いくつかの実施形態では、標的HAO1遺伝子におけるヌクレオチドの挿入または欠失は、標的遺伝子発現のノックダウンまたは除去をもたらす。いくつかの実施形態では、方法または使用は、DSBの同源性誘導修復を含む。

30

【0154】

いくつかの実施形態では、方法または使用は、HAO1遺伝子調節をもたらす。いくつかの実施形態では、HAO1遺伝子調節は、遺伝子発現の低減である。いくつかの実施形態では、方法または使用は、標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現の低減をもたらす。

【0155】

いくつかの実施形態では、HAO1遺伝子内で二本鎖切断（DSB）を誘導する方法であって、配列番号1～146のいずれか1つ以上のガイド配列、または配列番号151～168もしくは251～268のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むガイドRNAを含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号1～146のガイド配列のうちのいずれか1つ以上を含むgRNAは、HAO1遺伝子においてDSBを誘導するために投与される。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）もしくはmRNA、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするベクターと共に投与され得る。

40

【0156】

いくつかの実施形態では、HAO1遺伝子を修飾する方法であって、配列番号1～146のガイド配列のいずれか1つ以上、または配列番号151～168もしくは251～2

50

68のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むガイドRNAを含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号1～146のガイド配列のいずれか1つ以上、または配列番号151～168もしくは251～268のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが、HAO1遺伝子を修飾するために投与される。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）もしくはmRNA、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするベクターと共に投与され得る。

【0157】

いくつかの実施形態では、PH1を治療または予防する方法であって、配列番号1～146のガイド配列のいずれか1つ以上、または配列番号151～168もしくは251～268のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むガイドRNAを含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号1～146のガイド配列のいずれか1つ以上、または配列番号151～168もしくは251～268のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが、PH1を治療または予防するために投与される。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）もしくはmRNA、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするベクターと共に投与され得る。

【0158】

いくつかの実施形態では、シュウ酸カルシウム産生および／または沈着を低減するか、またはなくす方法であって、配列番号1～146のガイド配列のいずれか1つ以上、または配列番号151～168もしくは251～268のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むガイドRNAを投与することを含む、方法が提供される。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）もしくはmRNA、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするベクターと共に投与され得る。

【0159】

いくつかの実施形態では、高シュウ酸尿症を治療または予防する方法であって、配列番号1～146のガイド配列のいずれか1つ以上、または配列番号151～168もしくは251～268のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むガイドRNAを投与することを含む、方法が提供される。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）もしくはmRNA、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするベクターと共に投与され得る。

【0160】

いくつかの実施形態では、全身性シュウ酸症を含むシュウ酸症を治療または予防する方法であって、配列番号1～146のガイド配列のいずれか1つ以上、または配列番号151～168もしくは251～268のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むガイドRNAを投与することを含む、方法が提供される。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）もしくはmRNA、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするベクターと共に投与され得る。

【0161】

いくつかの実施形態では、血尿を治療または予防する方法であって、配列番号1～146のガイド配列のいずれか1つ以上、または配列番号151～168もしくは251～268のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むガイドRNAを投与することを含む、方法が提供される。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）もしくはmRNA、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするベクターと共に

投与され得る。

【0162】

いくつかの実施形態では、配列番号1～146のガイド配列のいずれか1つ以上、または配列番号151～168もしくは251～268のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが、尿内のオキサレートレベルを低減するために投与される。gRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）もしくはmRNA、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするベクターと共に投与され得る。

【0163】

いくつかの実施形態では、配列番号1～146のガイド配列のいずれか1つ以上、または配列番号151～168もしくは251～268のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが、血清または血漿において血清グリコレートを増加させるために投与される。gRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）もしくはmRNA、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードするベクターと共に投与され得る。

10

【0164】

いくつかの実施形態では、表1のガイド配列を、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼと一緒に含むgRNAは、DSBを誘導し、修復中の非相同性末端結合（NHEJ）が、HAO1遺伝子内の突然変異をもたらす。いくつかの実施形態では、NHEJは、ヌクレオチドの欠失または挿入を引き起こし、HAO1遺伝子におけるフレームシフトまたはナンセンス突然変異を誘導する。

20

【0165】

いくつかの実施形態では、本発明のガイドRNA（例えば、本明細書で提供される組成物で）を投与することは、対象におけるグリコレートのレベル（例えば、血清または血漿レベル）を増加させ、したがって、オキサレート蓄積を防ぐ。

【0166】

いくつかの実施形態では、血清グリコレートの増加は、尿オキサレートの減少を引き起こす。いくつかの実施形態では、尿オキサレートの減少は、臓器におけるシュウ酸カルシウム形成および沈着を低減するか、またはなくす。

【0167】

いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、ウシ、ブタ、サル、ヒツジ、イヌ、ネコ、魚、または家禽である。

30

【0168】

いくつかの実施形態では、表1のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または表2からの1つ以上のsgRNAを含むガイドRNA（例えば、本明細書で提供される組成物で）の使用は、PH1を有するヒト対象を治療するための医薬の調製のために提供される。

【0169】

いくつかの実施形態では、ガイドRNA、組成物、および製剤は、静脈内に投与される。いくつかの実施形態では、ガイドRNA、組成物、および製剤は、肝循環に投与される。

40

【0170】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるガイドRNAを含む組成物の単回投与は、変異体タンパク質の発現をノックダウンするのに十分である。他の実施形態では、本明細書で提供されるガイドRNAを含む組成物の1回を超える投与は、治療効果を最大化するのに有益であり得る。

【0171】

いくつかの実施形態では、治療は、PH1疾患の進行を遅らせるか、または止める。

【0172】

いくつかの実施形態では、治療は、末期腎疾患（ESRD）の進行を遅らせるか、また

50

は止める。いくつかの実施形態では、治療は、腎臓および／または肝臓移植の必要性を遅らせるか、または止める。いくつかの実施形態では、治療は、PH1の症状の改善、安定化、または変化を遅らせる。

【0173】

A. 併用療法

いくつかの実施形態では、本発明は、上述のように、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ（例えば、本明細書で提供される組成物で）を、PH1およびその症状を緩和するのに適した追加の療法と併せて含む、併用療法を含む。

【0174】

いくつかの実施形態では、PH1のための追加の療法は、ビタミンB6、ハイドレーション、腎透析、または肝臓もしくは腎臓移植である。いくつかの実施形態では、追加の療法は、ルマシラン（ALN-GO1、Alnylam）である。

【0175】

いくつかの実施形態では、併用療法は、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つを、HAO1を標的とするsiRNAと共に含む。いくつかの実施形態では、siRNAは、野生型または変異体HAO1の発現をさらに低減するか、またはなくすことができる任意のsiRNAである。いくつかの実施形態では、siRNAは、薬物ルマシラン（ALN-GO1、Alnylam）である。いくつかの実施形態では、siRNAは、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ（例えば、本明細書で提供される組成物で）の後に投与される。いくつかの実施形態では、siRNAは、本明細書で提供されるgRNA組成物のいずれかで治療した後に、定期的に投与される。

【0176】

いくつかの実施形態では、併用療法は、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ（例えば、本明細書で提供される組成物で）を、HAO1を標的とするアンチセンスヌクレオチドと共に含む。いくつかの実施形態では、アンチセンスヌクレオチドは、HAO1の発現をさらに低減するか、またはなくすことができる任意のアンチセンスヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、アンチセンスヌクレオチドは、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ（例えば、本明細書で提供される組成物で）の後に投与される。いくつかの実施形態では、アンチセンスヌクレオチドは、本明細書で提供されるgRNA組成物のいずれかで治療した後に、定期的に投与される。

【0177】

B. gRNA組成物の送達

脂質ナノ粒子（LNP）は、ヌクレオチドおよびタンパク質カーゴの送達のための周知の手段であり、本明細書に開示されるガイドRNA、組成物、または薬学的製剤の送達に使用されてもよい。いくつかの実施形態では、LNPは、核酸、タンパク質、または核酸をタンパク質と共に送達する。

【0178】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示されるgRNAのいずれか1つを対象に送達する方法を含み、gRNAは、LNPと会合する。いくつかの実施形態では、gRNA/LNPはまた、Cas9またはCas9をコードするmRNAと会合する。

【0179】

いくつかの実施形態では、本発明は、開示されるgRNAおよびLNPのうちのいずれか1つを含む組成物を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、Cas9またはCas9をコードするmRNAをさらに含む。

【0180】

いくつかの実施形態では、LNPは、陽イオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（

10

20

30

40

50

((3 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) プロピル (9 Z , 1 2 Z) - オクタデカ - 9 , 1 2 - ジエノエート) と称される、 (9 Z , 1 2 Z) - 3 - ((4 , 4 - ビス (オクチルオキシ) ブタノイル) オキシ) - 2 - (((3 - (ジエチルアミノ) プロポキシ) カルボニル) オキシ) メチル) プロピルオクタデカ - 9 , 1 2 - ジエノエート、または別のイオン化可能な脂質を含む。例えば、WO / 2 0 1 7 / 1 7 3 0 5 4 号の脂質およびその中に記載される参照文献を参照のこと。いくつかの実施形態では、L N P は、約 4 . 5、5 . 0、5 . 5、6 . 0、または 6 . 5 の R N A ホスフェートに対する陽イオン性脂質アミンのモル比 (N : P) を含む。いくつかの実施形態では、L N P 脂質の文脈において、陽イオン性およびイオン化可能との用語は、互換可能であり、例えば、イオン化可能な脂質は、p H に応じて陽イオン性である。

10

【0181】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される g R N A と会合する L N P は、疾患または障害を治療するための医薬の調製において使用するものである。

【0182】

エレクトロポレーションは、カーゴの送達のための周知の手段であり、本明細書に開示される g R N A のうちのいずれか 1 つの送達のために、任意のエレクトロポレーション方法論が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、本明細書に開示される g R N A および C a s 9 または C a s 9 をコードする m R N A のうちのいずれか 1 つを送達するために使用され得る。

【0183】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示される g R N A のうちのいずれか 1 つをエキスピボで細胞に送達する方法を含み、g R N A は、L N P と会合するか、または L N P と会合しない。いくつかの実施形態では、g R N A / L N P または g R N A はまた、C a s 9 または C a s 9 をコードする m R N A と会合する。

20

【0184】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるガイド R N A 組成物は、単独で、または 1 つ以上のベクターにコードされて、脂質ナノ粒子に製剤化され、または脂質ナノ粒子を介して投与される。例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、2 0 1 7 年 3 月 3 0 日に出願され、2 0 1 7 年 5 月 1 0 日に公開される、「L I P I D N A N O P A R T I C L E F O R M U L A T I O N S F O R C R I S P R / C A S C O M P O N E N T S」という発明の名称の WO / 2 0 1 7 / 1 7 3 0 5 4 号を参照。

30

【0185】

特定の実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるガイド配列のうちのいずれか 1 つ以上を含むガイド R N A のいずれかをコードする D N A または R N A ベクターを含む。いくつかの実施形態では、ガイド R N A 配列に加えて、ベクターは、ガイド R N A をコードしない核酸をさらに含む。ガイド R N A をコードしない核酸としては、限定されないが、プロモーター、エンハンサー、制御配列、および R N A ガイド D N A スクレアーゼ (C a s 9 等のスクレアーゼであってもよい) をコードする核酸が挙げられる。いくつかの実施形態では、ベクターは、c r R N A、t r R N A、または c r R N A および t r R N A をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、s g R N A をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列と、R N A ガイド D N A スクレアーゼをコードする m R N A と、を含み、R N A ガイド D N A スクレアーゼは、C a s スクレアーゼ、例えば、C a s 9 または C p f 1 であってもよい。いくつかの実施形態では、ベクターは、c r R N A、t r R N A をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列と、R N A ガイド D N A スクレアーゼをコードする m R N A と、を含み、R N A ガイド D N A スクレアーゼは、C a s タンパク質、例えば、C a s 9 であってもよい。一実施形態では、C a s 9 は、S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s 由来である (すなわち、S p y C a s 9)。いくつかの実施形態では、c r R N A、t r R N A、または c r R N A および t r R N A (s g R N A であってもよい) をコードするヌクレオチド配列は、天然

40

50

に存在するCRISPR/Cas系由来の反復配列の全てまたは一部が隣接するガイド配列を含むか、またはそれらからなる。crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNAを含むか、またはそれらからなる核酸は、さらにベクター配列を含んでいてもよく、ここで、ベクター配列は、自然状態ではcrRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNAと共に見出されない核酸配列を含むか、またはそれらからなる。

【0186】

この説明および例示的な実施形態は、限定として解釈されるべきではない。本明細書および添付の特許請求の範囲において、特に明記しない限り、本明細書および特許請求の範囲で使用される量、パーセンテージ、または割合、および他の数値を表すすべての数字は、どの場合においても用語「約」によって、まだそれほど非修飾である範囲により修飾されていると理解されるべきである。したがって、そうでないことが示されない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に示される数値パラメータは、得ようとする所望の特性に応じて変化し得る近似値である。非常に少なくとも、および均等論の適用の特許請求の範囲に限定する試みとしてではなく、各数値パラメータは、報告された有効数字の数を考慮して、通常の丸め手法を適用することにより、少なくとも解釈されるべきである。

【0187】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」、および任意の単語の単数形の使用は、明示的かつ明確に1つの指示対象に限定されない限り、複数の指示対象を含めることに留意されたい。本明細書で使用される「含める(include)」という用語およびその文法上の変形は、リスト内のアイテムの列挙が、リストされたアイテムに置換または追加できる他の同様のアイテムを除外しないように、非限定的であることを意図している。

【実施例】

【0188】

以下の実施例は、特定の開示された実施形態を例示するために提供され、本開示の範囲を決して限定するものとして解釈されるべきではない。

【0189】

実施例1—材料および方法

ヌクレアーゼmRNAのインビトロ転写(「IVT」)

N1-メチルプソイド-Uを含有するキャップされたポリアデニル化Streptococcus pyogenes(「Spy」)Cas9 mRNAを、線状プラスミドDNAテンプレートおよびT7 RNAポリメラーゼを用いたインビトロ転写によって生成した。T7プロモーターおよび100ntポリ(A/T)領域を含有するプラスミドDNAを、200ng/μLのプラスミド、2U/μLのXbaI(NEB)、および1x反応緩衝液の条件で、37℃で2時間インキュベートすることによって線状化した。XbaIを、反応物を65℃で20分間加熱することによって不活性化した。線状プラスミドを、シリカマキシスピンカラム(Epoch Life Sciences)を用い、酵素および緩衝塩から精製され、アガロースゲルによって分析し、線状化を確認した。50ng/μLの線状プラスミド、GTP、ATP、CTP、およびN1-メチルプソイド-UTP(Trilink)の各々2mM、10mMのARCA(Trilink)、5U/μLのT7 RNAポリメラーゼ(NEB)、1U/μLのMuriine RNase阻害剤(NEB)、0.004U/μLのInorganic E. coliピロホスファターゼ(NEB)、および1x反応緩衝液の条件で、Cas9修飾mRNAを生成するためのIVT反応物を37℃で4時間インキュベートした。4時間のインキュベーション後、TURBO DNase(ThermoFisher)を、最終濃度が0.01U/μLになるように添加し、反応物をさらに30分間インキュベートして、DNAテンプレートを除去した。MegaClear Transcription Clean-upキットを使用し、製造者のプロトコル(ThermoFisher)に従って、Cas9 mRNAを酵素およびヌクレオチドから精製した。あるいは、Cas9 mRNAをLiCl沈殿法で精製し、いくつかの場合では、これに続いてタンジェンシャルフロー濾過に

よりさらなる精製を行った。転写物濃度を、260nmでの光吸光度を測定することによって決定し（Nanodrop）、転写物をBioanalyzer（Agilent）によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

【0190】

実施例で使用されるCas9 mRNAの転写のための配列は、配列番号500または配列番号501のいずれかを含んでいた。

配列番号500

ATGGATAAGAAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACCTA	
ATTCCGTGGGTGGGCGAGTGATCACGGATGAATACAAAGT	10
GCCGTCCAAAGAAAGTTCAAGGTCCTGGGGAAACACCGATAGA	
CACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTG	
ACTCCGGGCGAAACCGCGAGAAAGCGAACCCGGCTCAAACGTAC	
CGCGAGGGCGACGCTACACCCCGGCGGAAGAAATCGCATCTGC	
TATCTGCAAGAGATCTTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTCG	
ACGACAGCTTCTTCCACCGCCCTGGAAGAAATCTTTCTCTGGT	
GGAGGAGGACAAAGAAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTTGA	
AACATCTGTCGACGAAGTGGCGGTACCAAGAAAGTACCCGA	
CCATCTACCATCTGCGGAAGAAAGTTGGTTTGACTCAACTGA	
CAAGGCCCGACCTCAGATTGATCTACTTTGGCCCTCGCCCAT	20
ATGATCAAATTTCCGCGGACACCTTCTCTGATCGAAGGCGATC	
TGAACCCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTTCATTCA	
ACTGGTGCAGACCTACAAACCAACTGTTCGAAGAAAAACCCA	
ATCAAATGCTAGCGGGCGTCTGATGCCAAAGGCCATCCTGTCCG	
CCCGGGCTGTCTGAAGTCTGCGGGCGCCCTCGAAAAACCTGATCGC	
ACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTTCGGCAAC	
TTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGT	
CCAAATTTTGTACCTGGCCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTC	
AAAGGACACCTACGACGACGACCTTGGACAATTTGTGTGGCA	
CAAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTCTCCTTGCCGCTA	30
AGAACCTTTTCGGACGCAATCTTGTGTCCGATATCCTGCG	
CGTGAAACACCGAAATAACCAAGCGCCGCTTAGCGCCCTCG	
ATGATTAAAGCGGTACGACGAGCATCACCAAGGATCTCACGC	
TGCTCAAAGCGCTCTGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAAGTA	
CAAGGAGATCTTCTTTCGACCAAGTCCAAGAAATGGGTACGCA	
GGGTACATCGATGGAGGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATA	
AGTTTCATCAAGCCCAATCCTGGAAAGAGATGGACGGAAACCGA	
AGAACTGCTGGTCAAGCTGAAACAGGGAGGATCTGCTCCGG	
AAACAGAGAAACCTTTGACAAACGGATCCATTCCCCACCAAGA	
TCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGA	40
GGACTTTTACCCATTCTCTCAAGGACAAACCGGGAAAAAGATC	
GAGAAAAATTCTGACGTTTCCGCAATCCCGTATTACGTGGGGCC	
CCTGGCGCGCGCGGCAATTCTGCGGCTTCTGCGGTGGATGACTAG	
AAAAATCAGAGGAACCAATCACTCCTTGGAAATTTTCGAGGAA	
GTTGTGGATTAAGGGAGCTTCTGGCACAAAGCTTTCATCGAAC	
GAATGACCAACTTTCGACAAAGAAATCTCCCAAAACGAGAAAGGT	
GCTTCTCTAAGCACAGCCCTCCTTTTACGAATACTTCACTGTCT	
TACAAACGAACCTGACTAAAGTGAATAACGTTACTGAAGGAA	
TGAGGAAGCCGGCCCTTTCTGTCTCGGAGAAACAGAAAGAAAGC	
AATTGTCTGATCTGCTGTTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACC	50

G T C A A G C A G C T T A A A G A G G A C T A C T T T C A A G A A G A T C G A G T
G T T T C G A C T C A G T G G A A A T C A G C G G G G T G G A G G A C A G A T T
C A A C G C T T C G C T G G G A A C C T A T C A T G A T C T C C T G A A G A T C
A T C A A G G A C A A G G A C T T C C T T G A C A A C G A G G A G A A C G A G G
A C A T C C T G G A A G A T A T C G T C C T G A C C T T G A C C C T T T T C G A
G G A T C G C G A G A T G A T C G A G G A G A G G C T T A A G A C C T A C G C T
C A T C T C T T C G A C G A T A A G G T C A T G A A A C A A C T C A A G C G C C
G C C G G T A C A C T G G T T G G G G C C G C C T C T C C C G C A A G C T G A T
C A A C G G T A T T C G C G A T A A A C A G A G C G G T A A A A C T A T C C T G
G A T T T C C T C A A A T C G G A T G G C T T C G C T A A T C G T A A C T T T C A 10
T G C A A T T G A T C C A C G A C G A C A G C C T G A C C T T T A A G G A G G A
C A T C C A A A A G C A C A A G T G T C C G G A C A G G G A G A C T C A C T C
C A T G A A C A C A T C G C G A A T C T G G C C G G T T C G C C G G C G A T T A
A G A A G G G A A T T C T G C A A A C T G T G A A G G T G G T C G A C G A G C T
G G T G A A G G T C A T G G G A C G G C A C A A A C C G G A G A A T A T C G T G
A T T G A A A T G G C C C G A G A A A A C C A G A C T A C C C A G A A G G G C C
A G A A A A A C T C C C G C G A A A G G A T G A A G C G G A T C G A A G A A G G
A A T C A A G G A G C T G G G C A G C C A G A T C C T G A A A G A G C A C C C G
G T G G A A A A C A C G C A G C T G C A G A A C G A G A A G C T C T A C C T G T
A C T A T T T G C A A A A T G G A C G G G A C A T G T A C G T G G A C C A A G A 20
G C T G G A C A T C A A T C G G T T G T C T G A T T A C G A C G T G G A C C A C
A T C G T T C C A C A G T C C T T T C T G A A G G A T G A C T C G A T C G A T A
A C A A G G T G T T G A C T C G C A G C G A C A A G A A C A G A G G G A A G T C
A G A T A A T G T G C C A T C G G A G G A G G T C G T G A A G A A G A T G A A G
A A T T A C T G G C G G C A G C T C C T G A A T G C G A A G C T G A T T A C C C
A G A G A A A G T T T G A C A A T C T C A C T A A A G C C G A G C G C G G C G G
A C T C T C A G A G C T G G A T A A G G C T G G A T T C A T C A A A C G G C A G
C T G G T C G A G A C T C G G C A G A T T A C C A A G C A C G T G G C G C A G A
T C T T G G A C T C C C G C A T G A A C A C T A A A T A C G A C G A G A A C G A
T A A G C T C A T C C G G G A A G T G A A G G T G A T T A C C C T G A A A A G C 30
A A A C T T G T G T C G G A C T T T C G G A A G G A C T T T C A G T T T T A C A
A A G T G A G A G A A A T C A A C A A C T A C C A T C A C G C G C A T G A C G C
A T A C C T C A A C G C T G T G G T C G G T A C C G C C C T G A T C A A A A A G
T A C C C T A A A C T T G A A T C G G A G T T T G T G T A C G G A G A C T A C A
A G G T C T A C G A C G T G A G G A A G A T G A T A G C C A A G T C C G A A C A
G G A A A T C G G G A A A G C A A C T G C G A A A T A C T T C T T T T A C T C A
A A C A T C A T G A A C T T T T T C A A G A C T G A A A T T A C G C T G G C C A
A T G G A G A A A T C A G G A A G A G G C C A C T G A T C G A A A C T A A C G G
A G A A A C G G G C G A A A T C G T G T G G G A C A A G G G C A G G G A C T T C
G C A A C T G T T C G C A A A G T G C T C T C T A T G C C G C A A G T C A A T A 40
T T G T G A A G A A A A C C G A A G T G C A A A C C G G C G G A T T T T C A A A
G G A A T C G A T C C T C C C A A A G A G A A A T A G C G A C A A G C T C A T T
G C A C G C A A G A A A G A C T G G G A C C C G A A G A A G T A C G G A G G A T
T C G A T T C G C C G A C T G T C G C A T A C T C C G T C C T C G T G G T G G C
C A A G G T G G A G A A G G G A A A G A G C A A A A A G C T C A A A T C C G T C
A A A G A G C T G C T G G G G A T T A C C A T C A T G G A A C G A T C C T C G T
T C G A G A A G A A C C C G A T T G A T T T C C T C G A G G C G A A G G G T T A
C A A G G A G G T G A A G A A G G A T C T G A T C A T C A A A C T C C C C A A G
T A C T C A C T G T T C G A A C T G G A A A A T G G T C G G A A G C G C A T G C
T G G C T T C G G C C G G A G A A C T C C A A A A A G G A A A T G A G C T G G C 50

CTTGCCCTAGCAAGTACGTCAACTTCTCTCTATCTTTGCTTCG
CACTACGAAAAAACTCAAAGGGTCAACCGGAAGATAACGAAC
AGAAAGCAGCTTTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCATTATCTGGA
TGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGGTG
ATCCTCGCCGACGCCCAACCTTCGACAAAGTCCCTGTCTGGCCCT
ACAAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCCGA
GAACATTATCCACTTTGTTCAACCCCTGACTAACCTTGGGAGCC
CCAGCCGCGCTTCAAGTACTTTCGATACTACTATCGATCGCA
AAAGATACACGTCACCAAGGAAGTTCTTGGACGCGGACCCCT
GATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAAACTAGGATC
GATCTGTCTGCAGCTGGGTGGCGAT

10

配列番号501

GGGTCCCAGTCGGCGTCCAGCGGGCTCTTGCTTTGTTTCGTG
TGTGTGTCTGTTTGCAGGCCCTTATTTCGGATCCGCCACCATGG
ACAAAGAAAGTACAGCATCGGACTTGGACATCGGAACAAACAG
CGTCGGATGGGCGAGTCATCACAGACGAATACAAAGGTCCCG
AGCAAAGAAAGTTCAAAGGTCCCTGGGAAACACAGACAGACACA
GCATCAAAGAAAGAACCTGATCGGGAGCACCTGCTGTTTCGACAG
CGGAGAAACAGCAGAAAGCAAACAAAGACTGAAGAGAAACAGCA
AGAAAGAAAGATACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACC
TGCAGGAAATCTTTCAGCAAACGAAAATGGCAAAGGTTCGACGA
CAGCTTCTTCCACAGACTTGGAAAGAAAGCTTCCCTGGTTCGAA
GAAGACAAAGAAAGCACGAAAGACACCCCGATCTTTCGGAAACAA
TCGTCTGACGAAGTCTGCATACCAACGAAAGTACCCGACCAAT
CTACCACCTGAGAAAGAAAGCTGGTTCGACAGCACAGACCAAG
GCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACCTGGCACCAATGA
TCAAAGTTTCAGAGGACACTTCCCTGATCGAAAGGAGACCTGAA
CCCGGACAAACAGCGACGTCGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTG
GTCCAGACATACAAACCAGCTGTTTCGAAGAAACCCGATCA
ACGCAAAGCGGAGTCTGACGCAAAAGGCAAATCCTGAGCGCAAG
ACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAG
CTGCCCGGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTG
TCGCACCTGAGCCTGGGACTGACACCCGAACTTCAAAGAGCAA
CTTTCGACCTGGCGAGAAAGACGCAAAAGCTGCGAGCTGAGCAA
GACACATACGACGACGACCTGGACAAACCTGCTGGCACAGA
TCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCCCTGGCAGCAAAGAA
CCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCT
AACACAGAAATCACAAAGGCACCCGCTGAGCGCAAGCATGA
TCAAAGAGATACGACGAACACCAACCAAGGACCTGACACTGCT
GAAGGCACCTGGTTCAGACAGCAGCTGCCCGGAAAGTACAAAG
GAAATCTTCTTTCGACCAAGAGCAAGAAACGGATACGCGAGGAT
ACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCACAAAGTT
CATCAAAGCCGATCCTGGAAAGAGATGGACGGAAACAGAAAGAA
CTGCTGGTCAAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGC
AGAGAAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCGCACCAAGATCCA
CCTGGGAGAACTGCAACGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGAC
TTCTACCCGTTTCTGAAAGGACAAACAGAGAAAGATCGAAA
AGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCCGCT
GGCAAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAAGAAAG

20

30

40

50

AGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTTCGAAGAAAGTCGT
TCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAAAGAAAT
GACAAACTTTCGACAAGAACCTGCGCAACGAAAAAGGTCTCTG
CCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCACAGTCTACA
ACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTCAACAGAAAGGAATGAG
AAAGCCGGGCATTTCCTGAGCGGAGAAACAGAAAGAAAGGCAATC
GTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAACAGTCA
AGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAAATGCTT
CGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTTCGAAAGACAGATTCAAC
GCAAGCCTGGGAACATACACACGACCTGCTGAAGATCATCA
AGGACAAGGACTTTCCTGGACAACGAAAGAAACGAAAGACAT
CCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTTCGAAGAC
AGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACC
TGTTTCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAA
ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAAC
GGAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACT
TCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTTCATGCA
GCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAAGGAAGACATC
CAGAAAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCAACG
AACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAAATCAAGAA
GGGAATCCTGCAAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACCTGGTC
AAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGAAACATCGTTCATCG
AAATGGCAAGAGAAACCAAGACAAACACAGAAAGGGACAGAA
GAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAAGAAAGGAATC
AAGGAACCTGGGAAGGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCTG
AAAACACACAGCTGCAAGAACGAAGAAAGCTGTACCTGTACTA
CCTGCAAGAACGGAAGAGACATGTACGTTCGACCAAGGAACCTG
GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCAACATCG
TCCCGCAGAGCTTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAA
GGTCTCTGACAAGAAAGCGACAAAGAAACAGAGGAAGAGCGAC
AACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTGTCAAAGAAAGATGAAGAACT
ACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAG
AAAGTTTCGACAAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTG
AGCGAACCTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGG
TCGAACAACAGACAGATCACAAAGCACGTCGCGACAGATCCT
GGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAAACGACAAAG
CTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGC
TGGTCAAGCGACTTTCAGAAAGGACTTTCAGATTCTACAAAGGT
CAGAGAAATCAACAACTACCAACACGACACAGCAGCATAC
CTGAACGCGAGTCGTGGAACAGCAGCTGATCAAGAAAGTACC
CGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTACAAAGGT
CTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAACAGGAA
ATCGGAAGAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACA
TCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGGCAAAACGG
AGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAA
ACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGACTTTCGCAA
CAGTCAGAAAGGTCTCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACATCGT
CAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAA
AGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAA
GAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAAGTACGGAGGATTTCGA

C A G C C C G A C A G T C G C A T A C A G C G T C C T G G T C G T C G C A A A G
G T C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G C G T C A A G G
A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C A T G G A A A G A A G C A G C T T C G A
A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C T G G A A G C A A A G G G A T A C A A G
G A A G T C A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C G A A G T A C A
G C C T G T T C G A A C T G G A A A A C G G A A G A A A G A G A A T G C T G G C
A A G C G C A G G A G A A C T G C A G A A G G G A A A C G A A C T G G C A C T G
C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T C C T G T A C C T G G C A A G C C A C T
A C G A A A A G C T G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C G A A C A G A A
G C A G C T G T T C G T C G A A C A G C A C A A G C A C T A C C T G G A C G A A
A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A A T T C A G C A A G A G A G T C A T C C
T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C A A G G T C C T G A G C G C A T A C A A
C A A G C A C A G A G A C A A A G C C G A T C A G A G A A C A G G C A G A A A A C
A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T G A C A A A C C T G G G A G C A C C G G
C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C A C A A C A A T C G A C A G A A A G A G
A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G T C C T G G A C G C A A C A C T G A T C
C A C C A G A G C A T C A C A G G A C T G T A C G A A A C A A G A A T C G A C C
T G A G C C A G C T G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A G C C C G A A G A A
G A A G A G A A A G G T C T A G C T A G C C A T C A C A T T T A A A A G C A T C
T C A G C C T A C C A T G A G A A T A A G A G A A A G A A A A T G A A G A T C A
A T A G C T T A T T C A T C T C T T T T T C T T T T T C G T T G G T G T A A A G
C C A A C A C C C T G T C T A A A A A C A T A A A T T T C T T T A A T C A T T
T T G C C T C T T T T C T C T G T G C T T C A A T T A A T A A A A A A T G G A A
A G A A C C T C G A G

10

20

【0191】

脂質ナノ粒子（LNP）製剤

一般に、脂質ナノ粒子の構成要素を、種々のモル比で、100%エタノールに溶解した。RNAカーゴ（例えば、Cas9 mRNAおよびsgRNA）を25mMのクエン酸塩、100mMのNaCl（pH5.0）に溶解して、約0.45mg/mLのRNAカーゴ濃度を得た。実施例2-4で使用されるLNPは、3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（9Z，12Z）-オクタデカ-9，12-ジエノエートとも称される、イオン化可能な脂質（（9Z，12Z）-3-（（4，4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9，12-ジエノエート、コレステロール、DSPC、およびPEG2k-DMGをそれぞれ50：38：9：3のモル比で含んでいた。LNPを、約6のRNAホスフェートに対する脂質アミンの（N：P）モル比、gRNAとmRNAの重量比1：1で製剤化した。実施例2～4で使用したLNPは、配列番号501に由来するCas9 mRNAを含有していた。

30

40

【0192】

クロスフロー技術を使用し、エタノール中の脂質を2体積のRNA溶液および1体積の水と衝突噴流混合することによって、LNPを調製した。エタノール中の脂質を、混合交差部（mixing cross）により、2体積のRNA溶液と混合した。第4の水の流れを、ライン内のティーを通る交差部の出口流と混合した（WO2016010840号の図2を参照）。LNPを室温で1時間保持し、さらに水で希釈した（約1：1v/v）。希釈したLNPを、フラットシートカートリッジ（Sartorius、100kD MWCO）でタンジェンシャルフロー濾過を用いて濃縮し、次いで、PD-10脱塩カラム（GE）を用い、緩衝液を50mMのTris、45mMのNaCl、5%（w/v）のスクロース、pH7.5（TSS）に交換した。次いで、得られた混合物を0.2μ

50

mの滅菌フィルターを使用して濾過した。最終LNPを、さらなる使用まで4℃または-80℃で保存した。

【0193】

ヒトHAO1ガイド設計およびカニクイザル相同性ガイド設計を有するヒトHAO1
目的の領域においてPAMを同定するために、ヒト参照ゲノム（例えば、hg38）および目的のユーザが規定したゲノム領域（例えば、HAO1タンパク質コードエクソン）を用い、初期のガイド選択をインシリコで行った。同定された各PAMについて、分析を行い、統計を報告した。gRNA分子をさらに選択し、当該技術分野において公知のいくつかの基準（例えば、GC含有量、予測されるオンターゲット活性、および潜在的オフターゲット活性）に基づいてランク付けした。

10

【0194】

合計146個のガイドRNAを、エクソン1、2、3、4、5、6、7、および8内のタンパク質コード領域を標的とするHAO1（ENSG00000101323）に対して設計した。ガイドおよび対応するゲノム座標を上を提供する（表1）。ガイドRNAのうち72個は、カニクイザルHAO1と100%の相同性を有する。

【0195】

Cas9（mRNA／タンパク質）およびインビトロでのガイドRNA送達

Spy Cas9を構成的に発現するヒト胚性腎臓腺癌細胞株HEK293（「HEK293_Cas9」）を、10%のウシ胎児血清および500μg/mlのG418を追加したDMEM培地中で培養した。トランスフェクションの20時間前に、細胞を96ウェルプレート中で、10,000細胞／ウェルの密度でプレーティングした（トランスフェクション時に約70%のコンフルエント）。製造者のプロトコルに従って、細胞を、Lipofectamine RNAiMAX（ThermoFisher、カタログ番号13778150）でトランスフェクトした。細胞を、個々のガイド（25nM）、tRNA（25nM）、Lipofectamine RNAiMAX（0.3μL／ウェル）、およびOptiMemを含むリボプレックスによってトランスフェクトした。

20

【0196】

ヒト肝細胞癌細胞株HUH7（Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank、カタログ番号JCRB0403）を、10%のウシ胎児血清を追加したDMEM培地中で培養した。トランスフェクションの20時間前に、細胞を96ウェルプレート中で、15,000細胞／ウェルの密度でプレーティングした（トランスフェクション時に約70%のコンフルエント）。製造者のプロトコルに従って、細胞を、Lipofectamine MessengerMAX（ThermoFisher、カタログ番号LMRNA003）でトランスフェクトした。細胞を、Spy Cas9 mRNA（100ng、配列番号500）、MessengerMAX（0.3μL／ウェル）およびOptiMemを含有するリボプレックス、次いで、個々のガイド（25nM）、トレーサーRNA（25nM）、MessengerMAX（0.3μL／ウェル）およびOptiMemを含有する別個のリボプレックスを用い、順次トランスフェクトした。

30

【0197】

初代ヒト肝臓肝細胞（PHH）（Gibco、ロット番号Hu8249およびHu8298）ならびに初代カニクイザル肝臓肝細胞（PCH）（Gibco、ロット番号Cy367）を解凍し、追加物質（Gibco、カタログ番号CM7500）を含む肝細胞解凍培地に再懸濁させ、次いで、遠心分離した。上清を廃棄し、ペレット化した細胞を、肝細胞プレーティング培地および追加物質バック（Invitrogen、カタログ番号A1217601およびCM3000）に再懸濁させた。細胞を計数し、PHHについては33,000細胞／ウェル、PCHについては50,000細胞／ウェルの密度でBio-coat collagen Iでコーティングした96ウェルプレート（ThermoFisher、カタログ番号877272）上にプレーティングした。プレーティングした細胞を、37℃および5%CO₂雰囲気での組織培養インキュベーター中で5時間放置し、

40

50

接着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成について調べ、肝細胞培養培地（Takara、カタログ番号Y20020および／またはInvitrogen、カタログ番号A1217601およびCM4000）で1回洗浄した。

【0198】

dgRNAを利用した試験のために、個々のcrRNAおよびtrRNAを、等量の試薬を混合し、95℃で2分間インキュベートし、室温まで冷却することによって、予めアニーリングしておいた。予めアニーリングしたcrRNAおよびtrRNAからなるデュアルガイド（dgRNA）を、Spy Cas9タンパク質と共にインキュベートし、リボ核タンパク質（RNP）複合体を形成した。製造者のプロトコルに従って、細胞を、Lipofectamine RNAiMAX（ThermoFisher、カタログ番号13778150）でトランスフェクトした。Spy Cas9（10nM）、個々のガイド（10nM）、トレーサーRNA（10nM）、Lipofectamine RNAiMAX（1.0μL／ウェル）およびOptiMemを含むRNPによって、細胞をトランスフェクトした。

10

【0199】

初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞を、以下にさらに記載されるように、LNPでも処理した。LNPで処理する前に、細胞株を37℃、5%CO₂で48時間インキュベートした。LNPを、6%カニクイザル血清を含む培地中、37℃で10分間インキュベートし、本明細書でさらに提供される量で細胞に投与した。

【0200】

20

ゲノムDNA単離

HEK293、Cas9、HUH7、PHH、およびPCHでトランスフェクトした細胞を、トランスフェクション後、24、48、72、または96時間で回収した。gDNAを、製造者のプロトコルに従って、96ウェルプレートの各々のウェルから50μL／ウェルのBuccalAmp DNA Extraction溶液（Epicentre、カタログ番号QE09050）を用いて抽出した。全てのDNA試料に対し、本明細書に記載されるように、PCRおよびその後のNGS分析を行った。

【0201】

次世代シーケンシング（「NGS」）およびオンターゲット切断効率の分析

ゲノム中の標的位置における編集効率を定量的に決定するために、ディープシーケンシングを使用して、遺伝子編集によって導入された挿入および欠失（「インデル」）の存在を同定した。目的の遺伝子（例えば、HAO1）内の標的部位周辺でPCRプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅させた。プライマー配列設計は、現場で標準として行われた。

30

【0202】

シーケンシングのために必要な化学的性質を付加するために製造者のプロトコル（Illumina）に従って追加のPCRを実施した。アンプリコンをIllumina MiSeq装置でシーケンシングした。低品質スコアを有する読み取りを除去した後に、読み取りをヒト参照ゲノム（例えば、hg38）とアラインメントした。読み取り値を含む得られたファイルを、参照ゲノム（BAMファイル）に対してマッピングし、目的の標的領域と重なり合った読み取り値を選択し、野生型の読み取り値の数と、挿入または欠失（「インデル」）を含む読み取り値の数を計算した。

40

【0203】

編集割合（例えば、「編集効率」または「編集率」）は、野生型を含む配列読み取りの総数に対する、挿入または欠失（「インデル」）を含む配列読み取りの総数であると定義される。

【0204】

定量PCRによるHAO1転写物分析

実施例3にさらに記載されるように、初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞を、表2から選択された修飾ガイドを用いて製剤化されたLNPで処理した。LNPを、3

50

% カニクイザル血清を含む培地 (Takara、カタログ番号 Y20020) 中、37℃で10分間インキュベートした。インキュベーション後、LNPを、ヒトまたはカニクイザル肝細胞に添加した。処理から21日後、培地を除去し、50 μ L/ウェルのTripLeE (Gibco、カタログ番号 12563-029) を細胞に添加し、次いで37℃で10分間インキュベートした。50 μ L/ウェルの培地を細胞に添加して、TripLeEをクエンチし、細胞をプレートから解離させた。次いで、細胞を2,000 rpmでペレットになるまで遠心分離し、上清を試料から吸引した。mRNAを単離するために、Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen、カタログ番号 74106) を使用した。製造者のプロトコルに従って、RNeasy Mini Kitの手順を完了した。RNAを、Nanodrop 8000 (ThermoFisher Scientific、カタログ番号 ND-8000-GL) を使用して定量化した。製造者のプロトコルに従って、RNA定量化の手順を完了した。使用前に、RNA試料を-20℃で保存した。

10

【0205】

HAO1 転写物レベルを評価するために定量PCRを行った。Taqman RNA-to-Ct 1-Step Kit (ThermoFisher Scientific、カタログ番号 4392938) を使用してPCR反応物を作製した。製造者のプロトコルに従って、反応の設定を完了した。HAO1 (ThermoFisher Scientific、カタログ番号 4351372、転写物のUniGene ID Hs01023324__g1) および18S (ThermoFisher Scientific、カタログ番号 4319413E) を標的とする定量PCRプローブをPCR反応で使用了。製造者のプロトコルに従って、StepOnePlus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific、カタログ番号 4376600) を使用して、リアルタイムPCR反応および転写物の定量化を実行した。

20

【0206】

ウェスタンブロットによるグリコレートオキシダーゼ (GO) タンパク質分析

実施例3にさらに記載されるように、初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞を、表2から選択された修飾ガイドを用いて製剤化されたLNPで処理した。LNPを、3% カニクイザル血清を含む培地 (Takara、カタログ番号 Y20020) 中、37℃で10分間インキュベートした。インキュベーション後、LNPを、ヒトまたはカニクイザル肝細胞に添加した。トランスフェクションから21日後、培地を除去し、細胞を、50 μ L/ウェルのRIPA緩衝液 (Boston Bio Products、カタログ番号 BP-115) と、完全なプロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma、カタログ番号 11697498001)、1mMのDTT、および250 U/mlのBenzonase (EMD Millipore、カタログ番号 71206-3) からなる新しく添加したプロテアーゼ阻害剤混合物で溶解させた。細胞を氷上で30分間維持し、そのときに、NaCl (1M最終濃度) を添加した。細胞溶解物を完全に混合し、氷上で30分間保持した。全細胞抽出物 (「WCE」) をPCRプレートに移し、遠心分離してペレットデブリにした。Bradfordアッセイ (Bio-Rad、カタログ番号 500-0001) を使用して、溶解物のタンパク質含有量を評価した。製造者のプロトコルに従って、Bradfordアッセイの手順を完了した。使用前に、抽出物を-20℃で保存した。

30

40

【0207】

AGT欠損マウスを、実施例4にさらに記載されるように、選択ガイドを用いて製剤化されたLNPで処理した。処理後のマウスから肝臓を採取し、タンパク質抽出のために60mg分を使用した。試料をビーズチューブ (MP Biomedical、カタログ番号 6925-500) に入れ、600 μ L/試料のRIPA緩衝液 (Boston Bio Products、カタログ番号 BP-115) と、完全なプロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma、カタログ番号 116974500) からなる新しく添加したプロテアーゼ阻害剤混合物で溶解させ、5.0 m/秒で均質化した。次いで、試料を14,00

50

0 R P M、4℃で10分間遠心分離し、液体を新しい管に移した。最終的な遠心分離を14,000 R P Mで10分間実施し、試料を上述のB r a d f o r dアッセイを使用して定量化した。

【0208】

ウェスタンブロットを実施して、G Oタンパク質レベルを評価した。溶解物をL a e m m l i緩衝液と混合し、95℃で10分間かけて変性させた。製造者のプロトコルに従って、4～12%のB i s - T r i sゲル（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c、カタログ番号N P 0 3 2 3 B O X）上でN u P a g e系を使用してウェスタンブロットを実行し、続いて0.45 μmのニトロセルロース膜（B i o - R a d、カタログ番号1620115）上に濡れた状態で移した。移した後、膜を水で完全にすすぎ、P o n c e a u S溶液（B o s t o n B i o P r o d u c t s、カタログ番号S T - 180）で染色し、完全に均一な移動を確認した。ブロットを、室温で、ラボロッカー上で30分間、T B S中の5%の粉乳を使用してブロックした。ブロットをT B S Tですすぎ、T B S T中1：1000でウサギα-G Oポリクローナル抗体（G e n e t e x、カタログ番号G T X 8 1 1 4 4）でプローブした。インビトロ細胞溶解物を用いたブロットについては、T B S T中で1：1000でビンキュリンをローディング対照（A b c a m、a b 1 3 0 0 0 7）として使用し、G O一次抗体と同時にインキュベートした。インビボマウス肝臓抽出物を用いたブロットについては、T B S T中で1：1000でα-チューブリンをローディング対照（A b c a m、a b 7 2 9 1）として使用し、G O一次抗体と同時にインキュベートした。ブロットを袋に密封し、ラボロッカー上で、4℃で一晩保持した。インキュベーション後、ブロットを、T B S T中でそれぞれ5分間かけて3回すすぎ、T B S T中でそれぞれ1：12,500でマウスおよびウサギに対する二次抗体（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c、カタログ番号P I 3 5 5 1 8およびP I S A 5 3 5 5 7 1）を用い、室温で30分間プローブした。インキュベーション後、ブロットをT B S T中で各5分間かけて3回、およびP B Sで2回すすいだ。ブロットを可視化し、L i c o r O d y s s e yシステムを使用して分析した。

10

20

【0209】

実施例2—スクリーニングおよびガイド定量化

複数の細胞型におけるH A O 1ガイドの交差スクリーニング

ヒトH A O 1を標的とするガイド、およびカニクイザルにおける相同性を有するものを、H E K 2 9 3 _ _ C a s 9およびH U H 7細胞株、および実施例1に記載したように初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞にトランスフェクトした。各細胞型にわたって、各ガイド配列を含むc r R N Aについて編集率を決定した。4種類全ての細胞株において、表1のガイド配列のスクリーニングデータを以下に列挙する（表7 B～10）。

30

【0210】

表7 Bは、S p y C a s 9タンパク質を構成的に過剰発現するヒト腎臓腺癌細胞株H E K 2 9 3 _ _ C a s 9において、H A O 1および対照d g R N A（表7 A）についての編集%、挿入（I n s）%、および欠失（D e l）%についての3重試料の平均および標準偏差を示す。

【0211】

40

【表 6】

表 7 A : 対照非 H A O 1 ガイド

ガイド ID	配列	配列 番号
CR001261	GCCAGACUCCAAGUUCUGCC	147
CR001262	UAAGGCCAGUGGAAAGAAUU	148
CR001263	GGCAGCGAGGAGUCCACAGU	149
CR001264	UCLUUCCACUGGCCUUAACC	150

【 0 2 1 2 】

【表 7 - 1】

表 7 B : HEK293_Cas9 細胞に送達された crRNA についての HAOI 編集データ						
ガイド ID	編集平均%	編集標準偏差%	挿入平均%	挿入標準偏差%	欠失平均%	欠失標準偏差%
CR001261	57.63	7.78	44.39	5.77	13.24	2.01
CR001262	45.05	4.72	5.06	0.77	39.99	4.11
CR001263	20.34	6.88	1.77	0.85	18.56	6.03
CR001264	51.21	14.70	10.33	2.35	40.88	12.52
CR002857	10.81	1.99	1.98	0.78	8.83	1.21
CR002858	14.04	6.71	2.58	1.42	11.45	5.33
CR002859	10.67	4.25	2.71	0.97	7.96	3.27
CR002860	32.75	8.30	7.28	2.18	25.47	6.13
CR002861	42.99	6.61	7.29	1.37	35.70	5.28
CR002862	33.06	8.57	7.44	0.56	25.62	8.02
CR002863	41.26	18.14	3.94	1.72	37.33	16.42
CR002864	41.13	5.50	2.10	0.34	39.03	5.17
CR002865	39.36	11.78	26.95	7.67	12.41	4.17
CR002866	23.78	6.61	5.81	1.53	17.97	5.16
CR002867	17.93	1.80	9.03	1.40	8.90	0.41
CR002868	4.31	1.19	0.16	0.06	4.16	1.19
CR002869	11.20	5.33	1.52	0.62	9.68	4.71
CR002870	13.00	4.44	4.62	1.92	8.38	2.58
CR002871	6.05	1.29	0.75	0.47	5.30	1.01
CR002872	5.01	1.21	0.26	0.06	4.75	1.25
CR002873	17.86	3.15	3.45	1.13	14.40	2.27
CR002874	11.10	2.35	2.14	0.66	8.97	1.70
CR002875	2.35	0.29	0.16	0.05	2.18	0.24
CR002876	24.01	8.59	2.67	0.98	21.34	7.61
CR002877	34.59	9.11	4.30	1.35	30.29	7.75
CR002878	44.53	9.84	32.55	6.27	11.98	3.73
CR002879	23.90	9.03	3.58	1.40	20.32	7.63
CR002880	25.94	10.25	5.09	2.32	20.84	7.93
CR002881	14.07	3.76	3.08	0.98	10.98	2.79
CR002882	9.49	2.54	0.98	0.34	8.51	2.27
CR002883	24.68	8.44	2.47	0.84	22.22	7.61
CR002884	24.90	4.72	4.84	1.07	20.06	4.06

10

20

30

40

【表 7 - 2】

CR002885	4.48	1.31	0.71	0.45	3.77	0.86
CR002886	21.81	4.79	1.42	0.21	20.39	4.60
CR002887	30.22	8.87	4.75	1.78	25.47	7.16
CR002888	16.67	3.86	3.01	0.82	13.66	3.09
CR002889	27.12	4.44	7.22	1.14	19.89	3.43
CR002890	4.99	1.62	1.24	0.36	3.75	1.27
CR002892	1.78	0.08	0.24	0.06	1.55	0.04
CR002893	2.52	0.27	0.24	0.06	2.27	0.26
CR002894	48.00	9.08	5.08	1.43	42.92	9.25
CR002895	45.92	9.21	27.11	5.31	18.82	3.92
CR002896	36.73	11.14	14.03	4.17	22.71	7.54
CR002897	15.08	4.28	10.19	3.31	4.89	0.97
CR002898	9.39	1.61	0.75	0.21	8.64	1.40
CR002899	14.00	4.15	6.18	2.37	7.82	1.79
CR002900	32.51	5.89	6.27	0.76	26.24	5.15
CR002901	11.64	5.30	3.25	1.82	8.39	3.53
CR002902	5.28	1.89	1.37	0.67	3.91	1.23
CR002903	5.43	1.24	2.57	0.59	2.86	0.65
CR002904	22.22	6.33	4.65	1.26	17.57	5.09
CR002905	18.99	6.09	5.64	1.94	13.35	4.17
CR002906	21.81	7.92	7.55	2.36	14.26	5.58
CR002907	10.93	4.07	1.74	0.57	9.20	3.52
CR002908	12.03	4.13	3.15	1.11	8.88	3.03
CR002909	6.46	1.01	2.35	0.55	4.11	0.47
CR002910	19.20	7.31	6.37	2.18	12.83	5.16
CR002911	22.08	4.51	7.84	1.25	14.24	3.26
CR002912	31.20	10.73	1.80	0.25	29.39	10.48
CR002913	7.47	2.79	4.37	1.88	3.10	0.92
CR002914	3.35	1.26	0.21	0.13	3.14	1.13
CR002915	25.49	10.72	5.31	2.22	20.17	8.50
CR002916	4.02	0.76	0.48	0.11	3.54	0.64
CR002917	5.66	1.08	0.64	0.41	5.02	1.17
CR002918	1.73	0.05	0.07	0.02	1.66	0.04
CR002919	8.90	1.36	1.28	0.40	7.62	0.98
CR002920	10.71	3.10	1.34	0.33	9.37	2.86

10

20

30

40

【表 7 - 3】

CR002921	17.36	5.85	1.60	0.47	15.76	5.38
CR002922	28.05	4.17	7.66	1.25	20.40	2.94
CR002923	13.61	3.45	6.18	1.63	7.43	1.83
CR002924	9.00	3.04	2.42	0.79	6.58	2.30
CR002925	4.85	1.26	0.73	0.15	4.12	1.21
CR002926	8.97	1.73	0.93	0.35	8.04	1.42
CR002927	23.16	7.11	12.70	3.73	10.46	3.39
CR002928	10.44	3.86	2.20	0.73	8.24	3.14
CR002929	28.18	7.04	1.66	0.59	26.52	6.84
CR002930	21.56	7.43	10.51	3.62	11.05	3.81
CR002931	28.08	5.00	2.87	1.90	25.20	3.10
CR002932	22.21	5.93	6.22	2.01	15.98	4.11
CR002933	34.74	6.55	16.32	2.48	18.43	4.09
CR002934	9.78	2.17	1.63	0.24	8.15	1.97
CR002935	16.22	3.29	3.39	0.75	12.84	2.57
CR002936	15.18	2.98	6.73	1.39	8.46	1.61
CR002937	17.39	0.89	3.88	0.45	13.50	0.47
CR002938	23.30	5.53	4.92	0.97	18.37	4.57

10

20

【0 2 1 3】

表 8 は、ヒト肝細胞癌細胞株 H U H 7 において、S p y C a s 9 mRNA と共トランスフェクトされた試験 H A O 1 および対照 d g R N A (表 7 A) についての編集 %、挿入 (I n s) %、および欠失 (D e l) % を示す。N = 1。

【0 2 1 4】

30

【表 8 - 1】

表 8 : HUH 7 細胞に送達された c r RNA についての HAO 1 編集データ

ガイド ID	編集%	挿入%	欠失%
CR001261	91.58	67.48	24.11
CR001262	66.17	5.97	60.19
CR001263	65.92	3.25	62.67
CR001264	86.57	15.37	71.19
CR002857	7.89	1.42	6.47
CR002858	40.74	5.60	35.14
CR002859	37.04	9.02	28.02
CR002860	32.18	7.09	25.09
CR002861	32.23	5.11	27.12
CR002862	28.20	5.19	23.01
CR002863	56.91	5.59	51.31
CR002864	27.47	1.18	26.29
CR002865	39.30	26.79	12.51
CR002866	29.67	8.06	21.61
CR002867	26.79	11.42	15.36
CR002868	11.58	0.40	11.18
CR002869	18.31	2.68	15.64
CR002870	17.16	5.69	11.47
CR002871	19.28	1.29	17.99
CR002872	12.78	0.32	12.46
CR002873	48.63	7.70	40.93
CR002874	22.37	2.34	20.03
CR002875	5.83	0.34	5.50
CR002876	32.63	4.29	28.34
CR002877	46.74	4.46	42.28
CR002878	49.04	37.05	12.00
CR002879	42.67	5.64	37.02
CR002880	57.41	11.34	46.07
CR002881	36.09	8.29	27.80
CR002882	31.37	2.18	29.18
CR002883	59.63	8.08	51.55
CR002884	56.45	10.28	46.16
CR002885	7.34	1.13	6.20

10

20

30

40

【表 8 - 2】

CR002886	45.72	2.68	43.04
CR002887	64.77	8.09	56.68
CR002888	49.58	5.66	43.92
CR002889	27.43	8.68	18.74
CR002890	20.31	5.84	14.47
CR002891	48.18	2.40	45.78
CR002892	2.40	0.58	1.82
CR002893	4.87	0.38	4.49
CR002894	41.82	3.45	38.38
CR002895	37.36	17.03	20.34
CR002896	62.99	21.92	41.07
CR002897	25.96	14.78	11.18
CR002898	13.82	1.32	12.51
CR002899	33.32	10.36	22.97
CR002900	38.69	9.25	29.44
CR002901	30.65	7.61	23.03
CR002902	31.83	7.16	24.67
CR002903	31.85	8.09	23.76
CR002904	66.95	18.97	47.98
CR002905	37.51	12.24	25.28
CR002906	43.69	13.14	30.55
CR002907	14.14	2.15	11.99
CR002908	32.07	5.31	26.76
CR002909	24.19	7.83	16.37
CR002910	44.37	12.87	31.49
CR002911	32.24	9.40	22.84
CR002912	60.89	2.43	58.45
CR002913	32.21	20.12	12.09
CR002914	19.13	0.61	18.51
CR002915	45.51	5.22	40.29
CR002916	9.61	0.63	8.97
CR002917	12.41	1.44	10.97
CR002918	2.03	0.08	1.95
CR002919	24.33	3.63	20.71
CR002920	16.86	2.86	14.00

10

20

30

40

【表 8 - 3】

CR002921	40.74	2.99	37.75
CR002922	47.63	14.63	33.00
CR002923	13.50	6.52	6.98
CR002924	43.59	9.85	33.74
CR002925	42.21	5.16	37.05
CR002926	25.31	2.67	22.65
CR002927	62.52	27.90	34.62
CR002928	32.58	5.67	26.91
CR002929	75.94	1.83	74.11
CR002930	52.99	19.69	33.30
CR002931	47.32	2.87	44.45
CR002932	56.46	9.72	46.73
CR002933	47.74	22.21	25.53
CR002934	50.50	8.15	42.35
CR002935	43.84	6.48	37.36
CR002936	40.36	16.67	23.69
CR002937	44.96	6.27	38.68
CR002938	43.43	6.30	37.12
CR006092	65.7	22.4	43.8
CR006093	70	4.4	66.1
CR006094	31.5	3	28.8
CR006095	32.3	12.8	20
CR006096	0.5	0	0.5
CR006097	0.2	0.1	0.2
CR006098	19.8	4.4	15.6
CR006099	32.8	9.2	24.3
CR006100	18.3	9.6	9.1
CR006101	43.7	3.3	40.9
CR006102	33.7	17.9	16.2
CR006103	63.1	5.5	58.4
CR006104	23.4	2.2	21.6
CR006105	39	22.2	17.4
CR006106	39.9	22.1	18.4
CR006107	48	24.4	24.3
CR006108	43.3	2.8	41.2

10

20

30

40

【表 8 - 4】

CR006109	51.8	4.6	47.5
CR006110	11.3	5.5	5.9
CR006111	4.4	0.8	3.7
CR006112	32.1	3.1	29.5
CR006113	30	4.8	25.9
CR006114	63	24.7	39.2
CR006115	61.3	15.1	46.6
CR006116	56.6	19	38.4
CR006117	22.8	7.1	16
CR006118	48.3	20.2	28.6
CR006119	21.8	3.3	18.6
CR006120	31.1	13.7	17.8
CR006121	36.5	16.9	20.3
CR006122	36.5	6.8	30
CR006123	49.8	15.1	35.6
CR006124	60.1	5.7	55.3
CR006125	58.1	22.5	36.8
CR006126	69	6.8	62.8
CR006127	46.7	7.9	39.8
CR006128	22.4	2.1	20.5
CR006129	44.6	13.2	32.3
CR006133	29.6	17.4	12.6
CR006134	37.3	2.4	35
CR006135	55	17	38.9
CR006136	52.6	39.4	13.4
CR006137	45.5	4.8	41.8

10

20

30

【0 2 1 5】

表 9 は、初代ヒト肝細胞において、S p y C a s 9 タンパク質と共トランスフェクトされた試験 H A O 1 および対照 d g R N A (表 7 A) についての編集 %、挿入 (I n s) %、および欠失 (D e l) % についての平均および標準偏差を示す。N = 3。

【0 2 1 6】

40

【表 9 - 1】

表 9 : 初代ヒト肝細胞に送達された crRNA の HAO1 編集データ						
ガイド ID	編集平均 %	編集標 準偏差%	挿入平均 %	挿入標 準偏差%	欠失平均 %	欠失標 準偏差%
CR001261	24.97	11.07	17.63	8.65	21.97	9.63
CR001262	24.70	18.60	29.03	21.29	22.67	16.57
CR001263	4.60	3.24	10.30	8.75	4.53	3.75
CR001264	25.70	11.14	30.90	12.51	24.03	10.19
CR002858	7.47	5.38	5.60	2.81	5.20	2.19
CR002859	10.73	8.36	6.63	4.65	7.70	5.57
CR002860	33.40	26.12	38.50	28.05	41.77	30.94
CR002861	23.77	17.31	22.60	15.04	21.97	14.34
CR002862	18.50	14.57	21.20	16.41	19.67	16.17
CR002863	8.70	6.52	7.77	5.96	12.80	9.48
CR002864	22.47	18.77	16.23	13.97	23.00	19.14
CR002865	4.03	1.82	3.80	1.80	3.37	1.46
CR002866	4.90	3.65	2.87	1.83	2.03	1.59
CR002867	7.47	3.97	5.40	3.24	4.60	2.31
CR002869	1.00	0.87	1.00	0.50	0.70	0.30
CR002870	0.87	0.51	1.10	0.17	0.27	0.23
CR002873	4.43	2.37	4.47	3.27	3.00	1.85
CR002874	3.53	2.97	2.87	2.48	4.00	3.46
CR002875	0.07	0.06	0.37	0.12	0.77	0.58
CR002876	0.10	0.00	0.53	0.46	0.80	0.69
CR002877	3.43	2.80	3.40	2.44	3.80	3.03
CR002878	19.57	13.17	11.80	6.71	15.40	9.28
CR002879	12.13	8.28	6.90	4.50	7.53	5.00
CR002880	3.33	1.47	5.73	2.70	4.60	2.46
CR002881	2.20	1.21	0.67	0.40	1.47	0.93
CR002882	5.73	4.97	4.60	3.81	3.47	2.75
CR002883	3.67	2.67	3.37	2.74	2.27	1.71
CR002884	5.60	4.85	8.23	6.52	3.80	2.94
CR002885	0.07	0.06	0.97	0.23	0.70	0.26
CR002886	2.87	1.69	3.07	2.40	5.33	4.36
CR002887	11.27	9.33	8.67	6.65	9.93	8.00
CR002888	3.07	2.66	4.07	2.22	2.50	2.08

10

20

30

40

【表 9 - 2】

CR002889	1.67	1.27	1.83	0.91	1.20	0.78
CR002890	4.63	3.41	3.07	1.69	4.07	3.27
CR002892	1.00	0.61	0.37	0.15	0.40	0.10
CR002893	1.00	0.87	1.40	1.21	0.43	0.29
CR002894	33.80	25.05	37.17	29.11	42.20	31.31
CR002895	15.27	6.35	20.43	8.78	17.43	7.34
CR002896	6.70	4.88	2.03	1.10	4.17	2.10
CR002897	0.60	0.26	2.10	0.89	1.37	0.55
CR002898	2.40	2.08	2.83	2.37	2.90	2.25
CR002899	0.63	0.25	0.60	0.26	0.33	0.21
CR002900	6.67	5.77	6.83	4.67	12.60	8.84
CR002901	10.33	8.95	4.87	3.63	3.33	2.47
CR002902	5.63	4.29	10.00	8.40	3.80	3.29
CR002903	1.93	1.59	4.07	3.27	3.97	3.18
CR002904	9.70	7.22	7.30	4.73	10.97	7.95
CR002905	2.97	2.23	3.97	2.75	2.73	1.19
CR002906	1.93	1.06	3.07	1.37	1.77	0.51
CR002907	0.90	0.69	3.33	1.00	3.00	1.22
CR002908	1.63	1.16	1.00	0.87	1.20	0.56
CR002909	4.77	3.53	2.60	1.65	2.23	1.25
CR002910	4.13	2.84	4.60	3.06	4.13	2.47
CR002911	4.93	3.60	4.20	3.30	3.83	2.89
CR002912	24.73	21.33	24.03	20.73	26.83	23.15
CR002913	1.47	0.70	0.60	0.26	0.80	0.46
CR002914	0.87	0.59	0.70	0.35	0.33	0.29
CR002915	5.50	3.84	9.53	6.79	6.37	3.95
CR002916	1.63	1.17	2.00	0.92	1.87	1.01
CR002917	2.27	1.33	2.13	1.85	0.77	0.49
CR002918	0.27	0.15	0.13	0.12	0.20	0.17
CR002920	0.40	0.35	0.80	0.69	0.27	0.23
CR002921	2.03	1.67	1.13	0.98	2.43	1.85
CR002922	6.37	4.44	6.43	4.80	4.73	3.09
CR002923	0.97	0.59	1.47	0.87	0.20	0.17
CR002924	1.80	1.08	3.33	2.19	2.07	0.83
CR002925	2.07	1.62	0.33	0.29	1.00	0.87

10

20

30

40

【表 9 - 3】

CR002926	0.33	0.29	1.63	1.33	0.90	0.69
CR002927	7.40	5.32	11.33	6.66	6.73	5.40
CR002928	4.07	2.78	4.60	2.62	3.70	2.54
CR002929	23.60	20.18	32.87	27.95	24.83	21.25
CR002930	2.17	0.90	3.57	2.33	4.80	3.49
CR002931	3.67	3.00	4.40	3.47	3.73	2.73
CR002932	4.47	2.75	4.47	2.97	5.20	3.52
CR002933	4.67	2.71	2.87	1.25	3.33	1.94
CR002934	7.70	6.24	6.17	4.91	10.50	8.58
CR002935	4.20	3.64	1.57	1.02	1.13	0.90
CR002936	2.17	1.55	1.73	0.86	4.47	2.97
CR002937	5.83	4.88	4.83	3.84	4.10	2.79
CR002938	7.70	5.57	4.63	3.18	4.33	2.21
CR006092	15.05	3.61	11.90	3.68	3.25	0.07
CR006093	33.40	16.12	33.15	15.91	0.30	0.14
CR006094	6.75	5.44	6.60	5.37	0.20	0.14
CR006095	6.55	2.90	5.95	2.47	0.60	0.42
CR006096	1.05	1.06	1.00	0.99	0.00	0.00
CR006097	0.25	0.07	0.15	0.07	0.15	0.07
CR006098	3.40	1.98	3.10	1.84	0.40	0.14
CR006099	4.05	0.64	3.50	0.71	0.55	0.07
CR006100	3.60	0.57	3.10	0.42	0.55	0.21
CR006101	4.60	1.27	4.35	1.20	0.30	0.00
CR006102	4.10	2.69	3.80	2.55	0.40	0.14
CR006103	12.95	3.89	12.45	3.75	0.75	0.07
CR006104	0.85	0.07	0.75	0.07	0.05	0.07
CR006105	3.65	1.63	3.25	1.63	0.45	0.07
CR006106	2.60	0.85	2.30	0.85	0.35	0.07
CR006107	14.55	2.62	8.10	2.26	6.50	0.28
CR006108	6.15	2.47	5.95	2.33	0.20	0.14
CR006109	32.30	11.60	31.25	11.10	1.10	0.57
CR006110	3.70	1.13	2.95	0.78	0.75	0.35
CR006111	1.10	0.57	1.00	0.42	0.10	0.14
CR006112	7.35	0.21	7.10	0.28	0.25	0.07
CR006113	2.85	1.06	2.70	1.27	0.20	0.14

10

20

30

40

【表 9 - 4】

CR006114	23.85	8.56	21.15	7.00	2.75	1.63
CR006115	9.90	4.81	7.65	3.61	2.30	1.13
CR006116	10.35	3.04	9.40	2.69	1.05	0.35
CR006117	6.95	1.34	6.20	0.85	0.95	0.49
CR006118	3.15	0.21	2.45	0.35	0.75	0.07
CR006119	5.35	1.06	4.85	1.20	0.50	0.14
CR006120	7.15	0.35	6.35	0.07	0.80	0.42
CR006121	11.05	3.61	7.75	2.62	3.35	1.06
CR006122	19.20	0.00	17.65	0.49	1.55	0.49
CR006123	9.40	2.97	8.90	3.25	0.55	0.21
CR006124	9.75	2.05	8.85	1.77	0.90	0.28
CR006125	10.60	4.10	8.40	3.68	2.35	0.35
CR006126	25.60	6.93	24.10	6.65	1.55	0.21
CR006127	5.80	3.25	5.10	2.55	0.75	0.78
CR006128	6.00	2.83	5.65	2.76	0.45	0.07
CR006129	15.40	8.20	10.15	7.00	5.50	1.13
CR006133	9.65	4.03	5.45	3.61	4.25	0.35
CR006134	3.80	1.56	3.80	1.56	0.00	0.00
CR006135	6.10	1.27	4.90	1.56	1.20	0.28
CR006136	5.35	0.92	2.55	0.07	2.80	0.99
CR006137	8.60	3.82	7.80	4.10	0.95	0.35
CR006138	16.85	4.31	16.70	4.10	0.20	0.28
CR006139	3.65	2.33	3.50	2.26	0.25	0.21
CR006140	7.30	1.13	6.95	0.92	0.35	0.21
CR006141	5.35	1.34	4.10	0.28	1.20	0.99
CR006142	3.45	0.78	3.00	0.57	0.50	0.14
CR006143	1.50	0.85	1.40	0.71	0.15	0.07
CR006144	2.40	0.57	2.00	0.42	0.45	0.21
CR006145	6.85	0.49	6.65	0.64	0.25	0.21
CR006146	4.45	2.47	4.05	2.62	0.45	0.07
CR006147	2.70	1.13	2.50	0.99	0.25	0.21
CR006148	9.70	3.25	8.05	2.90	2.20	0.57
CR006149	14.20	5.80	13.60	5.94	0.65	0.07
CR006150	11.05	6.72	9.30	6.51	2.10	0.42
CR006151	4.60	2.83	4.35	2.47	0.25	0.35

10

20

30

40

【表 9 - 5】

CR006152	7.35	2.90	7.20	2.83	0.15	0.07
CR001263	8.65	3.18	8.05	2.90	0.80	0.42
CR006153	8.10	1.41	6.45	0.92	1.65	0.49
CR006154	20.30	6.08	19.40	6.22	0.95	0.21
CR006155	10.40	2.83	9.80	2.83	0.70	0.00

【 0 2 1 7 】

10

表 1 0 は、初代カニクイザル肝細胞において、S p y C a s 9 タンパク質と共トランスフェクトされた試験 H A O 1 d g R N A についての編集 %、挿入 (I n s) %、および欠失 (D e l) % についての平均および標準偏差を示す。N = 3。

【 0 2 1 8 】

【表 10 - 1】

表 10 : 初代カニクイザル肝細胞に送達された crRNA の HAO1 編集データ						
ガイド ID	編集平均 %	編集標準偏差 %	挿入平均 %	挿入標準偏 差%	欠失平均 %	欠失標準偏 差%
CR002857	19.18	3.25	17.01	2.91	2.18	0.57
CR002858	9.13	1.14	7.91	1.62	1.22	0.50
CR002859	9.50	1.71	8.14	0.95	1.35	0.79
CR002860	49.63	11.68	45.38	10.65	4.25	1.03
CR002861	23.04	1.48	19.14	0.17	3.90	1.65
CR002862	43.12	6.71	41.25	6.90	1.87	0.59
CR002863	11.28	0.75	9.63	0.65	1.65	0.39
CR002864	16.06	2.42	15.89	2.55	0.17	0.13
CR002865	11.26	1.06	6.58	1.16	4.67	0.37
CR002866	1.33	0.38	1.18	0.31	0.15	0.07
CR002867	3.70	0.39	2.54	0.20	1.16	0.36
CR002868	5.90	0.93	5.62	0.53	0.27	0.40
CR002869	1.07	0.25	0.92	0.20	0.15	0.05
CR002871	14.28	3.72	14.09	3.76	0.19	0.22
CR002872	4.19	0.78	4.06	0.86	0.13	0.11
CR002873	8.86	1.50	8.28	1.34	0.57	0.18
CR002874	7.61	0.52	7.42	0.67	0.18	0.17
CR002875	2.61	0.63	2.51	0.70	0.10	0.09
CR002876	1.82	0.73	1.62	0.75	0.20	0.03
CR002877	2.53	0.69	2.44	0.70	0.09	0.01
CR002878	27.13	1.50	4.98	1.04	22.15	1.75
CR002879	86.74	1.87	0.04	0.03	86.70	1.89
CR002880	47.71	0.61	0.73	0.13	46.98	0.74
CR002881	3.86	0.37	3.48	0.24	0.38	0.22
CR002882	3.52	0.89	3.33	0.84	0.19	0.15
CR002883	6.52	1.43	6.15	1.59	0.38	0.15
CR002884	3.88	0.02	3.84	0.02	0.04	0.01
CR002885	1.39	0.60	1.36	0.57	0.02	0.03
CR002886	4.80	0.98	4.60	1.05	0.20	0.10
CR002887	15.92	3.08	15.51	3.01	0.41	0.15
CR002888	2.70	0.53	2.60	0.55	0.10	0.04
CR002889	1.68	0.38	1.58	0.36	0.10	0.02

10

20

30

40

【表 10 - 2】

CR002890	3.82	0.79	3.48	0.68	0.33	0.31
CR002891	8.19	1.69	7.98	1.39	0.21	0.30
CR002892	1.84	0.50	1.64	0.54	0.20	0.05
CR002893	1.87	0.36	1.73	0.33	0.14	0.04
CR002894	44.20	2.89	42.46	3.43	1.74	0.54
CR002895	8.72	1.00	4.86	1.04	3.86	0.45
CR002896	5.15	1.38	4.34	0.88	0.81	0.50
CR002897	6.12	1.95	1.74	0.31	4.38	1.65
CR002898	1.50	0.64	1.43	0.54	0.08	0.11
CR002899	2.13	0.48	1.97	0.48	0.16	0.01
CR002900	1.98	0.66	1.81	0.73	0.17	0.08
CR002901	5.58	1.64	5.33	1.58	0.25	0.06
CR002902	5.71	0.56	5.17	0.49	0.54	0.16
CR002903	4.89	0.56	4.43	0.42	0.47	0.14
CR002904	9.24	1.44	8.63	1.19	0.62	0.32
CR002905	2.53	0.26	2.17	0.14	0.37	0.13
CR002906	3.22	0.21	2.64	0.07	0.57	0.24
CR002907	2.31	0.20	2.19	0.17	0.12	0.05
CR002908	2.31	0.39	2.04	0.39	0.27	0.02
CR002909	3.01	1.06	2.82	1.05	0.19	0.12
CR002910	3.08	0.51	2.66	0.55	0.41	0.24
CR002911	2.36	0.48	2.00	0.28	0.36	0.20
CR002912	21.23	1.26	21.08	1.26	0.15	0.04
CR002913	1.71	0.37	1.41	0.29	0.30	0.08
CR002914	1.58	0.17	1.10	0.32	0.48	0.34
CR002916	3.14	1.76	2.07	0.84	1.07	1.01
CR002917	2.08	0.29	1.49	0.54	0.59	0.58
CR002918	1.78	1.22	0.52	0.04	1.26	1.20
CR002919	3.30	0.26	3.23	0.25	0.07	0.04
CR002920	1.90	0.63	1.49	0.55	0.40	0.50
CR002921	1.43	0.37	1.31	0.35	0.13	0.03
CR002928	4.59	0.84	4.27	0.70	0.32	0.14
CR002929	41.10	4.34	40.91	4.44	0.19	0.16
CR002930	4.70	1.39	2.53	0.36	2.17	1.06
CR002931	4.60	0.52	4.54	0.53	0.06	0.02

10

20

30

40

【表 1 0 - 3】

CR002932	6.46	0.95	4.56	0.57	1.90	0.73
CR002933	2.47	0.45	1.97	0.42	0.50	0.05
CR002934	12.77	0.88	11.45	1.05	1.32	0.24
CR002935	3.14	0.76	2.31	0.76	0.83	0.07
CR002936	3.73	0.35	2.53	0.16	1.19	0.19
CR002937	2.99	0.26	2.77	0.19	0.22	0.08
CR002938	7.65	0.49	6.25	0.69	1.40	0.20
CR006098	0.2	0.14	0.1	0	0.1	0.14
CR006106	0.6	0.14	0.4	0	0.25	0.07
CR006108	6.65	2.33	6.55	2.33	0.1	0
CR006131	14.75	3.75	9.45	1.34	5.35	2.33
CR006132	11.6	2.83	5.9	0.57	5.65	2.33
CR006150	5.85	1.48	5.35	1.48	0.4	0
CR006154	8.55	4.45	8.5	4.38	0.1	0
CR006155	2.45	1.06	2.35	1.06	0.2	0

10

20

【 0 2 1 9】

P H Hと各々の細胞型との間の各ガイドについての編集効率を比較することによって相関を計算した（図 1）。

【 0 2 2 0】

初代ヒト肝細胞の編集データに基づいて、ガイド配列のサブセットをさらに評価した。このサブセットを表 1 1 に提供し、初代ヒト肝細胞スクリーニングからの対応する編集データを再現する。

【 0 2 2 1】

30

【表 1 1】

表 1 1 : さらなる分析のために選択された初代ヒト肝細胞における crRNA についての HAO1 編集データ	
ガイド ID	編集%
CR002860	33.40
CR002861	23.77
CR002862	18.50
CR002864	22.47
CR002878	19.57
CR002891	24.70
CR002894	33.80
CR002895	15.27
CR002912	24.73
CR002929	23.60
CR006093	33.40
CR006109	32.30
CR006114	23.85
CR006122	19.20
CR006126	25.60
CR006138	16.85
CR006154	20.30

10

20

【0 2 2 2】

HAO1 ガイドのオフターゲット分析

30

オリゴ挿入に基づくアッセイ（例えば、Tsai et al., Nature Biotechnology, 33, 187-197; 2015を参照）を使用して、HAO1を標的とするCas9によって切断される潜在的なオフターゲットゲノム部位を決定した。表11の17種類のdgRNA（および既知のオフターゲットプロファイルを有する3種類の対照ガイド）を、上述のHEK293-Cas9細胞においてスクリーニングし、オフターゲットの結果を図2にプロットした。このアッセイは、いくつかのdgRNAについての潜在的なオフターゲット部位を特定し、検出可能なオフターゲットを有しない他の部位を特定した。特定された潜在的なオフターゲット部位がないか、またはほとんどなかった修飾ガイドを、さらなる分析のためにsgRNAとして合成した（表2）。

【0 2 2 3】

40

加えて、生化学的方法（例えば、Cameron et al., Nature Methods, 6, 600-606; 2017）を使用して、HAO1を標的とするCas9によって切断される潜在的なオフターゲットゲノム部位を決定した。表2の10種類の修飾sgRNA（および既知のオフターゲットプロファイルを有する3種類の対照ガイド）を、上述のHEK293ゲノムDNAを使用してスクリーニングし、潜在的なオフターゲットの結果を図3にプロットした。このアッセイは、いくつかのsgRNAについての潜在的なオフターゲット部位を特定した。

【0 2 2 4】

潜在的なオフターゲット部位を検証するための標的シーケンシング

潜在的なオフターゲットを検出するために使用されるHEK293__Cas9細胞は、

50

Cas9を構成的に過剰発現し、様々な細胞型における一過性送達パラダイムと比較して、より多くの潜在的なオフターゲット「ヒット」をもたらす。さらに、この生化学アッセイは、典型的には、細胞環境を含まない精製された高分子量ゲノムDNAを利用し、使用されるCas9 RNPの用量に依存するため、潜在的なオフターゲット部位の数を過剰に表す。したがって、これらの方法によって特定された潜在的なオフターゲット部位は、特定された潜在的なオフターゲット部位の標的シーケンシングを使用して検証され得る。

【0225】

1つのアプローチでは、初代肝細胞を、Cas9 mRNAおよび目的のsgRNA（例えば、評価のための潜在的なオフターゲット部位を有するsgRNA）を含むLNPで処理する。次いで、初代肝細胞を溶解し、潜在的なオフターゲット部位（複数可）に隣接するプライマーを使用してNGS分析のためのアンプリコンを生成する。特定のレベルでのインデルの同定は、潜在的なオフターゲット部位を検証し得るが、潜在的なオフターゲット部位で見出されるインデルの欠如は、HEK293_Cas9細胞アッセイまたは生化学アッセイにおいて偽陽性を示す場合がある。

10

【0226】

初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞におけるSpy_Cas9 mRNAおよびsgRNAを含有する脂質ナノ粒子（LNP）製剤の交差スクリーニング

用量応答アッセイにおいて、初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞に対して、ヒトHAO1を標的とする修飾sgRNAおよびカニクイザル適合sgRNA配列の脂質ナノ粒子（LNP）製剤を試験した。LNPを実施例1に記載のように製剤化した。初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞を、実施例1に記載されるようにプレーティングした。LNPで処理する前に、両方の細胞株を37℃、5%CO₂で48時間インキュベートした。LNPを、6%カニクイザル血清を含む培地中、37℃で10分間インキュベートした。インキュベーション後、LNPを、300ng Cas9 mRNAで始まる8点の3倍用量応答曲線において、ヒトまたはカニクイザル肝細胞に添加した。細胞を、実施例1に記載されるようにNGS分析のために処理後96時間かけて溶解させた。両方の細胞株におけるガイド配列の用量応答曲線データを図4および5に示す。14.7nM濃度での編集%を以下の表12および13に列挙する。

20

【0227】

表12は、初代ヒト肝細胞において、LNPを介してSpy_Cas9と共に送達される14.7nMの試験HAO1 sgRNAについての編集%、挿入（Ins）%、および欠失（Del）%についての平均および標準偏差を示す。これらの試料を3重で生成した。

30

【0228】

【表 1 2】

表 1 2 : 初代ヒト肝細胞において 14.7 nM で発現した sgRNA についての HAO1 編集データ							
ガイド ID	編集平均 %	編集標準 偏差%	挿入平均 %	挿入標準 偏差%	欠失平均 %	欠失標準 偏差%	EC50
G009428	92.87	0.84	5.07	0.42	88.47	1.37	0.19
G009429	96.97	0.35	0.80	0.00	96.23	0.38	0.36
G009430	95.60	0.75	84.90	1.56	10.77	0.95	0.43
G009431	56.23	2.20	9.40	1.56	47.13	1.19	2.12
G009432	93.73	0.29	62.57	3.58	32.57	2.55	0.46
G009433	95.67	0.61	1.37	0.15	94.30	0.61	0.79
G009434	94.67	1.57	3.13	0.29	91.57	1.63	0.73
G009435	95.87	0.49	15.83	1.35	80.17	1.44	0.71
G009436	94.83	1.29	7.67	0.25	87.40	1.28	0.72
G009437	83.57	1.27	8.10	1.31	75.63	2.29	1.46

10

20

【 0 2 2 9】

表 1 3 は、初代カニクイザル肝細胞において、L N P を介して S p y C a s 9 と共に送達される 1 4 . 7 n M の試験 H A O 1 s g R N A についての編集 %、挿入 (I n s) %、および欠失 (D e l) % についての平均および標準偏差を示す。これらの試料を 3 重で生成した。

【 0 2 3 0】

【表 1 3】

表 1 3 : 初代カニクイザル肝細胞において 14.7 nM で発現した sgRNA についての HAO1 編集データ							
ガイド ID	編集平均 %	編集標準 偏差%	挿入平均 %	挿入標準 偏差%	欠失平均 %	欠失標準 偏差%	EC50
G009428	89.03	1.53	6.97	1.05	82.53	1.96	0.36
G009429	94.87	1.85	3.23	0.55	92.20	1.61	1.02
G009430	97.33	0.84	88.07	0.67	9.33	0.81	0.35
G009431	55.93	0.38	8.07	1.56	48.80	1.54	1.77
G009432	96.50	0.98	84.00	1.15	12.90	1.31	0.47
G009437	69.10	2.62	6.80	0.66	63.20	2.82	2.30

30

40

【 0 2 3 1】

実施例 3 . 表現型分析

H A O 1 転写物の定量 P C R 分析

初代ヒト肝細胞を、表 2 からの修飾 s g R N A を用いて製剤化された L N P (実施例 1 に記載されるような) で処理した。L N P を実施例 1 に記載のように製剤化した。トランスフェクションから 2 1 日後、細胞を収穫し、R N A を単離し、実施例 1 に記載の定量 P C R による分析を行った。

【 0 2 3 2】

R N A を、H A O 1 m R N A の減少について 3 重で分析し、S t e p O n e P l u s

50

Real-Time PCR Systemから決定されたCt値を用いて計算した。各試料内の18Sに対するCt値をHAO1の値と比較して、比率を計算した。この比率を陰性対照に対して正規化した後、HAO1 mRNAの減少率を決定した。HAO1 mRNAの減少%のデータを表14に提供する。

【0233】

【表14】

表14：LNPで処理した初代ヒト肝細胞における相対的なHAO1 mRNA量				
配列番号	ガイドID	残存HAO1 mRNA%	+誤差%	-誤差%
251	G009428	37.4	0.3	0.3
252	G009429	3.7	1.4	1.0
253	G009430	2.3	0.6	0.4
254	G009431	7.1	1.7	1.4
255	G009432	6.1	9.1	3.6
256	G009433	1.8	7.6	1.5
257	G009434	4.5	1.8	1.3
258	G009435	2.1	0.3	0.3
259	G009436	5.6	8.3	3.4
260	G009437	33.1	3.9	3.5

10

20

【0234】

細胞内グリコレートオキシダーゼのウェスタンブロット分析

HAO1の定量PCR分析からの細胞の一部を、トランスフェクションの21日後にも収穫し、全細胞抽出物(WCE)を調製し、実施例1に記載したようにウェスタンブロットによる分析を行った。

【0235】

細胞の一部もまた、本明細書に記載されるように収集し、NGSシーケンシングのために処理した。これらの細胞についての編集データを表15に提供する。

30

【0236】

【表15】

表15：初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞に送達されたsgRNAについてのHAO1編集データ		
ガイドID	編集% PHH	編集% PCH
G009428	94	89
G009429	95	91
G009430	93	97
G009431	72	70
G009432	91	97
G009433	93	なし
G009434	93	なし
G009435	97	なし
G009436	95	なし
G009437	91	99

40

50

【0237】

WCEを、GOタンパク質の減少についてウェスタンブロットによって分析した。全長GOタンパク質は、370個のアミノ酸を有し、予測分子量は41kDであった。この分子量でのバンドは、ウェスタンブロットにおいて、対照レーン（未処理細胞）において観察された（図6および7）。

【0238】

GOタンパク質の減少率は、Licor Odyssey Image Studio Ver 5.2ソフトウェアを使用して計算した。ローディング対照としてビンキュリンを使用し、GOと同時にプローブした。GOのバンドを包含する全領域と比較して、各試料内のビンキュリンの密度測定値について比率を計算した。この比率を陰性対照レーンに対して正規化した後、GOタンパク質の減少率を決定した。結果を表16に示し、図8および9に示す。

【0239】

【表16】

表16：sgRNAで処理した初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞中に残存する相対的なGOタンパク質		
ガイドID	PHH中に残存するタンパク質 (陰性対照と比較)	PCH中に残存するタンパク質 (陰性対照と比較)
G009428	0.25	0.30
G009429	0.16	0.13
G009430	0.20	0.12
G009431	0.42	0.51
G009432	0.8	0.17
G009433	0.12	なし
G009434	0.19	なし
G009435	0.18	なし
G009436	0.26	なし
G009437	0.23	0.43

【0240】

実施例4．PH1のマウスモデルにおけるHao1のインビボでの編集

本試験では、野生型およびAGT欠損マウス（Agxt1^{-/-}）、例えば、肝臓AGXT mRNAおよびタンパク質を欠いたヌル変異体マウスの両方を使用した。AGT欠損マウスは、以前にSalido et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Nov 28; 103(48):18249-54に記載されているように、高シュウ酸尿症および結晶尿を示し、したがって、PH1の表現型モデルを代表するものである。野生型マウスを使用して、AGT欠損マウスにおいてどの製剤を試験するかを決定した。

【0241】

LNPを製剤化する前に、マウスHao1を標的とするdgRNAを、ヒトおよびカニクイザルHAO1を標的とするgRNAについて実施例2に記載したのと同様に、編集効率についてスクリーニングした。活性なdgRNAを同定したら、修飾sgRNAのさらに小さなセットを、インビボでのさらなる評価のために合成した。

【0242】

動物を体重測定し、体重に従ってグループ化し、グループ平均体重に基づいて投与溶液を調製した。マウスHao1を標的とする修飾sgRNAを含むLNP（以下の表17を

参照)を、動物あたり0.2 mLの体積(体重1キログラムあたり約10 mL)で、側方尾静脈を介して投与した。LNPを実施例1に記載のように製剤化した。治療から1週間後、野生型マウスを安楽死させ、DNA抽出およびマウスHao1の編集の分析のために、肝臓組織を収集した。図10および以下の表17に示すように、治療したマウスにおいて、編集の用量依存的なレベルを観察した。

【0243】

LNPがインビボでマウスHao1遺伝子を編集することができることを確立した後、G723を含むLNPを、2 mpkの用量でAGT欠損マウスに投与した(n=4)。例えば、Liebow et al., J Am Soc Nephrol. 2017 Feb; 28(2): 494-503に記載されるように、これらのマウスを代謝ケージに収容し、オキサレートレベルについて種々の時間点で尿を集めた。表18は、AGT欠損マウスの編集結果を示す。達成された平均編集%(n=4)は、79.85であり、標準偏差は5.91であった。図11に示されるように、尿オキサレートレベルは、治療の1週間後に減少し、この減少レベルは、投与から少なくとも5週間まで維持され、この時点で、試験を終了した。図11に示すデータを表19に示す。対照(PBS注射した)動物(n=3)における減少は観察されなかった(データは示されていない)。

【0244】

【表17】

表17. 野生型マウスモデル編集

ガイド ID	sgRNA 配列	用量 (mpk)	編集平均%	編集標準偏差%	n
G000722	mU*mC*mA*CUGAUGCAGACCAGUC GGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU (配列番号 169)	0.1	26.82	5.62	5
		0.3	45.90	11.83	4
		1	71.07	3.37	3
G000723	mC*mA*mC*GUGAGCCAUGCACUGC AGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU (配列番号 170)	0.1	27.23	5.40	4
		0.3	51.13	8.12	4
		1	74.43	0.93	3
G000724	mU*mC*mU*UUUCUUACCUCGCACA GGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU (配列番号 171)	0.1	7.30	4.06	4
		0.3	34.23	10.30	4
		1	63.50	2.23	3

* = P S 連結、「m」 = 2'-O-Me スクレオチド

【0245】

【表18】

表18. Agxt1^{-/-}マウスモデルの編集データ、5週間の試験

マウス番号	編集%	挿入%	欠失%
1	71.1	47.7	23.4
2	83.1	56	27.1
3	81.5	52.8	28.7
4	83.7	54.9	28.8

10

【0246】

【表19】

表19. Agxt1^{-/-}マウスモデル平均尿オキサレート

週	平均尿オキサレート (mg/g クレアチン/24 時間)	標準偏差平均尿オキサレート
0	407.00	55.70
1	222.75	16.90
2	243.00	6.38
3	251.75	3.86
4	215.00	9.70
5	222.00	22.11

20

【0247】

LNP処置から5週間後まで、AGT欠損マウスにおける持続的な尿オキサレートの減少を実証した後、投与から15週間後まで、尿オキサレートを追跡するために追加の実験を実施した。G723を含有するLNPを、0.3mpk (n=4) および1mpk (n=4) の用量でAGT欠損マウスに投与した。これらのマウスを代謝ケージに収容し、上述のように、オキサレートレベルについて種々の時間点で尿を集めた。表20は、15週間の試験におけるAGT欠損マウスの編集結果を示す。0.3mpk用量で達成された平均編集率は、75.8であり、標準偏差は2.6であった。1mpk用量で達成した平均編集率は、72.75であり、標準偏差は12.50であった。図12に示されるように、尿オキサレートレベルは、治療後に減少し、この減少レベルは、投与から少なくとも15週間まで維持され、この時点で、試験を終了した。図12に示すデータを表21に示す。対照(PBS注射した)動物(n=3)における減少は観察されなかった(データは示されていない)。処理したマウス由来の肝臓試料を処理し、実施例1に記載のようにウェスタンブロット上で実行した。GOタンパク質の減少率は、上述のようにLicor Odyssey Image Studio Ver. 5.2ソフトウェアを使用して計算し、表20に示す。ウェスタンブロット画像を図13に示す。図14は、表20に示される編集レベルとタンパク質レベルとの間のR²値0.99での相関を示す。

30

40

【0248】

【表 2 0】

表 2 0. Agxt1^{-/-}マウスモデルの編集およびタンパク質データ、15週間の試験

マウス番号	mpk G723	編集%	挿入%	欠失%	残存する GO タンパク質 (陰性対照と比較)
1	0.3	77.3	53.8	23.5	0.14
2	0.3	77.0	55.1	21.9	0.14
3	0.3	77.0	55.7	21.3	0.13
4	0.3	71.9	50.1	21.8	0.14
5	1	79.2	54.0	25.3	0.05
6	1	54.9	41.9	13.1	0.34
7	1	83.1	51.7	31.4	0.08
8	1	73.8	57.1	16.7	0.11

10

【0 2 4 9】

【表 2 1】

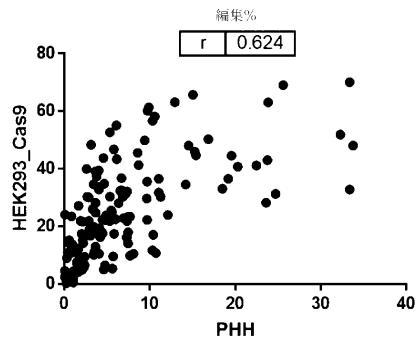
表 2 1. Agxt1^{-/-}マウスモデル平均尿オキサレート

週	用量 G723(mpk)	平均尿オキサレート (mg/g クレアチン/24 時間)	標準偏差平均尿オキサレート
0	対照	377.47	58.22
5	対照	413.72	77.33
9	対照	354.77	43.75
15	対照	345.95	88.18
0	0.3	315.80	50.30
5	0.3	176.96	40.47
9	0.3	169.09	22.82
15	0.3	168.01	13.00
0	1.0	350.74	74.90
5	1.0	199.25	68.81
9	1.0	173.92	23.80
15	1.0	150.35	29.26

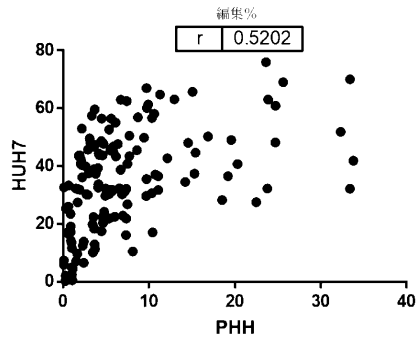
20

30

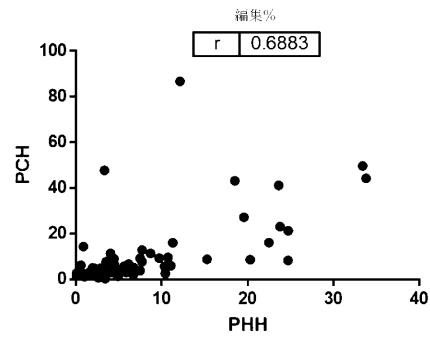
【図 1 A】



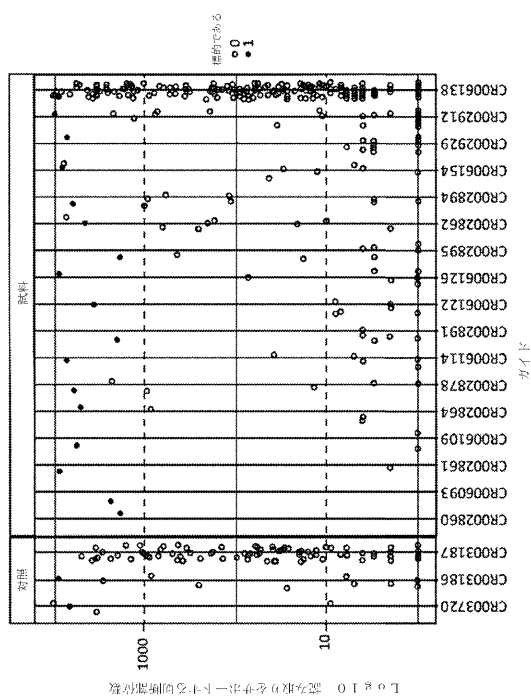
【図 1 B】



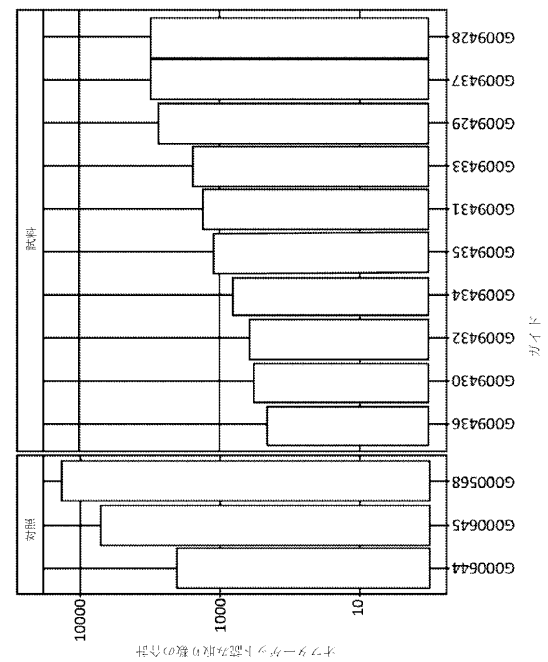
【図 1 C】



【図 2】

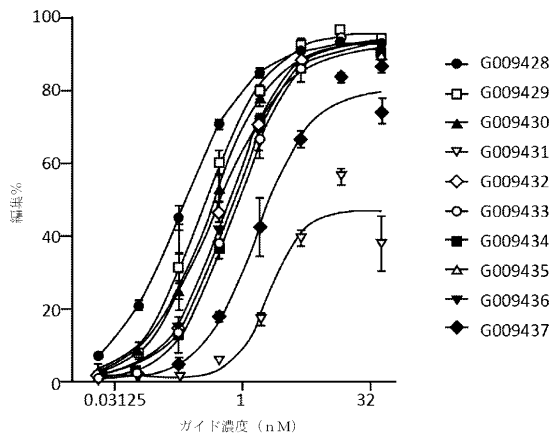


【図 3】



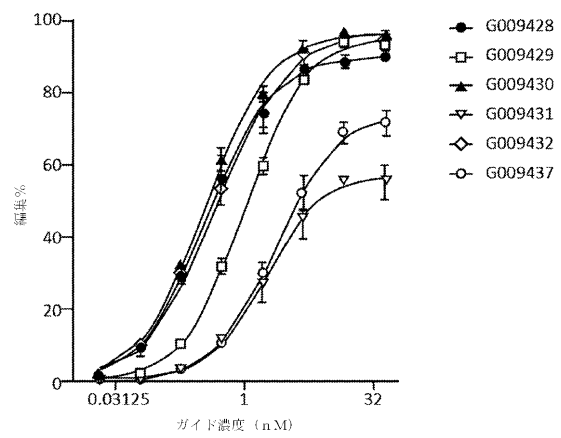
【図 4】

初代ヒト肝細胞における s g RNA 用量応答曲線

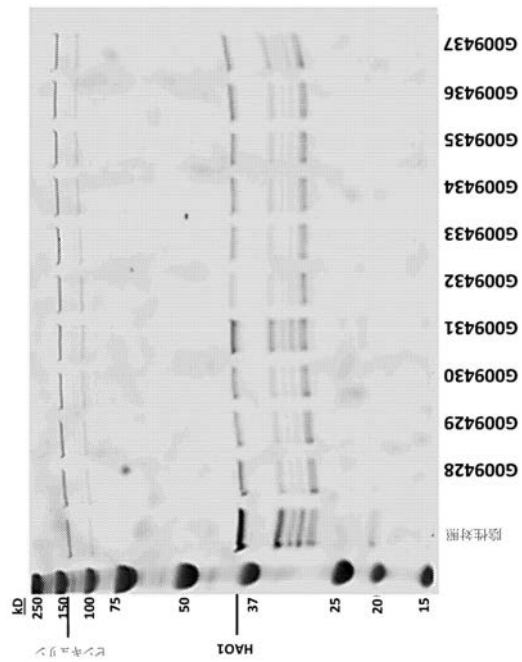


【図 5】

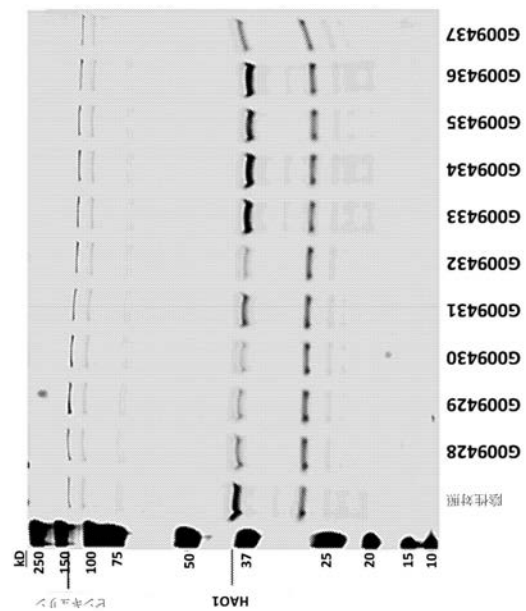
初代カニクイザル肝細胞における s g RNA 用量応答曲線



【図 6】



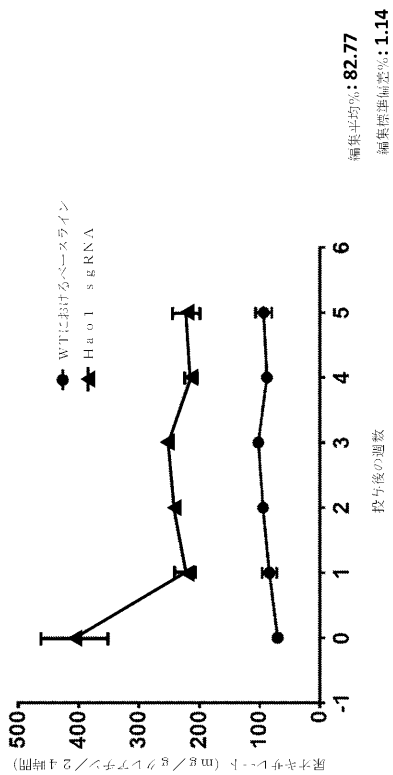
【図 7】



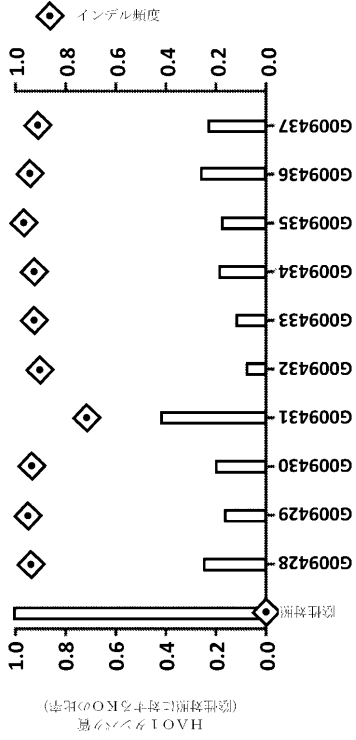
【図6】



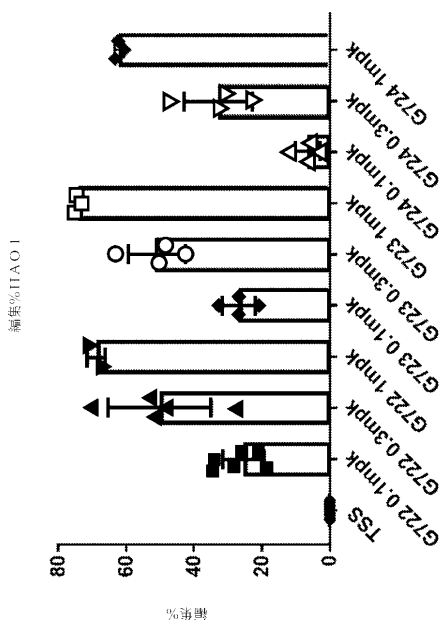
【図11】



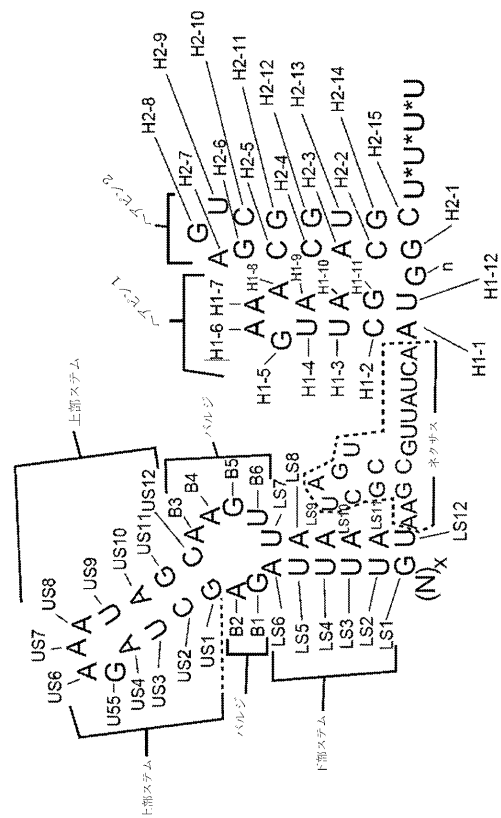
【図8】



【図10】



【図 16】



【配列表】

2021531804000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/044080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/113 A61K31/7088 A61P13/12 ADD.		
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) C12N A61K 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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/011080 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]) 21 January 2016 (2016-01-21) claims 1,9-11,50-54; sequences 75056, 75061 ----- -/--	1,2, 8-10, 12-27, 29,30, 35-42, 45,46, 51,56, 62, 64-77, 85-89, 254-263
☒ 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 "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		Date of mailing of the international search report
9 January 2020		17/01/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bucka, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/044080

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/049009 A2 (SANGAMO THERAPEUTICS INC [US]) 15 March 2018 (2018-03-15) claims 1-9,12,13; example 1	1-47, 51-57, 59-89, 110, 254-264
Y	ZABALETA N ET AL: "CRISPR/Cas mediated disruption of the glycolate oxidase gene is an efficacious treatment for primary hyperoxaluria type I", HUMAN GENE THERAPY, vol. 28, no. 12, 17 October 2017 (2017-10-17), pages A11-A12, XP009516694, ISSN: 1557-7422 abstract	1-47, 51-57, 59-89, 110, 254-264
Y	ZABALETA NEREA ET AL: "CRISPR/Cas9-Mediated Disruption of Glycolate Oxidase is an Efficacious and Safe Treatment for Primary Hyperoxaluria Type I", MOLECULAR THERAPY,, [Online] vol. 26, no. 5, Suppl. 1, 30 April 2018 (2018-04-30), pages 384-385, XP009516692, ISSN: 1525-0016 Retrieved from the Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/journal/molecular-therapy> abstract	1-47, 51-57, 59-89, 110, 254-264
Y	US 2016/237455 A1 (GLUCKSMANN ALEXANDRA [US] ET AL) 18 August 2016 (2016-08-18) paragraphs [1308], [1310], [1440]; tables XII-2	1-46, 51-56, 59-62, 64-89, 254-264
A	US 2015/376586 A1 (MAY ANDREW PAUL [US] ET AL) 31 December 2015 (2015-12-31) sequence 1740	1-46, 51-56, 59-62, 64-89, 254-264
A	WO 2015/100436 A1 (DICERNA PHARMACEUTICALS INC [US]) 2 July 2015 (2015-07-02) claims 1-5,56,64,68, 75; sequences 5462, 8171, 8304, 9150, 9158, 9725	1-47, 51-57, 59-89, 110, 254-264
2	-/--	

Form PCT/ISA/Z10 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/044080

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CRISTINA MARTIN-HIGUERAS ET AL: "Glycolate Oxidase Is a Safe and Efficient Target for Substrate Reduction Therapy in a Mouse Model of Primary Hyperoxaluria Type I", MOLECULAR THERAPY, vol. 24, no. 4, 9 February 2016 (2016-02-09), pages 719-725, XP55307346, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2015.224 figure 1	1-46, 51-56, 59-62, 64-89, 254-264
A	ABIGAIL LIEBOW ET AL: "An Investigational RNAi Therapeutic Targeting Glycolate Oxidase Reduces Oxalate Production in Models of Primary Hyperoxaluria", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY., vol. 28, no. 2, 18 July 2016 (2016-07-18), pages 494-503, XP55633228, US ISSN: 1046-6673, DOI: 10.1681/ASN.2016030338 figures 1-3	1-46, 51-56, 59-62, 64-89, 254-264
A	ZABALETA N ET AL: "Universal in vivo CRISPR/Cas9-mediated knock-in strategy for the treatment of primary hyperoxaluria", HUMAN GENE THERAPY, LIEBERT, US, vol. 27, no. 11, 31 October 2016 (2016-10-31), page A130, XP009504530, ISSN: 1043-0342 abstract	1-46, 51-56, 59-62, 64-89, 254-264
A	MARTIN-HIGUERAS CRISTINA ET AL: "Molecular therapy of primary hyperoxaluria", JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE, KLUWER, DORDRECHT, NL, vol. 40, no. 4, 19 April 2017 (2017-04-19) , pages 481-489, XP036419651, ISSN: 0141-8955, DOI: 10.1007/S10545-017-0045-3 [retrieved on 2017-04-19] page 482, right-hand column - page 483, right-hand column	1-46, 51-56, 59-62, 64-89, 254-264
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/044080

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	NEREA ZABALETA ET AL: "CRISPR/Cas9-mediated glycolate oxidase disruption is an efficacious and safe treatment for primary hyperoxaluria type I", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 9, no. 1, 21 December 2018 (2018-12-21), XP55633086, DOI: 10.1038/s41467-018-07827-1 figures 1,2,4 -----	1-46, 51-56, 59-62, 64-89, 254-264
Y	ZABALETA NEREA ET AL: "CRISPR-Cas9-Mediated In Vivo Substrate Reduction Therapy Rescues Phenotype of Primary Hyperoxaluria Type I", MOLECULAR THERAPY,, [Online] vol. 25, no. 5, Suppl. 1, 30 April 2017 (2017-04-30), pages 79-80, XP009516691, ISSN: 1525-0016 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/mt/index.html> the whole document -----	1-45,47, 51-57, 59-89, 110, 254-264
A	WO 2016/205323 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]) 22 December 2016 (2016-12-22) claims 1,44,53,57,58; sequences 37, 193 -----	1-47, 51-57, 59-89, 110, 254-264

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/044080

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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).

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:

see additional 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 an additional fee, 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.:
89, 110(completely); 1-47, 51-57, 59-88, 254-264(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ US2019/ 044080

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 89(completely); 1-46, 51-56, 59-62, 64-88, 254-264(partially)

A method of inducing a double-stranded break (DSB) or a single-stranded break (SSB) within the HA01 gene, comprising delivering a composition to a cell, wherein the composition comprises a guide RNA comprising a guide sequence comprising at least 17 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 1; a composition comprising a guide RNA comprising a guide sequence comprising at least 17 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 1; related products and methods.

- 2-146. claims: 1-88, 90-264(all partially)

A method of inducing a double-stranded break (DSB) or a single-stranded break (SSB) within the HA01 gene, comprising delivering a composition to a cell, wherein in each separate invention the composition comprises a guide RNA comprising a guide sequence comprising at least 17 contiguous nucleotides of any one of the sequences of SEQ ID NOs: 2-146; a composition comprising a guide RNA comprising a guide sequence, wherein in each separate invention the composition comprises a guide RNA comprising a guide sequence comprising at least 17 contiguous nucleotides of any one of the sequences of SEQ ID NOs: 2-146; related products and methods.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/044080

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016011080	A2	21-01-2016	CA 2954791 A1 21-01-2016 EP 3169776 A2 24-05-2017 US 2017204407 A1 20-07-2017 WO 2016011080 A2 21-01-2016
WO 2018049009	A2	15-03-2018	AU 2017324462 A1 14-03-2019 CA 3035534 A1 15-03-2018 EP 3509645 A2 17-07-2019 JP 2019531068 A 31-10-2019 US 2018064827 A1 08-03-2018 WO 2018049009 A2 15-03-2018
US 2016237455	A1	18-08-2016	US 2016237455 A1 18-08-2016 WO 2015048577 A2 02-04-2015
US 2015376586	A1	31-12-2015	US 2015376586 A1 31-12-2015 US 2015376587 A1 31-12-2015 US 2017114334 A1 27-04-2017
WO 2015100436	A1	02-07-2015	AU 2014369850 A1 14-07-2016 CA 2935220 A1 02-07-2015 DK 3087184 T3 29-07-2019 EP 3087184 A1 02-11-2016 EP 3581654 A1 18-12-2019 JP 2017502668 A 26-01-2017 US 2015184160 A1 02-07-2015 US 2017306333 A1 26-10-2017 US 2018291379 A1 11-10-2018 US 2019194665 A1 27-06-2019 US 2019211340 A1 11-07-2019 US 2020002705 A1 02-01-2020 WO 2015100436 A1 02-07-2015
WO 2016205323	A1	22-12-2016	EP 3310918 A1 25-04-2018 US 2018092990 A1 05-04-2018 WO 2016205323 A1 22-12-2016

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)		C 1 2 N 15/88		Z
A 6 1 K 38/46 (2006.01)		A 6 1 K 31/7105		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 K 38/46		
A 6 1 P 13/12 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5	
		A 6 1 P 13/12		

(31)優先権主張番号 62/834,328

(32)優先日 平成31年4月15日(2019.4.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/841,734

(32)優先日 令和1年5月1日(2019.5.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ディメク, ザカリー ウィリアム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 オダテ, ショブ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 ミュレー, ブラッドリー アンドリュウ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 レカルボ, レイノルド マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 ヒューブナー, アネット

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 ストラップス, ウォルター

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

(72)発明者 ヘッセ, サラ ベス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 BA05 CA46

4C084 AA02 BA44 DC22 MA24 MA66 NA14 ZA811 ZB211 ZB212

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA24 MA66 NA14 ZA81 ZB21